

Aus dem Institut für klinische Chemie
und Laboratoriumsmedizin
der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster
Direktor: Univ. Prof. Dr. G. Assmann

Mikrosatellitenanalyse zur Detektion der genetischen Instabilität
bei monofokalen und bifokalen Prostatatumoren

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des doctor medicinae

der Medizinische Fakultät der
Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

vorgelegt von:

Iris Gockel
aus Arnsberg

2004

Dekan: Univ.-Prof. Dr. H. Jürgens

1. Berichterstatter: Prof. Dr. rer. nat. Burkhard Brandt

2 Berichterstatter: PD Dr. med. Axel Semjonow

Tag der mündlichen Prüfung: 08.07.2005

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Westfälischen Wilhelms-
Universität Münster

Aus dem Institut für Chemie
und Laboratoriumsmedizin
der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster
Direktor: Univ. Prof. Dr. G. Assmann

Referent: Prof. Dr. rer. nat. Burkhard Brandt
Koreferent: PD Dr. med. Axel Semjonow

Zusammenfassung

Mikrosatellitenanalyse zur Detektion der genetischen Instabilität
bei monofokalen und bifokalen Prostatatumoren

Iris Gockel

In dieser Studie wurden mittels Mikrosatellitenanalyse 10 ausgewählte genetische Marker von 92 Patienten mit gesichertem Prostatakarzinom auf einen LOH untersucht.

Ziel war es, genetische Veränderungen auf bestimmten Markern oder Markerkombinationen ausfindig zu machen, die zusammen mit anderen kliniko-histopathologischen Untersuchungsgrößen die Erkennung und Prognose des Prostatakrebses verbessern können. Das in dieser Studie untersuchte Gesamtkollektiv setzte sich aus 76 Patienten mit monofokalen Tumoren und 16 Patienten mit bifokalen Tumoren zusammen. Zusätzlich zur Ausprägung eines LOH sollten bei den bifokalen Tumoren die beiden Einfoci untersucht werden, da das Vorliegen genetisch unterschiedlicher, nicht monoklonaler Foci Konsequenzen für die Behandlung dieser Tumorerkrankung bedingen könnte. Die Ergebnisse der Untersuchungen zeigten, daß alle hier eingesetzten Mikrosatellitenmarker zur genetischen Untersuchung von Prostatakarzinomen geeignet sind. In dieser Studie haben sich die Marker D8S258, D10S541, D13S153, und p53 als die relevantesten dargestellt, da sie insgesamt sehr häufig betroffen waren. Bei Auftreten eines serologischen Rezidivs zeigten diese am häufigsten einen LOH. Diese Marker waren besonders bei späten Tumorstadien durch einen LOH repräsentiert. Die Marker D13S153 und p53 traten sehr häufig kombiniert auf. Die Region 8p scheint eine Region von besonderem Interesse zu sein. Bei einem LOH auf diesem Marker waren im Gegensatz zu den drei anderen Markern serologische Rezidive viel später zu beobachten. Die Region 8p bedarf daher weiterer Untersuchungen.

In dieser Studie zeigte sich, daß das Prostatakarzinom vermutlich eine polygene Erkrankung ist. Durch keinen einzelnen der hier untersuchten Marker war sie genetisch zu charakterisieren. Vielmehr scheint die Kombination verschiedener genetischer Alterationen bei der Tumorgenese eine Rolle zu spielen. Für die hier untersuchten bifokalen Tumoren konnte gezeigt werden, daß sich eine Vielzahl der Foci als genetisch heterogen erweisen. So besteht beim Prostatakarzinom durchaus die Möglichkeit der Entstehung einzelner genetisch völlig unterschiedlich Foci innerhalb eines Tumors. Für die Zukunft könnte sich hieraus ein neuer therapeutischer Ansatz ergeben.

Tag der mündlichen Prüfung: 08.07.2005

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1. Ätiologie von Krebserkrankungen	1
1.2. Prostatakrebs	2
1.2.1. Epidemiologie und Inzidenz	2
1.2.2. Ätiologie	3
1.2.3. Histologische Subtypen	4
1.2.4. Grading	4
1.2.5. Potentielle präkanzeröse Epithelveränderungen	7
1.2.6. Stadieneinteilung	7
1.2.7. Lokalisation	8
1.2.8. Symptomatik	9
1.2.9. Untersuchungen zur Stadieneinteilung und zur Diagnostik	9
1.2.9.1. Vorsorgeuntersuchungen (Screening)	9
1.2.9.2. Die Serinprotease PSA	10
1.2.9.3. Altersabhängige PSA-Grenzwerte	11
1.2.9.4. Korrelation von PSA-Wert und Tumorstadium	11
1.2.9.5. Untersuchungen zur Stadieneinteilung	12
1.2.10. Therapie	13
1.2.10.1 Therapie mit kurativer Zielsetzung	13
1.2.10.1.1. Allgemeines	13
1.2.10.1.2. Radikale Prostatovesikulotomie	13
1.2.10.1.3. Strahlentherapie	13
1.2.10.2. Stadienadaptierte Behandlungsoptionen	14
1.2.10.3 Lymphknotenmetastasen und Fernmetastasen	15
1.2.11. Prognose	15
1.2.12. Nachsorge	16
1.3. Molekulare Grundlage von Krebserkrankungen	16
1.4. Molekulare Genetik von Prostatatumoren	19
1.5. LOH und Mikrosatellitenanalyse	21
1.6. Ziel der Arbeit	22
2. Patienten, Material und Methoden	23
2.1. Patienten und Probenmaterial	23
2.2. DNA-Isolierung	24
2.2.1. DNA-Isolierung aus Blut	24
2.2.2. DNA-Isolierung aus Tumorgewebe	25
2.3. Photometrische Messung zur Bestimmung der DNA-Konzentration	27
2.4. Mikrosatellitenanalyse	28

2.5. Methoden zur Entdeckung von genetischen Alterationen	29
2.5.1. Polymerase-Kettenreaktion (<i>polymerase chain reaktion</i> , PCR) und Multiplex-PCR	29
2.6. Primerauswahl	31
2.7. Fluoreszenzmarkierungen	32
2.8. Primersequenzen	33
2.9. Multiplex-PCR – Durchführung	34
2.10. Kapillarelektrophorese	35
2.11. Klinische und histopathologische Parameter	37
2.12. Distanzanalysen und Clusteranalysen	40
2.12.1. Statistische Methoden – Der Chi-Quadrat-Test	40
2.12.2. Distanzanalysen und Clusteranalysen	41
3. Ergebnisse	44
3.1. Beschreibung der Kollektive anhand klinischer und histopathologischer Parameter	44
3.1.1. Präoperativ erhobene Daten	44
3.1.1.1. Lebensalter der Patienten	44
3.1.1.2. t-PSA-Wert	44
3.1.1.3. Präoperativer Palpationsbefund	45
3.1.2. Postoperativ erhobene Daten	45
3.1.2.1. pT-Stadium	45
3.1.2.2. Grading	46
3.1.2.3. Gleason-Score	46
3.1.3. Weitere klinische Charakteristika	46
3.1.3.1. Positive Familienanamnese	46
3.1.4. Follow-up	47
3.1.4.1. PSA-Wiederaanstieg	47
3.2. Nachweis von allelischen Imbalanzen an ausgewählten Mikrosatellitenmarkern im Tumorgewebe der Prostatakarzinome	47
3.2.1. Heterozygotiegrad des Gesamtkollektivs	48
3.2.2. Untersuchung des Gesamtkollektivs auf Homo- bzw. Heterozygotie	49
3.2.3. Untersuchung 76 der Patienten mit monofokalen Tumoren	51
3.2.4. Untersuchung der 16 Patienten mit bifokalen Tumoren	52
3.2.4.1. Allelische Imbalanzen der 32 Tumorfoci der 16 Patienten mit bifokalen Tumoren	52
3.2.4.2. Allelische Imbalanzen der 16 Patienten mit bifokalen Tumoren	54
3.2.5. Vergleichende Darstellung beider Subkollektive (76 Patienten und 16 Patienten) für die Mikrosatellitenanalyse	56
3.2.6. Vergleich des Heterozygotiegrades und der Alterationsfrequenz dieser Studie zu Literaturdaten	57

3.3. Allelische Imbalancen der Marker in Korrelation mit klinischen und histopathologischen Parametern	58
3.3.1. Allelische Imbalancen der Marker der Patienten mit monofokalen Tumoren in Korrelation zu klinischen und histopathologischen Parametern	58
3.3.1.1. Präoperativ erhobene Daten	58
3.3.1.1.1. Häufigkeit eines LOH der informativen Fälle in Relation zum Lebensalter der Patienten	58
3.3.1.1.2. Häufigkeit eines LOH der informativen Fälle in Relation zum t-PSA-Wert	60
3.3.1.1.3. Häufigkeit eines LOH der informativen Fälle in Relation zum präoperativen Palpationsbefund	61
3.3.1.1.4. Häufigkeit eines LOH der informativen Fälle in Relation zu von Pca-betroffenen Blutsverwandten	62
3.3.1.2. Postoperativ erhobene Daten	63
3.3.1.2.1. Häufigkeit eines LOH der informativen Fälle in Relation zum pT-Stadium	63
3.3.1.2.2. Häufigkeit eines LOH der informativen Fälle in Relation zum Grading	64
3.3.1.2.3. Häufigkeit eines LOH der informativen Fälle in Relation zum Gleason-Score	65
3.3.1.2.4. Häufigkeit eines LOH der informativen Fälle in Relation zum PSA-Wiederanstieg	66
3.3.2. Allelische Imbalancen der Marker der 16 Patienten mit bifokalen Tumoren in Korrelation zu klinischen und histopathologischen Parametern	67
3.3.2.1. Präoperativ erhobene Daten	67
3.3.2.1.1. Häufigkeit eines LOH der informativen Fälle in Relation zum Lebensalter der Patienten	67
3.3.2.1.2. Häufigkeit eines LOH der informativen Fälle in Relation zum t-PSA	68
3.3.2.1.3. Häufigkeit eines LOH der informativen Fälle in Relation zum präoperativen Palpationsbefund	68
3.3.2.1.4. Häufigkeit eines LOH der informativen Fälle in Relation zu von Pca-betroffenen Blutsverwandten	68
3.3.2.2. Postoperativ erhobene Daten	68
3.3.2.2.1. Häufigkeit eines LOH der informativen Fälle in Relation zum pT-Stadium	68
3.3.2.2.2. Häufigkeit eines LOH der informativen Fälle in Relation zum Grading	69
3.3.2.2.3. Häufigkeit eines LOH der informativen Fälle in Relation zum Gleason-Score	69
3.3.2.2.4. Häufigkeit eines LOH der informativen Fälle in Relation zum PSA-Wiederanstieg	69
3.3.2.2.5. Häufigkeit eines LOH der informativen Fälle in Relation zum Nodalstatus	70
3.3.2.2.6. Häufigkeit eines LOH der informativen Fälle in Relation zum Befund der Prostatakapsel	70

3.3.2.2.7. Häufigkeit eines LOH der informativen Fälle in Relation zum Schnitttrand	70
3.3.2.2.8. Häufigkeit eines LOH der informativen Fälle in Relation zum Tumorzvolumen	71
3.4. Clusteranalysen	71
3.4.1. Clusteranalyse der monofokalen Tumoren	71
3.4.1.1. <i>Average-Linkage</i> -Clusteranalyse	71
3.4.1.2. <i>Complete-Linkage</i> -Clusteranalyse	72
3.4.2. Clusteranalyse der bifokalen Tumoren	75
3.4.2.1. <i>Average-Linkage</i> -Clusteranalyse	75
3.4.2.2. <i>Complete-Linkage</i> -Clusteranalyse	77
2.4.3. Vergleich der Subkollektive	80
3.4.4. Clusteranalyse des Gesamtkollektives	80
3.4.4.1. <i>Average linkage</i> -Clusteranalyse	81
3.4.4.2. <i>Complete-Linkage</i> -Clusteranalyse	82
3.5. Genetische Unterschiede der bifokalen Foci	86
3.6. Daten zum Follow-up	87
3.6.1. Zeitdauer bis zum PSA-Wiederaufstieg	87
3.6.2. Vergleich der LOH-Häufigkeit bei Patienten mit bzw. ohne PSA-Wiederaufstieg	89
3.6.3. Korrelation der Markerkombinationen bei Patienten mit PSA-Wiederaufstieg zu Markerkombinationen in der Clusteranalyse	90
3.6.4. Verstorben an Pca	90
4. Diskussion	91
4.1. Kollektiv	91
4.2. Die genetischen Marker	92
4.3. Korrelation genetischer Instabilität und klinischer bzw. histopathologischer Parameter	99
4.4. Markerkombinationen	103
4.5. Genetik bifokaler Tumoren	105
5. Literaturverzeichnis	109
6. Abkürzungsverzeichnis	136
7. Danksagung	138
8. Lebenslauf	139
9. Anhang	I

1. Einleitung

1.1. Ätiologie von Krebserkrankungen

In den wohlhabenden Ländern ist Krebs nach den Herz-Kreislauferkrankungen die zweithäufigste Todesursache (7). Neben erblichen Faktoren liegt die Hauptursache der Krebsentstehung nach heutigem Wissensstand in erworbenen Mutationen der DNA (2). Neben physikalischen, thermischen und chemischen Noxen sind auch Bakterien, Pilze und besonders Viren als schädigende Einflußgrößen bekannt. Auch Ernährung und Genussmittel sowie das Lebensalter gelten als disponierende Faktoren (27, 199).

Die Entstehung von Malignomen wird als multiphasischer Prozess verstanden, bei dem es zu einer stufenweisen Veränderung gesunder Zellen in Richtung bösartiger Zellen kommt.

In diesem Mehrstufenmodell unterscheidet man grundsätzlich drei Phasen (27, 200):

1. Initiation

Sie steht am Anfang der Kanzerogenese. Eine Noxe führt zu Störungen biologischer Gleichgewichtsprozesse mit Transformation von Protoonkogenen zu Onkogenen und führt zu Veränderungen von Zellen, die auch auf Tochterzellen vererbt werden können. Zusätzlich zur Initiation der onkogenen Potenz können in den betroffenen Zellen durch die gleichen Schädigungen Zellkontrollmechanismen wie Reparaturprozesse oder Apoptose behindert werden. Zunächst liegt in diesen Zellen keine Wachstumstendenz vor.

2. Promotion

In diesem Stadium werden die Zellen mit maligner Potenz, durch weitere Einwirkung der Noxe oder durch additive Wirkung von Synkarzinogenen (Promotoren) weiterhin geschädigt. Sie begünstigen das Zellwachstum (Proliferation) in Richtung Präneoplasie und verkürzen die Latenzzeit bis zur Progressionsphase. Auch eine verminderte Apoptose kann zum unregulierten Wachstum der veränderten Zellen beitragen.

3. Progression

Dieser irreversible Prozess führt nach manchmal jahrelanger Latenzzeit zur Proliferation der veränderten Zellklone und zur Umwandlung der primär benignen in bösartige Tumore. Diese zeichnen sich durch ungehemmtes Zellwachstum und die Fähigkeit zur

Infiltration und Migration und somit zur Metastasierung aus. Sie haben sich der Kontrolle der Zellregulationsmechanismen entzogen und z. B. durch Expression von Wachstums- und Angiogenesefaktoren Wege zur Expansion geschaffen.

1.2. Prostatakrebs

1.2.1. Epidemiologie und Inzidenz

Die Prostata ist in Deutschland mit 18,7 % die häufigste Lokalisation bösartiger Neubildungen beim Mann (7). Das Prostatakarzinom (PCa) ist unter den urologischen Tumoren die häufigste Todesursache und zugleich ab dem 80. Lebensjahr die häufigste tumorbedingte Todesursache überhaupt (103) und hat daher 1998 erstmals den Lungenkrebs als häufigsten Tumor bei Männern abgelöst (199). Das mittlere Alter bei Diagnose liegt bei 71,4, das mittlere Sterbealter bei 78 Jahren. Daher geben 5-Jahresüberlebensraten keine Aussage über eine Heilung (103).

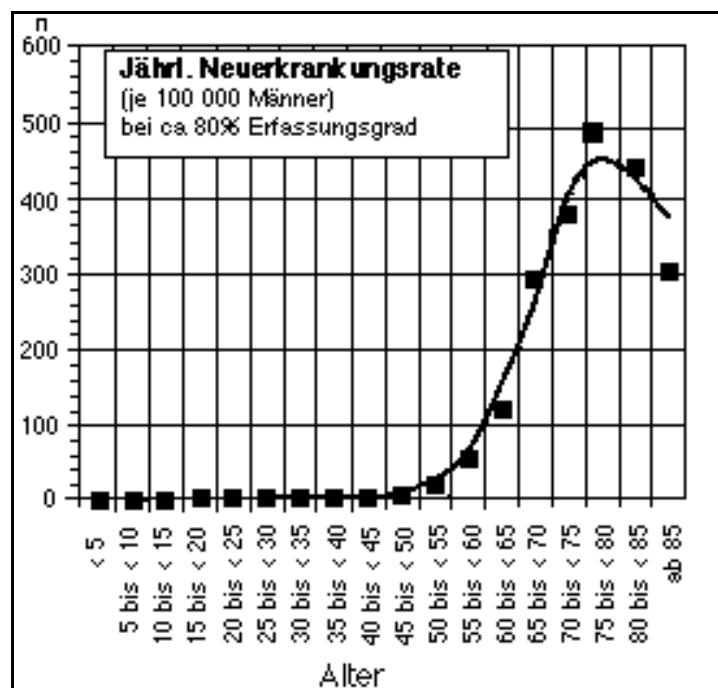


Abb.1: Jährliche Neuerkrankungsrate an PCa (n = Anzahl Personen, Alter = Alter in Jahren) Quelle: Daten des Tumorerregisters München 2003 in: Prostatakarzinom (215)

In Deutschland werden derzeit jährlich etwa 31.500 Prostatakarzinome diagnostiziert (Abb.1). Die jährliche Neuerkrankungsrate je 100.000 Männer steigt mit dem Alter stark an von etwa 50/100.000 bei 60-jährigen bis auf mehr als 400/100.000 bei Lebens-

alter zwischen 75 und 85 Jahren. Erkrankungen unterhalb des 50. Lebensjahres treten beim Prostatakarzinom extrem selten auf. Im Vergleich zu den übrigen EU-Ländern liegen die in Deutschland ermittelten Erkrankungsraten für Prostatakrebs im oberen Drittel. Die höchsten Raten finden sich in Skandinavien, die niedrigsten in Südeuropa (199).

Beachtenswert sind auch Autopsiebefunde, nach denen mit zunehmendem Alter gut differenzierte Adenokarzinome gefunden werden, in 10% bei 50-jährigen und in 70% bei 80-jährigen (211, 222). In einer Studie wurden sogar 34% latente Karzinome in der fünften Lebensdekade gefunden (208). Bei einer Wahrscheinlichkeit von 6% bis zum 80. Lebensjahr an einem Prostatakarzinom erkrankt zu sein, bedeutet dies, daß über 90% dieser latenten Karzinome klinisch nicht manifest werden. Alle diese Tatsachen lassen auf ein langes Intervall zwischen Initiierung und klinischer Manifestation schließen.

1.2.2. Ätiologie

Die Ursachen des Prostatakarzinoms sind weitgehend unbekannt. In letzter Zeit wurde eine familiäre Häufung des Prostatakarzinoms gesichert (32). Andererseits wird ein großer Einfluß von Umweltfaktoren, speziell der Ernährung, vermutet. Ein Zusammenhang insbesondere mit der Fettaufnahme wird aus ökotrophologischen Studien gefolgert (199) und zeigt deutliche Analogien zum kolorektalen Karzinom und zum Brustkrebs. Zusätzlich wurden erhöhte Risiken bei Schwermetallexposition, speziell bei Kadmium, gefunden. Auch eine virale Genese (Herpesviren Typ II), sexuell übertragbare Krankheiten, möglicherweise das Sexualverhalten, hormonelle Einflüsse, Chemikalien und auch Strahlenexposition werden diskutiert. (199, 97, 51). Eine, bisher allerdings nicht reproduzierte Studie weist darauf hin, daß die Inzidenz des Prostatakarzinoms nach Vasektomie zur Schwangerschaftsverhütung signifikant höher ist (96).

1.2.3. Histologische Subtypen

Histologische Veränderungen in der Prostata sind häufig. Im Folgenden werden orientierend die Prostatatakarzinome kurz dargestellt (WHO, 167).

I. Epitheliale Tumoren

maligne

- 1) Adenokarzinom (kleinazinär, großazinär, kribriform, solide/trabekulär, andere sehr seltene Formen wie z.B. endometrioides Karzinom des Utriculus seminalis, papilläres Zystadenokarzinom, muzinöses Karzinom oder adenoid-zystisches Karzinom)
- 2) Transitionalzellkarzinom
- 3) Plattenepithelkarzinom
- 4) Undifferenzierte Karzinome
- 5) Kleinzellige Karzinome (selten)

1.2.4. Grading

Beim Grading (G) des Prostatatakarzinoms sind weltweit insbesondere drei Systeme verbreitet (164):

1. Das WHO-Grading
2. Das Gleason-Grading
3. Grading nach Empfehlung des Pathologisch-urologischen Arbeitskreises

Zu 1. WHO-Grading:

Dieses sieht eine relativ einfache histologische Einteilung in 3 Grade vor, die Aussagen über die Differenzierung der Zellen machen:

- | | |
|-----------|------------------------------|
| Grad I: | Hochdifferenzierte Zellen |
| Grad II: | Mäßig differenzierte Zellen |
| Grad III: | Gering differenzierte Zellen |

Zu 2. Gleason-Grading:

Der Gleason-Score ist ein Grading-System, das in Deutschland und Europa vielfache Anwendung findet und, individuell abhängig, mit einer potentiellen Prognose für den Patienten korreliert. Die Einteilung nach Gleason (84) basiert rein auf der Bewertung

des strukturellen Karzinomaufbaus mit Berücksichtigung der unterschiedlich differenzierten drüsigen Karzinomarchitektur und ohne Berücksichtigung der zytologischen Malignitätskriterien. Bei unterschiedlichem Baumuster wird die flächenmäßig vorherrschende Form und der zweite Strukturtyp mit abweichendem Baumuster bzw. struktureller Differenzierung getrennt mit Punkten entsprechend dem Entdifferenzierungsgrad in einer Skala von 1-5 bewertet. Besteht ein Tumor aus einheitlich aufgebauten Tumordrüsen (oder besser einem einzigen Wachstumsmuster), so wird der Gleason-Grad einfach verdoppelt (z. B. 3+3=6). Aus der Summe der Punktwerte ergibt sich der sog. "Gleason-Score" des Prostatakarzinoms. Eine Übersetzung beider Graduierungssysteme zeigt erfahrungsgemäß etwa folgende Abstufungen:

G I = Gleason 2-4

G II = Gleason 5-7

G III = Gleason 8-10

Zu 3.: Grading nach den Empfehlungen des Pathologisch-urologischen Arbeitskreises "Prostatakarzinom"

Im deutschsprachigen Raum wird vorwiegend die Graduierung nach den Empfehlungen des Pathologisch-urologischen Arbeitskreises "Prostatakarzinom" vorgenommen. Diese Einteilung berücksichtigt in einer Punkteskala sowohl strukturelle Gesichtspunkte (drüsige, kribriiforme bzw. solide Karzinomanteile) wie auch zytologische Kriterien (geringe, mäßige und starke Kernanplasie) und gelangt in Abhängigkeit davon zu einem Malignitätsgrad I a,b, II a,b und III a,b. Diese Graduierung hat sich als prognostisch bedeutsam erwiesen. Der Malignitätsgrad I a - II a zeigt eine deutlich günstigere Prognose als der Malignitätsgrad II b und III (100, 219).

Diese Einteilung entspricht dem von Dohm und Helpap erstellten Grading-System für Prostata Tumoren.

Tab.1: Grading nach Dohm und Helpap (52, 98, 99, 100, 155)

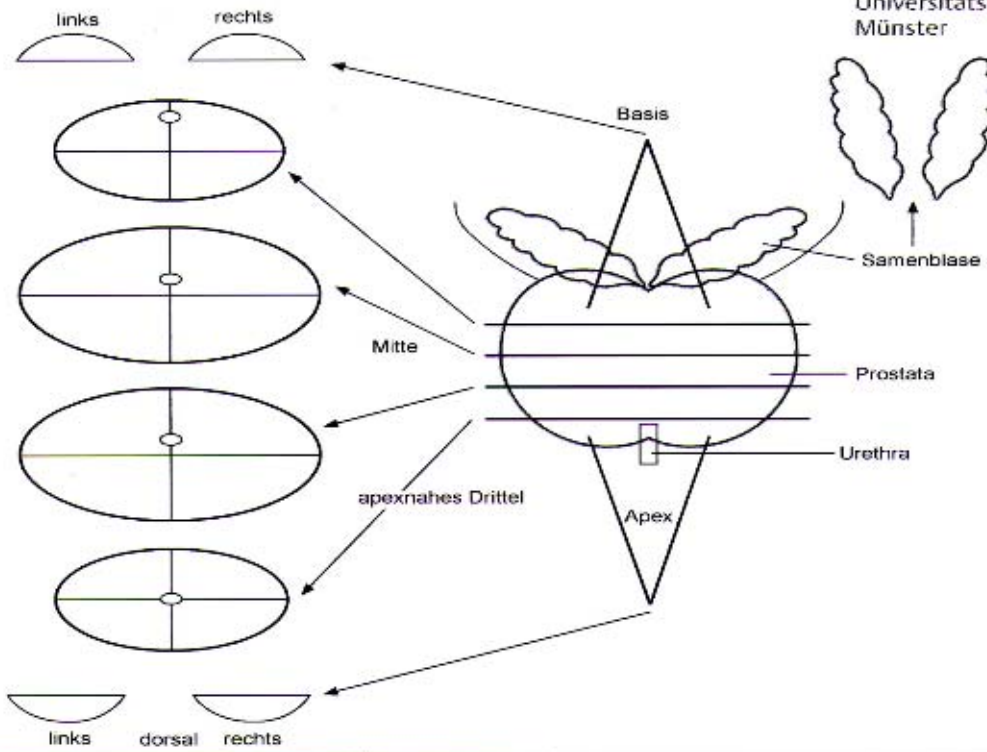
Grad	Strukturelle und zytologische Kriterien
1	Hochdifferenziertes Adenokarzinom mit geringer Kernatypie
2	Wenig differenziertes Adenokarzinom ohne oder mit einzelnen kribriiformen Herden und mäßiger Kernatypie
3	Kribriiformes und solides Karzinom mit starker Kernatypie

Kopie als Anlage
zum Entlassungsbericht

Pathologischer Befund Prostatakarzinom

Name:
J. Nr.

Geb. Dat.



<p>P Prostatäre Intraepitheliale Neoplasie (PIN) 3°</p> <p> Adenokarzinom</p> <p> Kapselinvasion</p> <p> Extraprostatäre Ausbreitung</p> <p> positiver chirurg. Schnitttrand</p>	<p><i>Differenzierungsmuster</i></p> <p><input type="checkbox"/> hoch differenziert 0</p> <p><input type="checkbox"/> wenig differenziert 1</p> <p><input type="checkbox"/> kribriform 2</p> <p><input type="checkbox"/> solide 3</p>		<p><i>Kernatypie</i></p> <p><input type="checkbox"/> gering 0</p> <p><input type="checkbox"/> mäßig 1</p> <p><input type="checkbox"/> stark 2</p>	
	<p>Ia = 0 Ib = 1 IIa = 2 IIb = 3 IIIa = 4 IIIb = 5</p>			
pT:	pN:	Gleason Score:		Malignitäts Grad (Helpap):

Abb.2: Beispiel einer „Landkarte“ zur Verdeutlichung der verschiedenen Wachstumsmuster

1.2.5. Potentielle präkanzeröse Epithelveränderungen

Die atypische adenomatöse Hyperplasie (AAH) ist charakterisiert durch eine umschriebene adenomatöse Proliferation kleinazinärer und tubulärer Drüsen mit zellulären Atypien. Die prostatiche intraepitheliale Neoplasie (PIN) ist gekennzeichnet durch eine intraduktale Epithelproliferation mit Atypie; je nach Atypiegrad wird eine PIN mit geringer und schwerer Atypie ("high grade PIN") unterschieden. Die atypische adenomatöse Hyperplasie gilt als fakultative Präkanzerose. Die high grade PIN werden gehäuft zusammen mit Prostatakarzinomen beobachtet. Es gibt Hinweise, daß die high grade PIN der Entwicklung eines manifesten Prostatakarzinoms auch vorangehen kann und sollten Anlaß für weitere Kontrolluntersuchungen sein (16, 22, 99).

1.2.6. STADIENEINTEILUNG / TNM-Klassifikation

Die hier vorgestellte histologische Stadieneinteilung maligner Tumoren wurde von der UICC (Unio Internationalis contra Cancerum) entwickelt. Es wird eine Beurteilung der Primärtumoren (T), der regionären Lymphknoten (N) und der Metastasen (M) vorgenommen.

Stadieneinteilung Prostatakarzinom, UICC 1992:

T - Primärtumor

- Tx Primärtumor kann nicht beurteilt werden
- T0 Kein Anhalt für Primärtumor
- T1 Klinisch nicht erkennbarer Tumor, der weder tastbar noch in bildgebenden Verfahren sichtbar ist
 - T1 a Zufälliger histologischer Befund ("incidental carcinoma") in 5 % oder weniger des resezierten Gewebes
 - T1 b Zufälliger histologischer Befund ("incidental carcinoma") in mehr als 5 % des resezierten Gewebes
 - T1 c Tumor mittels Nadelbiopsie diagnostiziert (z. B. wegen erhöhter PSA-Werte)
- T2 Tumor begrenzt auf Prostata
 - T2 a Tumor befällt eine Hälfte eines Lappens oder weniger
 - T2 b Tumor befällt mehr als die Hälfte eines Lappens, aber nicht beide Lappen
 - T2 c Tumor befällt beide Lappen

- T3 Tumor breitet sich durch die Prostatakapsel hindurch in extrakapsuläres Gewebe aus
- T3 a Einseitige extrakapsuläre Ausbreitung
 - T3 b Beidseitige extrakapsuläre Ausbreitung
 - T3 c Tumor infiltriert Samenblase(n)
- T4 Tumor ist fixiert oder infiltriert andere benachbarte Strukturen als Samenblasen
- T4 a Tumor infiltriert Blasenhalshals, Sphincter externus und/oder Rectum
 - T4 b Tumor infiltriert Levatormuskel und/oder ist an Beckenwand fixiert

N - Regionäre Lymphknoten

- Nx Regionäre Lymphknoten können nicht beurteilt werden
- N0 Keine regionären Lymphknotenmetastasen
- N1 Metastase in solitärem Lymphknoten, 2 cm oder weniger in größter Ausdehnung
- N2 Metastase(n) in solitärem Lymphknoten, mehr als 2 cm, aber nicht mehr als 5 cm in größter Ausdehnung, oder in multiplen Lymphknoten, keine mehr als 5 cm in größter Ausdehnung
- N3 Metastasen in Lymphknoten, mehr als 5 cm in größter Ausdehnung

M - Metastasen

- Mx Metastasen nicht beurteilbar
- M0 Keine Metastasen
- M1 Metastasen
gehäuft in Skelett, Gehirn, Lymphknoten oder Lunge

1.2.7. Lokalisation

Ausgangspunkt des Prostatakarzinoms ist in ca. 70% das Drüsenepithel der peripheren Zone der Prostata. Seltener entstehen Karzinome in der sogenannten Übergangszone 10% oder in der zentralen Zone (20%). Mehr als 95 % aller PCa sind histologisch Adenokarzinome (164, siehe auch 1.2.3.).

1.2.8. Symptomatik

Im Frühstadium fehlen Symptome völlig, im Spätstadium kommt es zu Miktionsbeschwerden wie bei benigner Prostatahyperplasie (BPH). Dabei können obstruierende Symptome mit Harnstau bis Urämie vorkommen. Seltener führen auch Hämaturie oder metastasenbedingte Symptome zur Diagnose eines PCa (224).

1.2.9. Untersuchungen zur Stadieneinteilung und Diagnostik

1.2.9.1. Vorsorgeuntersuchungen (Screening)

Trotz der hohen Inzidenz des Prostatakarzinoms besteht immer noch keine einhellige Meinung bezüglich des Wertes der Vorsorgeuntersuchung, der notwendigen diagnostischen Schritte und der optimalen Therapie für jedes Tumorstadium (82, 86).

Die gesetzlichen Krankenkassen empfehlen in ihrem Krebsfrüherkennungsprogramm für Männer ab dem 45. Lebensjahr eine jährliche Untersuchung des äußeren Genitales, eine Abtastung der regionären Lymphknoten, sowie eine digitale Austastung des Rektums (DRU) zur Beurteilung des dorsalen Anteils der Prostata. Auch eine transrektale Ultraschalluntersuchung (TRUS) der Prostata kann durchgeführt werden (177). Ein weiterer wichtiger Untersuchungsparameter stellt die Bestimmung des PSA-Wertes (Prostata-spezifisches Antigen) im Serum der Patienten dar, da das PSA heutzutage als etablierter prostataspezifischer Tumormarker gilt (180).

Die invasive Diagnostik des Prostatakarzinoms umfasst die Zystoskopie und die ultraschallgesteuerte Stanzbiopsie. Bei begründetem Verdacht sind weiterführende, sogenannte „Staging-Untersuchungen“ wie Röntgen-Thorax und -Abdomen, Computertomographie (CT) und Magnetresonanztomographie (MRT) sowie das Knochenszintigramm indiziert (101, 241).

Der Wert von Vorsorgeuntersuchungen ist umstritten (124, 125, 259). Das PSA ist sensitiver als die digitale rektale Untersuchung (DRU). PSA erhöht insbesondere in Kombination mit DRU die Neuentdeckungsrate auf das etwa 4-fache (34). Es ist gesichert, daß durch PSA-Screening mehr frühe, organbegrenzte Karzinome entdeckt werden, als bei einem "Palpations-Screening" wie es bisher in Deutschland üblich ist (24, 33, 175, 210).

1.2.9.2. Die Serin-Protease PSA

Das PSA ist ein aus 240 Aminosäuren bestehendes Glykoprotein, das als Protease durch Verflüssigung des Spermas die Spermienmotilität erhöht. Das PSA wird nur von der Prostata exprimiert. Dieses ist normalerweise im Serum gesunder Männer nicht oder nur in geringer Konzentration nachweisbar. Zahlreiche wissenschaftliche Studien befassen sich seit 30 Jahren mit der Untersuchung des PSA. Hierbei hat sich herausgestellt, daß sowohl die Höhe der Konzentration des t-PSA (totales PSA = gebundenes und freies PSA) als auch das Verhältnis von f-PSA (freies PSA) zu t-PSA, beides untersucht im Serum, wichtige Laborparameter darstellen, um Erkrankungen der Prostata genauer zu beurteilen. Konzentrationsanstiege des Serum-PSA kommen bei Entzündungen der Prostata (Prostatitis), der benignen Prostatahyperplasie (BPH) und beim Prostatakarzinom sowie nach Manipulationen an der Prostata (DRU, TRUS, Zystoskopie und Biopsie) vor (97). Seit 1980, bedingt durch die Entwicklung sensitiverer Messmethoden durch die Arbeitsgruppe Kuriyama *et al.* (130), hat sich das PSA als Tumormarker etabliert.

Tumormarker sind Stoffe, deren Auftreten oder erhöhte Konzentrationen in Körperflüssigkeiten (v. a. im Serum) einen Zusammenhang mit dem Vorhandensein und oder Verlauf von Tumoren aufweist. Durch die Studien von Kuyimara *et al.* wurde der erste "Normalbereich" für die Konzentration von PSA im Serum festgelegt (0,1-1,792 ng/ml). Höhere Konzentrationen weisen auf pathologische Vorgänge im Bereich der Prostata hin, wobei exzessive Erhöhungen der Serum-PSA-Konzentration bei Männern mit fortgeschrittenem PCa gefunden werden (4, 14). Mittlere Werte lassen keine genaue Aussage über die Dignität der Erkrankung zu, besonders die Grauzone (4-10 ng/ml) findet sich gleichermaßen bei Patienten mit BPH und PCa (33). Auch zur Verlaufskontrolle des PCa nach kurativer Therapie hat das PSA einen hohen Stellenwert. Nach radikaler Resektion der Prostata sollte es unter Abwesenheit jeglichen Prostatagewebes innerhalb der nächsten 3 Wochen auf ein nicht messbares Niveau abfallen. Bleibt die PSA-Konzentration oberhalb der Nachweisgrenze, oder steigt an, muß von Metastasen oder verbliebenem Tumorrest ausgegangen werden (193, 196, 256). Auch die Geschwindigkeit des PSA-Abfalls hat einen Einfluß auf die Prognose. Semjonow *et al.* konnten 1992 belegen, daß bei kurierten Patienten die Halbwertszeit (HWZ) mit 1,5 Tagen deutlich kürzer ist als die HWZ von 3 Tagen bei nicht kurierten Patienten (220). Ein

weiteres diagnostisches Hilfsmittel kann nach Junker *et al.* (111) die Bestimmung des Quotienten f-PSA/t-PSA sein, durch den gerade in den Bereichen von t-PSA-Konzentrationen zwischen 4-25 ng/ml die Differentialdiagnose zwischen BPH und PCa erleichtert werden kann.

1.2.9.3. Altersabhängige PSA-Grenzwerte

Der PSA-Wert steigt mit zunehmendem Lebensalter an. Hierdurch wird die Sensitivität bei jüngeren Patienten erhöht, bei denen es gerade wegen der langen Lebenserwartung darauf ankommt, die Frühstadien zu erkennen und kurativ zu behandeln (174, 215).

1.2.9.4. Korrelation von PSA-Wert und Tumorstadium

Über die Bestimmung des PSA-Wertes kann eine Indikation zur Biopsie gestellt werden, da die Tumorstadien gut mit den PSA-Werten korrelieren.

Tab.2: Korrelation von PSA-Wert und Tumorstadium (215)

PSA-Wert (ng/ml)	pN/M- Status	N0M0 n=470	N1M0 n=52	N>1M0 n=40	M1 n=44	Σ
< 4 n=83	13,7%	97,6	2,4	0,0	0,0	100
< 10 n=129	21,3%	87,6	7,0	3,1	2,3	100
< 20 n=143	23,6%	88,1	6,3	4,9	0,7	100
< 50 n=143	23,6%	75,5	14,7	8,4	1,4	100
≥50 n=108	17,8%	38,9	10,2	15,7	35,2	100
Σ n=606	(100%)	77,6	8,6	6,6	7,3	

Zusammenfassend kann festgestellt werden: Obwohl eine Senkung der Mortalität durch Vorsorgeuntersuchungen bisher nicht gesichert ist, empfehlen die *American Cancer Society*, die *American Urological Association* und das *American College of Radiology* eine jährliche Untersuchung mit DRU und PSA. Hinzugefügt werden sollte, daß die Empfehlung nur vom 50. bis zum 75. Lebensjahr gilt, bei Familienanamnese eines PCa (215) schon ab dem 40. Lebensjahr. Zusätzlich zu der in Deutschland anerkannten jähr-

lichen rektalen Untersuchung ist daher die jährliche Durchführung einer PSA-Bestimmung im Serum zu empfehlen (199).

1.2.9.5. Untersuchungen zur Stadieneinteilung

Knochenmetastasen sind ca. 90% mit Abstand die häufigste Lokalisation von Fernmetastasen, gefolgt von Lebermetastasen (3 %), Metastasen in Lunge oder Pleura (3%) und ZNS-Metastasen mit 1% (103). Die Knochenszintigraphie ist derzeit die Methode der Wahl für die Diagnose von Knochenmetastasen. Die Kernspintomographie (MRT) ist zwar sensitiver als die Knochenszintigraphie, aber eine Untersuchung des gesamten Skeletts ist sehr aufwendig. Lymphknotenmetastasen sind Indikator für eine schlechte Prognose, auch wenn nur ein solitärer Lymphknoten befallen ist. Computertomographie und MRT sind nicht in der Lage, Lymphknotenmetastasen mit akzeptabler Sensitivität zu erfassen, weil die betroffenen Lymphknoten oft nur unwesentlich vergrößert sind. Dagegen existiert eine gute Korrelation zwischen dem T-Stadium dem Differenzierungsgrad oder dem PSA-Wert und einer lymphogenen Metastasierung (175, 183, 205, 215, 224, 241).

Übersicht über diagnostische Maßnahmen bei Verdacht auf PCa:

obligat:

Rektale Untersuchung, transrektale oder perineale Stanzbiopsie bzw. Feinnadelaspirationszytologie, Restharn, TRUS (oder MRT), Röntgen-Thorax in zwei Ebenen

Labor: PSA

fakultativ:

Knochenszintigramm (insb. bei PSA >10 ng/ml oder G III-Tumor), freies-PSA, Uroflow, Infusionsurogramm, Computertomographie, Zystoskopie, Oberbauch-Sonographie, C-CT (bei neurologischen Symptomen)

1.2.10. Therapie

1.2.10.1. Therapie mit kurativer Zielsetzung

1.2.10.1.1. Allgemeines

Eine korrekte Therapie führt häufig zu krankheitsfreiem Langzeit-Überleben, wenn der Primärtumor organbegrenzt war. Sogar bei klinisch auf die Prostata begrenztem Tumor entwickelt ein nicht unwesentlicher Teil der Patienten später Metastasen. Diese Tatsache kann darauf zurückgeführt werden, daß mit den derzeitigen diagnostischen Möglichkeiten oft ein "Understaging" resultiert. Mit der Entwicklung neuer Techniken, wie zum Beispiel molekularbiologische Untersuchungen, wird angestrebt, diese Unzulänglichkeiten in der Diagnostik zu kompensieren. Bei metastasierter Erkrankung besteht mit den heutigen therapeutischen Techniken keine Aussicht auf eine Heilung (215).

1.2.10.1.2. Radikale Prostatovesikulektomie

Die radikale Operation ist im Allgemeinen nur sinnvoll bei Männern in gutem Gesundheitszustand und einer Lebenserwartung > 10 -15 Jahre, die einer Operation zustimmen (35, 46, 278). Die Patienten sollten ein negatives Knochenszintigramm und ein klinisch auf die Prostata begrenztes Karzinom haben. Mit steigender PSA-Konzentration sinkt die Wahrscheinlichkeit durch eine radikale Prostatektomie dauerhafte Tumorfreiheit zu erreichen. Vor der Prostatektomie wird in der Regel eine pelvine Lymphadenektomie durchgeführt (257). Diese ist nicht als Therapiemaßnahme anzusehen, sondern dient dazu, dem Patienten die Morbidität einer radikalen Prostatektomie oder Strahlentherapie zu ersparen, falls die Lymphknoten tumorbefallen sind. Ob eine radikale Operation in diesem Falle sinnvoll ist, sollte im Rahmen kontrollierter Studien untersucht werden. Typische Komplikationen der radikalen Operation sind Inkontinenz, Impotenz, Striktur der urethralesikalen Anastomose sowie die typischen Komplikationen einer Vollnarkose und eines größeren chirurgischen Eingriffs (215).

1.2.10.1.3. Strahlentherapie

Bei Patienten für die Strahlentherapie mit kurativer Zielsetzung sollte das histopathologisch gesicherte Karzinom auf die Prostata inklusive der unmittelbaren Umgebung begrenzt sein. Ein negatives Knochenszintigramm sollte vorliegen. Eine pelvine Staging-Lymphadenektomie ist, wenn klinisch vertretbar, zu fordern, insbesondere bei klinisch

organbegrenzten Tumoren mit PSA >20 ng/ml und niedrigem Differenzierungsgrad. Bei nicht tumorbefallenen Lymphknoten wird nur die Prostata bestrahlt (215). Patienten, die aufgrund von Risikofaktoren für eine radikale Operation nicht in Frage kommen, können mit akzeptabler Nebenwirkungsrate bestrahlt werden, wenn die Bestrahlungstechnik sorgfältig gewählt wird (76). Langzeitergebnisse nach Strahlentherapie sind stadienabhängig. Auch eine interstitielle Brachytherapie mit Afterloading-Technik oder die interstitielle Implantation radioaktiver Seeds wurde in einer Reihe von Studien beim Prostatakarzinom im cT-Stadium (kinisches Tumorstadium) 2 oder 3 untersucht. Komplikationen der Strahlentherapie können eine akute, aber auch langanhaltende chronische Strahlenzystitis, Urethrastriktor, Proktitis oder Enteritis sein (212, 217).

1.2.10.2. Stadienadaptierte Behandlungsoptionen

Für die Behandlung des Prostatakarzinoms wird in der Regel ein Therapieplan aufgestellt, der sich nach dem histologisch ermittelten Stadium der Erkrankung richtet (218).

Die kurativen Behandlungsoptionen sind:

Für T_{1a}, N₀, M₀:

⇒ kontrolliertes Abwarten bei ausgewählten Patienten (*watchful waiting*) (43,66,89, 104)

⇒ Behandlung wie bei T_{1b}

Für T_{1b}, T_{1c}, N₀, M₀:

⇒ radikale Prostatovesikulektomie (35, 269)

⇒ externe Strahlentherapie (9, 77, 190, 192)

Für T₂, N₀, M₀:

⇒ radikale Prostatovesikulektomie (35, 185, 250, 269)

⇒ externe Strahlentherapie (6, 9, 77, 190, 192)

⇒ kontrolliertes Abwarten (nur bei ausgewählten Patienten)

Für T₃, N₀, M₀:

⇒ Externe Strahlentherapie

⇒ Radikale Prostatektomie (bei hochselektierten Patienten) (184)

1.2.10.3. Lymphknotenmetastasen und Fernmetastasen

Die Prognose beim Vorliegen von Lymphknotenmetastasen ist schlecht, unabhängig davon, welche Behandlungsmethode gewählt wird. Nur selten gibt es in diesem Erkrankungsstadium nach radikaler Operation (79,225) oder nach externer Strahlentherapie (137) Langzeit-Überlebende. Hier ist die (palliative) androgenablativ Therapie angezeigt, wobei ungeklärt ist, ob ein sofortiger oder verzögerter Therapiebeginn vorteilhafter ist. Einige Arbeiten unterstützen das Konzept, auch beim Vorliegen von Lymphknotenmetastasen, aus präventiv-palliativer Indikation eine radikale Prostatektomie durchzuführen (79, 225), andere Arbeiten sprechen dagegen (38, 216). Da keine kurative, sondern lediglich eine palliative Indikation gegeben ist, muß besonders großer Wert darauf gelegt werden, daß die Langzeit- und Spät komplikationen möglichst gering sind. Die endokrine Therapieoption wird allgemein als adjuvante Therapie nach radikaler Prostatektomie empfohlen (150). Bei Vorliegen von Fernmetastasen führt die endokrine Therapie sehr selten, falls überhaupt, zu einer Heilung, aber bei der Mehrzahl der Patienten zu einer Rückbildung der Symptome. Orchiektomie und GnRH-Agonisten sind gleichwertig bezüglich Wirkungen und Nebenwirkungen (124, 182, 186, 247).

Die primäre Chemotherapie ist in der Regel nicht indiziert, da ein Überlebensvorteil bisher nicht gezeigt werden konnte (59, 61, 62, 92). Sie kommt in der Regel beim Rezidiv des endokrin behandelten Prostatakarzinoms zum Einsatz (261). Die niedrig dosierte Gabe von Prednison hat einen palliativen Effekt mit Linderung der Symptome bei etwa einem Drittel der Patienten (79).

1.2.11. Prognose

Bei einem mittleren Diagnosealter von etwa 72 Jahren und oft sehr langsamem Tumorstadium sterben viele Patienten an anderen Ursachen, ohne daß ihre Lebensqualität je durch das Prostatakarzinom beeinträchtigt worden wäre. Die Wahl der Therapie muß daher stark von der Lebenserwartung des Patienten, unter Berücksichtigung des Lebensalters und insbesondere der Komorbidität, aber auch von der Aggressivität des Tumors abhängig gemacht werden. Die Überlebenszeit ist abhängig von der Ausdehnung des Tumors und vom Differenzierungsgrad. Ein auf die Prostata begrenztes Karzinom ist oft heilbar und ein medianes Überleben von mehr als 10 Jahren ist die Regel. Ein kontrolliertes Abwarten kommt nur in Frage, wenn ein kleiner, gut differenzierter Tu-

mor vorliegt, und die Lebenserwartung des Patienten nicht höher ist als 10 Jahre. Unter diesen Umständen ist mit der Entwicklung von Metastasen bei 10 - 30 % und in einigen Fällen auch mit einem tumorbedingten Tod zu rechnen. Patienten mit lokoregionär fortgeschrittenem Tumor, insbesondere mit pelvinen Lymphknotenmetastasen, sind in der Regel nicht heilbar und ein wesentlicher Teil dieser Patienten stirbt tumorbedingt. Das mediane Überleben kann jedoch trotzdem im Bereich von 5 Jahren liegen. Bei Fernmetastasierung ist eine Heilung mit den heutigen Therapieformen nicht möglich. Das mediane Überleben liegt bei ein bis drei Jahren und die meisten Patienten sterben am Tumor, aber auch hier kommen langjährige Verläufe ohne wesentlich beeinträchtigte Lebensqualität vor (215).

1.2.12. Nachsorge

Aufgrund des langsamen Wachstums des Prostatakarzinoms ist häufig ein halbjähriges Nachsorgeintervall ausreichend. Beim G III-Karzinom sollte in den ersten zwei Jahren eine vierteljährliche Nachsorge erfolgen. Weitergehende Untersuchungen durch bildgebende Verfahren (Szintigraphie, Thorax-Röntgen, C-CT u.a.) und Laborwerte (außer PSA) werden einerseits von der Symptomatik des Patienten abhängig gemacht, andererseits vom Verhalten des PSA-Spiegels. Rezidive nach radikaler Prostatektomie sind in über 95 % von einem PSA-Anstieg begleitet (173).

1.3. Molekulare Grundlagen von Tumorerkrankungen

Mutationen bewirkende Schädigungen und Veränderungen der genetischen Information in Zellen gelten nach heutigem Wissenstand als Hauptfaktor für die Kanzerogenese (2). Mutationen ereignen sich in lebenden Organismen jeden Tag und müssen nicht zwangsläufig zur Entartung von Zellen führen, da sie durch sensitive Reparatursysteme korrigiert werden können. Jedoch nimmt die Wahrscheinlichkeit der Tumorgenese mit der Häufigkeit der manifestierten Mutationen deutlich zu. Während einzelne Krebsformen bekannt sind, bei denen schon eine Mutation ausreicht um zum Ausbruch einer Erkrankung zu führen (*“one hit tumours“* Beispiel: Chronisch lymphatische Leukämie durch Translokation zwischen den Chromosomen 9 und 22 = Philadelphiachromosom (120)), treten die meisten Krebserkrankungen eher nach zwei oder mehreren Mutationen auf (120). Schon vor 30 Jahren beschrieb A. Knudson am Beispiel des Retinoblastoms in

seiner "two-hit-Hypothese", daß zwei genetische Ereignisse im Rb-Gen nötig sind, um zur klinischen Manifestation dieses bösartigen Tumors zu führen. Bei der hereditären Form ist der erste "hit" schon genetisch vererbt worden, der zweite erfolgt im Laufe des Lebens auf somatischer Ebene. Bei der nichtvererbten, "sporadischen" Form, ereignen sich beide "hits" auf somatischer Ebene. Dies erklärt auch, daß bei der hereditären Form die Erkrankung bilateral und früher auftritt, die sporadische Form jedoch in der Regel einseitig und deutlich später manifest wird. Die nähere Untersuchung dieser veränderten Gene zeigte, daß der zweite somatische "hit" bei beiden Erkrankungsformen durch verschiedenste chromosomale Veränderungen wie Deletion, mitotische Rekombination und nicht-disjunktionale Chromosomenverluste zu einem Heterozygotieverlust (LOH/ *loss of heterozygosity*) in verschiedenen Allelen des Chromosoms einschließlich der Retinoblastomregion führte. LOH's wurden nachfolgend in vielen Chromosomen häufiger, bösartiger Tumoren gefunden. (50). Nicht vererbte, somatische Mutationen können durch verschiedenste Faktoren ausgelöst werden (s.o.). Schädigung der DNA stellt sich als Punktmutation in Form von Transition und Transversion, oder als Insertion, Deletion, Substitution oder Translokation von DNA-Fragmenten dar. Besonders häufig treten Mutationen während der Replikationsphase des Zellzyklus auf (44). Diese werden normalerweise durch ein sehr sensitives Reparatursystem korrigiert. Wird das DNA-Reparatursystem durch eine der oben genannten Noxen gestört, kann es zur Akkumulation von Mutationen und somit zu Störungen in bestimmten Gensequenzen kommen. Sind Sequenzen betroffen, die für Proteine kodieren, die ihrerseits Kontrollmechanismen der Zelle darstellen, kann dies zur Entstehung einer Neoplasie bzw. Krebs führen (44). Die Entdeckung von Mutationen auf bestimmten Genabschnitten die zur genetischen Instabilität führen und somit Bedeutung für die Entstehung von Krebs haben, haben sich in den letzten Jahren zu einem der wichtigsten Forschungsansätze in der molekularen Krebsdiagnostik entwickelt (50). Untersuchungen von genetischen Defekten oder Genexpressionen und die Verbindung beider mit histo- und klinikopathologischen Parametern ermöglicht genauere Aussagen über bestimmte Krebsarten, möglicherweise sogar deren Korrelation mit bestimmten genetischen Alterationen (50).

Als bedeutsam für die Tumorgenese haben sich Störungen bei drei speziellen Gruppen von Genen als besonders relevant herausgestellt (260):

1. **Onkogene** sind Gene, die die Fähigkeit besitzen, unter bestimmten Voraussetzungen mittels ihrer Genprodukte (Proteine) eine primär nicht tumorigen veränderte Zelle in eine tumorigene Zelle umzuwandeln. Protoonkogene sind Bestandteil des Genoms und können nach Aktivierung zum Onkogen fatale Wirkungen entfalten. Die Aktivierung vom Protoonkogen zu Onkogen erfolgt ausgelöst durch endo- oder exogene Faktoren. Die Genprodukte der Onkogene (Onkoproteine) beeinflussen Mechanismen zur DNA-Replikation, -Transkription und DNA-Reparatur, außerdem arbeiten sie als Transkriptionsfaktoren, sind an der Zellproliferation und an der Apoptose von Zellen beteiligt. Sie können an unterschiedlichen Stellen der streng kontrollierten Kaskade der zellulären Signalübermittlung eingreifen. Durch Störung der intra- und interzellulären Kommunikation und Signaltransduktion, in welche Komponenten wie Wachstumsfaktoren, Wachstumsfaktorrezeptoren, Transkriptionsfaktoren und Tumorsuppressorproteine eingebunden sind, können sie ein mitogenes Signal auslösen. Durch Mißbrauch des eigenen Kommunikationsapparates kann so durch Onkogene eine nicht neoplastische Zelle in eine tumorigene Zelle überführt werden, und in Folge im Zustand des unkontrollierten Wachstums gehalten werden. Bekannte Proto/-Onkogene sind beispielsweise bcl-1, bcl-2, bcr, int-1, int-2, abl, erb-A, erb-B, fos, c-myc, ras und sis. Angriffspunkte und Wirksamkeit der Onkoproteine sind Wachstumsfaktoren (sis), Wachstumsfaktorrezeptoren (EGFR, c-erbB-2), Signalübermittler (bcr-abl, ras-G-Protein) und Transkriptionsfaktoren (myc). Diesen Proteinen gemeinsam ist, daß sie über eine Tyrosin-Kinase-Aktivität zur Deregulierung des Zellzyklus und damit zur Transformation nicht neoplastischer Zellen in immortalisierte tumorigene Zellen führen. In Abhängigkeit vom betroffenen Gewebe können so die verschiedensten Tumore entstehen.
2. **Tumorsuppressorgene** wie pRb, p53, PTEN, WT1, APC, NF1 und andere sind bekannte Regulatorproteine des Zellzyklus. Sie sind beteiligt an der Kontrolle von Zellproliferation und Zelldifferenzierung und können diese Vorgänge bremsen. Sie reagieren auf DNA-Schäden und können Reparaturmechanismen in Gang setzen, bei irreparablen Schäden können sie die Apoptose einleiten. Zusätzlich übernehmen einige von ihnen wichtige Aufgaben bei der Organisation des Zytoske-

letts und im Bereich der Zelladhäsion. Zum Funktionsverlust führende Inaktivierung durch Schädigung entweder auf genetischer Ebene als LOH (verursacht durch Substitution, Deletion, Insertion oder Translokation), oder auf Proteinebene durch Komplexbildung mit exogenen (z.B. viralen) oder endogenen (zelleigenen) Onkoproteinen, auf Gen- oder Proteinebene führt zum Verlust dieser Funktionen. Somit wird eine unkontrollierte Proliferation geschädigter Zellen begünstigt. Beispiele für humane Neoplasien, die bei Schädigung von Tumorsuppressorgenen bevorzugt vorkommen, sind maligne Tumoren von Prostata, Harnblase, Magen, Dickdarm, Leber, Lunge, Ovar und Mamma sowie spezielle Tumoren wie das Retinoblastom, der Wilms-Tumor oder das Neurofibrom.

3. **Mutatorgene** wie MSH 2 und MLH 1 sind beteiligt an DNA-Reparatur und DNA-Replikation. Der Verlust eines der Gene auf einem Allel führt zum Verlust des funktionfähigen Proteins. Somit kann DNA-Reparatur nicht mehr stattfinden. Mutatorgene sind somit indirekt an der Tumorgenese beteiligt, da der Defekt die Mutationsrate anderer (Onkogene, Tumorsuppressorgene) steigert. Beobachtet wurde dies zum Beispiel in der Mehrzahl der Fälle beim hereditären nicht polypösen Kolonkarzinom (HNPCC/*hereditary non-polyposis colon cancer*) (119).

1.4. Molekulare Genetik von Prostatatumoren

Auch für die Entstehung und Progression von Prostatatumoren sind die im vorigen Abschnitt ausführlich beschriebenen Alterationen bestimmter Gene ursächlich verantwortlich.

Daher soll in diesem Abschnitt noch einmal speziell darauf eingegangen werden.

Durch viele Studien konnte gezeigt werden, daß genetische Instabilität sowohl als chromosomale Instabilität (z. B. Aneuploidie, Deletion oder Amplifikation) als auch Mikrosatelliteninstabilität mit der Entstehung von Prostatakarzinomen assoziiert ist.

Auch hier sind Akkumulationen von genetischen Veränderungen in Tumorsuppressorgenen, Proto-Onkogenen und Mutatorgenen als ursächliche Faktoren der Kanzerogenese zu sehen.

Von den schon beschriebenen Mismatch-Repair-Genen (MMR-Gene) ist für das Prostatakarzinom speziell der Defekt des MSH2-MMR-Gens von Bedeutung. Bekannte in-

aktivierte Tumorsuppressorgene, die besonders in Prostatakarzinomen detektiert wurden, sind unter anderem p53, PTEN, und Rb1. Unter den Onkogenen scheinen insbesondere Veränderungen von c-MYC, c-ErbB2, bcl-2 und Ras bedeutsam zu sein.

Veränderungen dieser, für die normale Zellfunktion und das normale Zellwachstum verantwortlichen Gene, führen zum Funktionsverlust bzw. zur Aktivierung, und können durch Mutation, Überexpression, Amplifikation, Deletion oder Rearrangement verursacht sein.

Als äußere Einflußgrößen, die genetische Instabilität bewirken und somit zur Dysregulation der bedeutsamen Gene führen können, gelten neben dem Lebensalter und der familiären Disposition auch Steroidhormone, die Ernährungsgewohnheiten und Umwelteinflüsse (115).

Eine weitere wichtige Rolle bei der Entstehung und der Progression von Prostatatumoren wird dem, auf dem X-Chromosom gelegenen, Androgenrezeptor (AR) in den betroffenen Zellen zugewiesen. Es ist bekannt, daß Mutationen oder Amplifikationen besonders im Bereich des Exons 1 zu Veränderungen führen, die die zunächst androgenabhängigen Zellen von der Androgenversorgung unabhängig machen. Entkopplung von der androgen gesteuerten Wachstums- und Apoptosekontrolle kann zur unkontrollierten Progression und auch zur Metastasierung führen. Zudem scheint bewiesen, daß die Variation der Transkriptionsaktivität des Androgenrezeptors, verursacht durch polymorphe CAG-repeats, einen Einfluß auf das Prostatakrebsrisiko besitzt. Dabei scheinen kurze CAG-repeat-Längen ein deutlich höheres Prostatakarzinom-Risiko in sich zu bergen. Auch eine erhöhte Aggressivität des Karzinoms (hohes Grading, erhöhtes Metastasierungspotential) wird dieser genetischen Besonderheit zugeschrieben. Zudem reguliert der Androgenrezeptor durch Bindung an androgenspezifische Elemente auch die Gentranskription bestimmter Zielgene wie z.B. des PSA. Sowohl der polymorphe AR als auch das, durch die Bindung an diesen, veränderte PSA stehen in Assoziation zu fortgeschrittenem Tumorstadium (90).

Schließlich konnte zudem beobachtet werden, daß in vielen Fällen unter Akkumulation von genetischen Alterationen ein Wechsel von primär androgenabhängigem in androgenresistentes Tumorgewebe erfolgte (115).

1.5. LOH und Mikrosatellitenanalyse

Die häufigste, in der Tumorgenese vorkommende Aberration ist der Verlust bzw. die Amplifikation eines Allels oder Teilen dieses Allels, die zum Verlust der Heterozygotie (*loss of heterozyosity* / LOH) und so zur Allelimbalanz (*allelic imbalance* / AI) führt (118).

Die zurzeit etablierteste Methode zum Nachweis von genetischen Alterationen stellt die Mikrosatellitenanalyse dar. Mikrosatelliten sind kurze repetitive DNA-Sequenzen die sich meist als Dinucleotide (in Form von CA- bzw. GT-Repeats), maximal als Hexanucleotide darstellen (188). Ihre Länge beträgt bis zu 1 kb. Sie befinden sich in nichtkodierenden Bereichen vom Genom, entweder außerhalb eines Gens, oder in dessen Intronen. Sie sind polymorph, das bedeutet, daß verschiedene Individuen eine unterschiedliche Repeatlänge aufweisen (36) (Abb.3). Ihre Nähe zu Genen die untersucht werden sollen, läßt bei Verlust der Mikrosatelliten auch auf den Verlust des benachbarten Gens schließen (116).

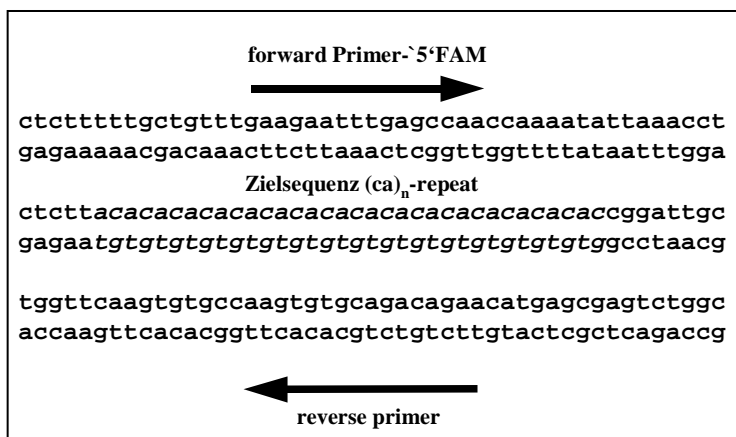


Abb.3: PCR-Schema einer Mikrosatellitenanalyse

1.6. Ziel der Arbeit

Die Untersuchung auf LOH in 10 ausgewählten Markern mittels Mikrosatellitenanalyse ist Gegenstand dieser Studie. Ausgewählt wurden Gensequenzen, die sich bei der Analyse des Prostatakarzinoms und anderer bösartiger Tumorerkrankungen in vielen Studien als starke diagnostische Marker für diese Erkrankungen herausgestellt haben. Zusätzlich sind sie auf Grund ihres hohen Heterozygotiegrades der Mikrosatellitenanalyse gut zugänglich. Das in der vorliegenden Studie untersuchte Gesamtkollektiv besteht aus 92 Patienten mit gesichertem Prostatakarzinom, die in der urologischen Klinik der WWU Münster behandelt wurden. Bei 76 Patienten wurde ein monofokaler Tumor festgestellt, 16 Patienten zeigten bifokale Tumoren.

Ziel ist es, bestimmte Marker oder Markerkombinationen ausfindig zu machen, die zusammen mit anderen kliniko-histopathologischen Untersuchungsgrößen die Erkennung, Einordnung und Prognose dieser Tumorerkrankung deutlich verbessern können. Zusätzlich zum LOH soll speziell für die bifokalen Tumoren das genetische Verhalten der beiden Einzelfoci untersucht werden. Verschiedene Studien deuten darauf hin, daß es sich bei Bifokalität nicht immer um Tumoren monoklonalen Ursprungs handelt, sondern wie z.B. für das Mammakarzinom oder den Barrett-Ösophagus bekannt (176, 240), die Möglichkeit des Vorhandenseins zweier unterschiedlicher Primärtumoren besteht. Andererseits könnten sich durch unterschiedliche Differenzierung eines Tumors, genetisch unterschiedliche Tumorfoci entwickelt haben. Die Kenntnis hierüber könnte in Zukunft für die Auswahl der angestrebten Therapie von großer Bedeutung sein.

2. Patienten, Material und Methoden

2.1. Patienten und Probenmaterial

Im Rahmen dieser Studie wurden 92 Patienten im Alter zwischen 49 und 78 Jahren mit gesichertem Prostatakarzinom untersucht. Die Einwilligungen zur Studienteilnahme aller Patienten lagen dem behandelnden Arzt vor. Nach eingehender Anamnese und Diagnostik wurde bei allen diesen Patienten eine operative radikale Prostatektomie durchgeführt. Alle in dieser Studie ausgewerteten klinischen Daten wurden prospektiv erhoben. Die histopathologischen Daten wurden durch Frau Dr. med. Elke Elze und Herrn Dr. med. Olaf Bettendorf vom Gerhard-Domagk- Institut für Pathologie der WWU Münster unter Leitung von Herrn Prof. Dr. med. Werner Böcker ermittelt, und freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

Das in dieser Arbeit verwendete Probenmaterial (Blutproben und Gewebeproben aus gesicherten Prostata-Karzinomen, vor radikaler Prostatektomie) wurde den Patienten während ihres stationären Aufenthaltes in der Universitätsklinik Münster entnommen. Die Blutproben (EDTA-antikoguliertes Vollblut) wurden präoperativ asserviert. Nach der Entnahme wurden die Blutproben entweder ohne weitere Bearbeitung bei -20°C gelagert, oder im Rahmen anderer Studien einer Dichtegradientenzentrifugation unterzogen, um im Blut befindliche Tumorzellen auf MACS-Säulen isolieren zu können. Die hierbei anfallenden Leukozytenkonzentrate wurden, genau so wie der *Buffy-Coat* aus direkt nach der Entnahme zentrifugiertem Blut, zur DNA-Isolierung verwendet. Die aus den drei verschiedenen Blutpräparaten gewonnenen DNA-Lösungen wiesen ähnlich hohe Konzentrationen und Reinheiten auf, so daß sie äquivalent in der PCR eingesetzt werden konnten. Die Gewebeproben wurden zunächst routinemäßig in der Pathologie aufgearbeitet und anschließend histologisch untersucht. Nach Abschluß der histopathologischen Untersuchung wurden die Proben in Form von Paraffinschnitten zur weiteren Verarbeitung im Rahmen dieser Arbeit von Frau Dr. med. Elke Elze zur Verfügung gestellt. Die folgenden klinischen Patientendaten wurden erfaßt: Alter zum Zeitpunkt der Operation, das klinische Tumorstadium, Angaben zur Metastasenbildung und zum Lymphknotenbefall, zum PSA-Verlauf sowie zur Überlebenszeit der Patienten und zum Auftreten von PCa bei Blutsverwandten. Zusätzlich wurden von Frau Dr. med. Elke Elze die histopathologischen Daten der Patienten bezüglich des TNM-Systems, histolo-

gischem Grading, Tumolvolumen, Befall der Schnittländer und Grad der Kapselinfiltration und -penetration zur Verfügung gestellt. Für 76 Patienten wurde im Rahmen der histopathologischen Untersuchung ein monofokales Tumorgeschehen diagnostiziert; 16 Patienten zeigten einen bifokalen Tumor bestehend aus zwei unterschiedlichen Foci. Daher wurden in dieser Studie diese beiden Subkollektive sowohl einzeln als auch im Vergleich miteinander untersucht.

2.2. DNA-Isolierung

2.2.1. DNA-Isolierung aus Blut

Die DNA, die im Rahmen der Mikrosatelliten-PCR als Referenzprobe zum Vergleich von Blut- und Tumorgewebe dienen soll, wurde aus Leukozyten der zur Verfügung stehenden Blutpräparate (EDTA-antikoaguliertes Vollblut, *Buffy-Coat*, Leukozytenkonzentrat) isoliert.

Die Isolation erfolgte unter Zuhilfenahme des "QIAamp Blood Kit" (QIAGEN[®], Hilden). Das Prinzip des Kit basiert auf der enzymatischen Lyse der proteinhaltigen Blutbestandteile durch den Einsatz einer Protease und eines AL-Lysis-Puffers. Die so gewonnene DNA wird mittels 70 % Ethanol gefällt, und auf eine, mit Silikatfilter ausgestattete, Säule gegeben. Durch jeweils einmaliges Waschen mit AW1- und AW2- Puffer wird die DNA aufgereinigt und anschließend mit dem Elutionspuffer AE von der Säule eluiert.

Reagentien:

Bestandteile des "QIAamp Blood Kit":

Puffer AL

Puffer AW1

Puffer AW2

Puffer AE

Protease

QIAamp Spin Columns

Firma ROTH[®], Karlsruhe:

99,6% Ethanol

Zentrifuge (Sigma[®] 101 M, Rotor mit 12 Plätzen für 1,5 und 2 ml Eppendorfgefäße)

Durchführung:

Zunächst wurden jeweils 200 µl Blutpräparat in ein 1,5 ml fassendes Eppendorfgesäß pipettiert und mit je 200 µl AL-Puffer und 25 µl Protease versetzt. Dieses Gemisch wurde gevortext und für 10 Minuten bei 70°C im Heizblock inkubiert. Anschließend erfolgte die Zugabe von 200 µl Ethanol zur DNA-Fällung und erneutes Vortexen. Diese Lösung wurde auf QIAamp *Spin Columns* gegeben, die in 2ml QIAamp *Collection tubes* eingesenkt waren, und für 1 Minute bei 8000 rpm abzentrifugiert. *Collection tubes* und der Inhalt wurden verworfen, die Nucleinsäuren auf der Membran der *Spin columns* mehreren Waschschritten unterzogen. Nach jeweiliger Abzentrifugation der Waschpuffer wurde die DNA mit dem auf 70°C erwärmten AE-Puffer eluiert. Die Erstellung der ersten Elution erfolgte durch Zugabe von 100 µl Elutionspuffer auf die Säule und anschließendem zentrifugieren für 1 Minute bei 8000 rpm in ein 1,5 ml Eppendorfgesäß. Abschließend erfolgte die zweite Elution durch Zugabe von 50 µl AE-Puffer und nachfolgender Zentrifugation für wiederum 1 Minute bei 8000 rpm. Die DNA-Konzentration beider Elutionen wurde photometrisch bestimmt.

2.2.2. DNA-Isolierung aus Tumorgewebe

Die Isolierung der DNA aus Tumorgewebe erfolgte mit Hilfe des "QIAamp Tissue Kit" (QIAGEN[®], Hilden). Da die Gewebeproben im Rahmen der histologischen Aufarbeitung in Paraffinblöcke eingebettet wurden, mußte das Gewebe zunächst mittels Xylol aus dem Paraffin gelöst werden. Nach Entfernung der Xylolreste durch Ethanol konnte dann das Gewebe der DNA-Isolation zugeführt werden.

Reagentien:

Bestandteile des "QIAamp Tissue Kit":

Puffer ATL	Proteinase K
Puffer A1	Firma ROTH [®] , Karlsruhe:
Puffer AW1	Xylol, reinst
Puffer AW2	99,6% Ethanol
Puffer AE	

Zentrifuge (Sigma[®] 101 M, Rotor mit 12 Plätzen für 1,5 und 2 ml Eppendorfgesäße)

Zunächst wurden zu den in Eppendorfgefäßen befindlichen 5-10 je 10 µm dicken Parafinschnitten jeweils 1200 µl Xylol zugegeben. Nach anschließendem Vortexen wurden die Proben für 30 Minuten bei 70°C in den Heizblock gestellt. Danach wurde 5 Minuten bei 15.000 rpm zentrifugiert und der Überstand verworfen. Nach erneuter Zugabe von 1200 µl Xylol wurden die Proben über Nacht bei 70°C in einem Heizblock inkubiert. Nachfolgend wurde erneut zentrifugiert (5 Minuten bei 15.000 rpm), der Überstand wiederum verworfen, und nochmals 1200 µl Xylol zugegeben. Nach einer Inkubationszeit von weiteren 60 Minuten bei 70°C wurde den Gewebepellets, nach Entfernung des Xylols, je 1200 µl Ethanol zugegeben und gevortext. Nach 5-minütiger Zentrifugation und Entfernung des überstehenden Ethanols schloss sich eine Wiederholung dieses letzten Schrittes an. Die so von Xylolresten gereinigten Proben wurden für einige Minuten zum Trocknen bei 70°C in den Heizblock gestellt, um eventuell verbliebene Ethanolreste aus dem Gewebe zu eliminieren. Anschließend erfolgte die Zugabe von 180 µl ATL-Puffer und, abhängig von der Gewebemenge, zusätzlich 20 µl bis 40 µl Proteinase K. Nach gründlichem Vortexen folgte die Inkubation der Proben über Nacht bei 55°C. Im nächsten Schritt wurde eventuell noch vorhandenes Restgewebe mit einem Mikropistill homogenisiert und erneut 20 µl Proteinase K zugesetzt. Es wurde wiederum gevortext und bei entsprechenden Bedingungen wie vorher inkubiert, bis keine Zellreste in der Lösung mehr erkennbar waren. Nun erfolgte die Zugabe von 200 µl AL-Puffer, es wurde gevortext und 10 Minuten bei 70°C inkubiert, um letzte Zellreste zu lysieren. Um die DNA zu fällen wurden anschließend 210 µl Ethanol zupipettiert.

Nach kurzem Vortexen wurde das Gemisch auf die Silikatsäule gegeben und die Lösung bei 8000 rpm für 1 Minute zentrifugiert und anschließend die *Collection tubes* gewechselt. Nach Durchführung mehrerer Waschschriffe erfolgte eine anschließende Leerzentrifugation die für die gründliche Entfernung der Waschpuffer aus der Säule sorgte. Zur Lösung der DNA aus der Säule wurde 100µl vorgewärmter AE- Puffer auf die Säule gegeben und dann in ein Eppendorfgefäß zentrifugiert. Auf die gleiche Weise wurde die zweite DNA-Elution unter Verwendung von 50 µl AE- Puffer durchgeführt.

2.3. Photometrische Messung zur Bestimmung der DNA-Konzentration

Aus den, bei den DNA-Isolationen gewonnenen Elutionen wurden Verdünnungen von 1:100 hergestellt und zur Ermittlung des DNA-Gehaltes und der Reinheit eine photometrische Bestimmung (157) der optischen Dichten bei 260 nm, 280 nm und 320 nm durchgeführt. Nach der Messung wurden die Verdünnungen verworfen und aus den ermittelten Absorbtionswerten die entsprechenden DNA-Konzentrationen berechnet. Diese Berechnung erfolgte mittels der Formel nach Warburg und Christian (252).

Konzentrationsbestimmung :

$$\text{cDNA (in ng/}\mu\text{l)} = 62,9 \times (A_{260} - A_{320}) - 36,0 \times (A_{280} - A_{320})$$

cDNA = DNA-Konzentration

A = Absorbtionswerte der verschiedenen Wellenlängen

Die Reinheit der DNA-Lösung gibt der Quotient der Absorbtion bei 260 nm und 280 nm an. Die Berechnung der Reinheit folgt der von Kalb und Bernlohr erstellten Formel (114).

$$Q = (A_{260} - A_{280}) / (A_{260} - A_{280})$$

Q = Reinheit der Lösung

A = Absorbtion bei verschiedenen Wellenlängen

Tab.3: Wellenlängen zur Untersuchung von DNA (λ = Wellenlänge)

λ	Nachweis von:
260 nm	Absorbptionsmaximum von Nukleinsäuren
280 nm	Aromaten (Nachweis phenolischer Substanzen) Aromatische Aminosäuren von Proteinen und Peptiden (Tyrosin und Tryptophan)
320 nm	Bei dieser Wellenlänge absorbieren weder Nukleinsäuren noch Proteine (Grundlinienabgleich)

Tab.4: Qualitätsbestimmung von Nukleinsäuren

A_{260}/A_{280}	Bedeutung:
1,7-2	Reine DNA
< 1,7	Verunreinigung mit Proteinen
> 2	Hoher RNA-Anteil oder denaturierte DNA

Eine für die DNA angemessene Reinheit konnte bei Werten von Q zwischen 1,7 und 2,0 angenommen werden (159). Bei Werten von $Q > 2,0$ besteht in der Regel eine Verunreinigungen durch RNA, bei Werten von $Q < 1,7$ Verunreinigungen durch Proteinreste. In diesem Fall wurde eine erneute DNA-Isolierung der entsprechenden Probe durchgeführt.

Aus den in den Elutionen gewonnenen reinen DNA-Proben wurden Verdünnungen mit einer Konzentration von 10 ng/ μ l hergestellt, so daß die als PCR-Template benötigte DNA-Menge von 50 ng DNA in einem gut pipettierbaren Volumen enthalten waren. Die Eluate sowie die für die PCR hergestellten Verdünnungen wurden bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

2.4. Mikrosatellitenanalyse

Die Mikrosatellitenanalyse dient dem Nachweis von genetischen Alterationen. Mikrosatelliten sind kurze repetitive DNA-Sequenzen die sich meist als Dinukleotide (in Form von CA- bzw. GT-Repeats), maximal als Hexanukleotide darstellen (36, 268). Diese Sequenzen lassen sich mit Hilfe der Mikrosatelliten-PCR (58) amplifizieren, so daß bei heterozygoten Merkmalsträgern zwei unterschiedlich lange Allele gut darstellbar sind. Durch eine geeignete Methode wie z.B. die Kapillarelektrophorese erfolgt dann eine Größenauftrennung der Allele entsprechend ihrer Länge. Genveränderungen z.B. in Form von LOHs können anschließend berechnet und graphisch dargestellt werden. Die LOH-Berechnung erfolgte nach einer von Bürger *et al.* 2001 (28) entwickelten Formel, die eine modifizierte Form der von Canzian *et al.* 1996 (31) erstellten Formel zur Berechnung von LOH-Scores darstellt. In die Berechnungen gehen die Berechnung der graphisch dargestellten Peakflächen der Allele sowie deren Verhältnis zueinander ein. Homozygote Merkmalsträger sind aufgrund gleicher Allellängen nicht darstellbar und somit für die Auswertung einer Mikrosatellitenanalyse nicht informativ.

LOH Berechnung:

Die Standardabweichung (SD) beträgt nach dieser Berechnung als Quotient der Peakflächen der Allele (a_1/a_2) 7%.

Die Kritische Distanz (dc) wird über die Formel:

$$dc = 2 \times \sqrt{2 \times SD}$$

berechnet. Die Begrenzungen für einen LOH werden für Verlust des längeren Allels mit $1-dc$, und für Verlust des kürzeren Allels mit $1/(1-dc)$ berechnet. Somit liegt der gültige Wert für LOH bei 0.79 (ermittelt für das längere Allel) bzw. 1.27 (ermittelt für das kürzere Allel).

Aufgrund dieser Berechnungen konnte ein Mikrosatellit als positiv bezüglich LOH angesehen werden, wenn der LOH-Score >1.27 oder <0.79 betrug.

2.5. Methoden zur Entdeckung von genetischen Alterationen

Zur Untersuchung genetischer Alterationen wurden verschiedenste Techniken entwickelt. Neben anderen werden CGH (*Comparative Genomic Hybridization*), FISH (Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung), Southern blotting und die Polymerasekettenreaktion (PCR) am häufigsten angewendet (249). Mittlerweile ist die PCR die gebräuchlichste Technik, da sie in unterschiedlichsten Variationen anzuwenden ist, und eine automatisierbare Analysemethode darstellt, die eine schnelle und sensitive DNA-Analyse ermöglicht.

2.5.1. Polymerase-Kettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) und Multiplex-PCR

Die PCR ist eine Methode zur *in vitro*-Amplifikation von DNA-Fragmenten. Sie lehnt sich an die *in vivo* ablaufenden Prinzipien der enzymatischen DNA-Replikation während des Zellzyklus an, und wurde an Laborbedingungen adaptiert. Der Amplifikationsvorgang ist in drei Reaktionsschritte gegliedert, deren Ablauf allein durch eine Temperaturänderung bestimmt wird. Diese Reaktionsschritte werden zyklisch wiederholt.

Die Auswahl der Reagentien (Nukleotide, Primer, Polymerase) erlaubt die vielfache Wiederholung der Zyklen, ohne eine Änderung des Mediums oder einen Wechsel der Reagentienkonzentrationen vorzunehmen.

Die Methodik der PCR, schon im Jahre 1971 von Kleppe *et al.* (119) beschrieben, wurden im Jahre 1985 von Kary B. Mullis weiterentwickelt (168), und 1989 von der Firma Cetus etabliert. Nach der Erstveröffentlichung durch Saiki *et al.* 1985 (207) entwickelte sich dieses Verfahren zur selektiven *in vitro* Amplifikation von DNA-Sequenzen schnell zu einer Routinemethode in der Molekularbiologie. Die PCR erfordert die Synthese von zwei kurzen (ca. 18-23 bp) einzelsträngigen Oligonukleotiden (*Primern*), die zum Anfang und Ende des gewünschten DNA-Bereichs antiparallel komplementär sind. Nach Denaturierung der doppelsträngigen DNA hybridisieren diese Oligonukleotide mit der zu amplifizierenden DNA-Sequenz und dienen einer thermostabilen DNA-Polymerase (z. B. *Taq*-Polymerase) als Knüpfungspunkte zur spezifischen Synthese eines neuen Doppelstrangs aus entsprechenden Desoxyribonukleosidtriphosphaten (dNTP's). Dieses PCR-Produkt dient als Matritze für folgende Amplifikationszyklen. Die Temperaturstabilität der Polymerase erlaubt die zyklische Wiederholung (25-40) der Reaktionsschritte, ohne daß das Enzym zerstört wird. Auf diese Weise wird das zu amplifizierende DNA-Fragment exponentiell vermehrt.

Reaktionsschritte der PCR:

1. Denaturierung der DNA in Einzelstänge bei 94-96°C
2. Annealing der Primer (komplementäre Oligonukleotide, die spezifisch zum initialen Abschnitt des einen Strangs bzw. zum Endabschnitt des Gegenstrangs der zu amplifizierenden DNA-Sequenz sind) bei 50-68°C
3. Extension der Primer vom 3'-OH-Ende (enzymatische Reaktion durch fortlaufende Addition von dNTPs durch eine Polymerase) bei 72°C

Da in dieser Studie 10 spezielle Genorte auf genetische Instabilität in Form von LOH untersucht werden sollten, wurde die oben beschriebene PCR zu einer auf ihr basierenden Multiplex-Mikrosatelliten-PCR erweitert, bei der mehrere Primerpaare gleichzeitig

eingesetzt werden um so gleichzeitig unterschiedliche DNA-Fragmente amplifizieren zu können.

Insgesamt wurden in Vorarbeit 82 verschiedene aus der Literatur (bzw. Genbanken) bekannte CA_n-repeats enthaltene Genloci ermittelt und in die nähere Auswahl genommen (Literaturarbeit durch Herrn Dr. rer. nat. H. Schmidt). Davon wurden in einem primären Screening 10 verschiedene PCR-Primer, zunächst einzeln und anschließend in variierenden Kombinationen getestet (s. Tabellen 5 u. 6).

2.6. Primerauswahl (Zielsequenz)

Entscheidend für die Gestaltung einer Multiplex-PCR ist die Auswahl der Primer, die einerseits eine annähernd gleiche Annealingtemperatur aufweisen müssen, andererseits alle in gleichem Maße angelagert werden sollten um eine ausgewogene Amplifikation aller ausgewählten Sequenzen zu gewährleisten. Zusätzlich soll es auch zu keiner Primerdimerisation kommen (58).

Dabei wurden folgende Primerauswahlkriterien (in Bezug auf die Zielsequenz) berücksichtigt:

Falls bekannt, sollten sie mit einer Funktion assoziiert sein (z.B. Tumorsuppressorgen, Proto-/Onkogen etc.). Der Heterozygotiegrad sollte möglichst hoch sein, da dies einen hohen Informationsgehalt in sich birgt, währenddessen homozygote Merkmale in dieser Weise nicht verwertbar sind. Zusätzlich sollte bei ihnen eine hohe Alterationsfrequenz (hier hohe Häufigkeit an LOHs) bekannt sein. Bei der PCR sollten die Primer nicht untereinander interagieren um optimale etwa gleich hohe Amplifikationen aller zu untersuchenden Marker zu erreichen. Die Amplifikationsmuster sollten zueinander passen, damit sich bei der Analyse (Kapillarelektrophorese) keine Überlagerungen ergeben. Da partielle Überschneidungen durchaus möglich sind sollte dann zur Unterscheidung eine andere Farbstoffmarkierung gewählt werden. Zudem wurde nach Zielsequenzen möglichst vieler Chromosomen, die mit Krebsentstehung und LOH verbunden sind gesucht, um sie in einer Multiplex-PCR zu vereinigen.

Um bei der Kapillarelektrophorese störende Überschneidungen der Amplifikationsprodukte (inklusive Stotterbanden) zu vermeiden, mußten darüber hinaus die die Zielsequenzen flankierenden bisher bekannten Primersequenzen versetzt und ebenfalls zunächst einzeln, später in Kombination auf ihre Amplifikationseffizienz getestet werden.

Der Grenzwert für eine noch ausreichende reproduzierbare Amplifikation eines Genbereiches liegt bei etwa 320 bp. Der optimale Bereich einer Multiplex-PCR liegt etwa bei 90 bp bis 200 bp. Dieser obere Grenzwert gilt insbesondere für DNA, die aus formolfixierten, ehemals in Paraffin eingebetteten Gewebematerial isoliert wurde. Derartig behandelte DNA enthält einen relativ hohen Anteil degradiertes DNA und ist relativ kurz-kettig. Dieser Umstand führt dazu, daß in einer Multiplex-PCR nur eine begrenzte Anzahl an Zielsequenzen untersucht werden kann. In Tabelle 5 sind die 10 Mikrosatellitenmarker aufgeführt, die für die in dieser Arbeit durchgeführte Mikrosatellitenanalyse ausgewählt wurden.

Tab.5: Untersuchte Mikrosatelliten (HZG = Literaturwert für den Heterozygotiegrad bei PCa; LOH (%) = Literaturwert für LOH bei PCa in Prozent; Lokalisation = chromosomale Lokalisation im humanen Genom)

Primerlocus	Lokalisation	HZG (%)	LOH (%)	Literatur
D7S522 (caveolin 1+2) (MET)	7q31.1	0,67	13-31,3 %	Takahashi et al. (1995) Zenklusen et al. (1994)
D8S258	8p22	0,71	8,1-24,1 %	MacGrogan et al. (1994) Takahashi et al. (1995) Vocke et al. (1996)
NEFL	8p21	0,83	16,3-35,4 %	Kagan et al. (1995) MacGrogan et al. (1994) Macoska et al. 1995) Vocke et al. (1996)
D10S541 (PTEN)	10q23	0,78	45,1%	Feilotter et al. (1998)
D13S153 (Rb1)	13q14.2	0,82	25-30%	Cooney et al. (1996) Li et al. (1998)
D16S400	16q22.2-23.1	0,62	18,8%	Osman et al. (1997)
D16S402	16q24.2	0,86	28,8%	Latil et al. (1997)
D16S422	16q24.2	0,8	42%	Elo et al. (1997)
p53	17p13.1	0,84	38%	Brewster et al. (1994)
D17S855 (BRCA1)	17q21	0,82	34,8%	Gao et al. (1995b)

2.7. Fluoreszenzmarkierungen

Vor Beginn der Studie wurden in Multiplex-PCRs verschiedene Fluoreszenzmarkierungen (FAM, JOE, ROX) kombiniert getestet, um eventuell auch etwa gleich lange DNA-Fragmente parallel in einer Kapillarelektrophorese analysieren zu können. Bisher wurden bei einer multifluorophoren Fragmentlängenbestimmung die verschiedenen Mikrosatelliten erst nach der PCR gepoolt. Dazu mußten sie zuvor mit Ethanol gefällt und gewaschen werden. Herr Dr. H. Schmidt konnte während dieser Untersuchungen hinge-

gen zeigen, daß auch eine kombinierte Fluoreszenzmarkierung in einem PCR-Ansatz möglich ist. Bewährt hat sich in der laufenden Studie der gemeinsame Einsatz der Farbstoffe FAM und JOE, die eine ähnliche Laufgeschwindigkeit und eine in etwa identische Sensitivität besitzen. Kombinierte Fluoreszenzmarkierungen mit ROX haben sich bisher nicht bewährt, da die Sensitivität dieses Farbstoffes deutlich geringer ist als bei FAM und JOE.

2.8. Primersequenzen

Die Primersequenzen sind zur Veranschaulichung in Tabelle 6 dargestellt.

Tab.6: In dieser Studie untersuchte Mikrosatelliten und die Sequenzen der verwendeten Primer.

Mikrosatelliten	Primersequenzen
D7S522 Caveolin 1+2; Met.	D7S522 A: 5' - FAM-GCA GGA CAT GAG ATG ACT GA - 3' D7S522 B: 5' - GTT ATG CCA CTC CCT CAC AC - 3'
D8S258	D8S258 A: 5' - FAM-AGC TGC CAG GAA TCA ACT GAG AG - 3' D8S258 B: 5' - GAT GCT CAC ATA AAG GAG GGA GG - 3'
NEFL	NEFL A: 5' - FAM-CCA ATA CCT GCA GTA GTG CC - 3' NEFL B : 5' - GAG CTG CTT AAC ACA TAG GG - 3'
D10S541 PTEN	D10S541 A: 5' - FAM -CAC CAC AGA CAT CTC ACA ACC - 3' D10S541 B: 5' - CCA GTC AAT AGT TCA GGG ATG - 3
D13S153 Rb1	D13S153 A: 5' - FAM-AGG GTT ATG TAT AAC CGA CTC C - 3' D13S153 B: 5' - GTC TAA GCC CTC GAG TTG TGG - 3'
D16S400	D16S400 A: 5' - FAM-GGT TCA CAA TTG GAC AGT AT - 3' D16S400 B: 5' -GAA CCC TCC ATG CTG ACA TT - 3'
D16S402	D16S402 A: 5' - FAM- GTA CCC ATG TAC CCC CAA TA - 3' D16S402 B: 5' - CAA AGC ACC ACA TAG ACT AA -3'
D17S855 BRCA1	D17S855 A: 5' - FAM- GGA TGG CCT TTT AGA AAG TGG - 3 D17S855 B: 5' - ACA CAG ACT TGT CCT ACT GCC - 3'
p53	p53CA A: 5' - FAM- AAG AAA TTC CCA CTG CCA CTC - 3' p53CA B: 5' - ATC CCC TGA GGG ATA CTA TCC - 3'
D16S422	D16S422 A: 5' -JOE- GAG AGG AAG GTG GAA ATA CA - 3' D16S422 B: 5' -GTT TAG CAG AAT GAG AAT AT - 3'

2.9. Multiplex-PCR - Durchführung

Reagentien:

1. PCR-Reaktionspuffer (Puffer II)
2. $MgCl_2$
3. Nukleotide (dNTPs)
4. AmpliTaqGold-Polymerase
5. Primer
6. H_2O

Die Reagentien 2-5 wurden von der Firma Applied Biosystems[®] (ABI), die Primer von der Firma Biometra bezogen.

Der Reaktionsansatz wurde nach dem "Mastermix"-Verfahren in ein Gefäß pipettiert. Danach wurden zuerst je 20 μl des Mastermixes in die entsprechenden PCR-Reaktionsgefäße einer PCR-Platte pipettiert und 5 μl Template-DNA, vorliegend in einer Verdünnung von 10 ng / μl , zugegeben. Das gesamte Reaktionsvolumen umfasste 25 μl . Anschließend wurde das Reaktionsgemisch mit einem Tropfen Mineralöl abgedeckt um ein Verdampfen des Ansatzes während der Reaktion zu verhindern, in einem 96-stelligen Thermocycler (GeneAmp[®] PCR System 9700, PE Applied Biosystems) der PCR-Reaktion zugeführt, und nach folgendem Schema amplifiziert:

PCR-Profil:

Schritt	Zeit	Temp.	Reaktion
1	10 min	95° C	initiale Denaturierung
2	30 sek	95° C	Denaturierung
3	30 sek	55° C	Hybridisierung
4	30 sek	72° C	Synthese
5	7 min	72° C	finale Elongation
6	∞	4° C	Kühlung, Aufbewahrung bis zur weiteren Verarbeitung

Die Schritte 2 bis 4 wurden in 40 Zyklen wiederholt.

Bisher wurden drei verschiedene Multiplex-PCRs etabliert. Die PCR mit p53 wurde allein durchgeführt, da p53 mehrfach, bisher ohne Erfolg, in Kombination mit anderen Genorten getestet wurde.

1. Multiplex PCR Nr.1: D7S522, D8S258, D16S400
2. Multiplex PCR Nr.2: D17S855, D13S153, NEFL
3. Multiplex-PCR Nr.3: D10S541D16S402, D16S422
4. PCR: Nr.4: p53

Reaktionsansatz für PCR Nr.4: p53

Reagens	Volumen pro Probenansatz(µl)
10x Puffer II	2,5
MgCl ₂ (25 mM)	2
dNTPs (1,25 mM)	1
for. Primer (10 µM)	0,48
rev. Primer (10 µM)	0,48
AmpliTaqGold (5 U/ µl)	0,25
DNA (10 ng/µl)	5
H ₂ O	ad 25

Multiplex PCR 1 und Multiplex PCR 2 wurden jeweils mit den entsprechenden drei Primerpaaren durchgeführt. Pro Probenansatz wurde hierbei mit 0,16 µl jedes Primers gearbeitet. In Multiplex PCR 3 wurde pro Probenansatz mit 0,04 µl der beiden D10S541-Primer, 0,12 µl der D16S402-Primer und 0,32µl der D16S422-Primer gearbeitet.

2.10. Kapillarelektrophorese

In der Vergangenheit kamen häufig Gel-basierende Methoden, z.B. mit anschließender Silberfärbung, zur Analyse von Mutationen zum Einsatz. Auch bei diesen Methoden konnten die entstehenden DNA-Leitern sehr gut ausgewertet werden, jedoch gestaltete sich eine Zuordnung zur exakten Fragmentlänge unter Umständen schwierig. Auch bei fluoreszenzgestützten PCR's zeigte die Signalintensitätsabschätzung häufig Ungenauig-

keiten. Die Kapillarelektrophorese ermöglicht hingegen eine genaue Zuordnung der Fragmentlängen auf ein bp genau und zudem eine präzise Berechnung der Signalintensitäten. Diese Methode zeichnet sich durch große Genauigkeit und die Möglichkeit zur Automatisierung aus.

Die mit Fluoreszenzfarbstoff markierten Amplifikationsprodukte wurden mit Hilfe des 96-Kapillarsequenzierers "ABI Prism 3700 DNA Analyzer[®]" (ABI) unter Verwendung des Polymers POP 6[®] (*Performance Optimized Polymer*) und des Genetic Analyzer Puffers[®] mit EDTA in unbeschichteten Silikonkapillaren elektrophoretisch aufgetrennt und durch einen Vier-Farben-Argonlaser ausgelesen. Die Auswertung der Elektrophoresedaten erfolgte mit der "Genescan 3,5 NT[®]" Software (ABI).

Um die fluoreszenzmarkierten DNA-Fragmente analysieren zu können, wurde 2 µl PCR-Produkt zu einer definierten Injektionslösung des Elektrophoresekalibrierungsstandards, bestehend aus 0,5 µl GenescanRox 500 und 25 µl *Aqua ad injectabilia* pro Probenansatz, auf eine Platte mit 96 wells pipettiert. Vor der Analyse erfolgte eine kurze Zentrifugation und Denaturierung der DNA (2 min. 95° C).

Nach Kalibrierung des Gerätes erfolgt der automatische Transfer der Proben durch den *Autoloader* zu den Kapillaren in der Elektrophoresekammer. Unter gerätespezifischer Spannung und definierter Injektionszeit werden nun die einzelnen Proben in je eine polymergefüllte Kapillare aufgenommen (elektrokinetische Injektion). Die einzelsträngigen DNA-Fragmente wandern nun aufgrund ihrer negativen Ladung und der angelegten Spannung in Richtung der Anode die sich am Ende der Kapillare befindet. Kurze Fragmente wandern hierbei schneller als lange Fragmente. Dort werden sie durch eine Küvette geleitet und dabei von dem Argonlaser erfaßt, der die gebundenen Farbstoffe zum Fluoreszieren anregt. Das emittierte Licht wird von einem Spektrographen aufgefangen und gemäß den emittierten Wellenlängen in ein Spektrum aufgefächert. Das Fluoreszenz-Spektrum aus jeder einzelnen Kapillare wird anschließend auf eine CCD-Kamera (*Charge Coupled Device*) fokussiert. Diese wandelt die Signale in digitale Informationen um, die im Computer durch die 3700 Data Collection Software im GeneScan 3.5 NT Programm verarbeitet werden. Hierbei wird aus den Daten ein Elektropherogramm generiert, das sich durch die Beziehung von relativer Fluoreszenz (y-Achse) und Zeit (x-Achse) für jedes einzelne Fragment darstellen läßt. Die Peakgrößen des Elektropherogramms werden nachfolgend im Auto-Analyser-Programm weiterverarbeitet, so daß

jedes Fragmentprofil bestimmt, und seine Höhe und Fläche graphisch und tabellarisch in Zahlenwerten darstellbar ist.

Die hierbei ermittelten Daten wurden in eine ExcelTM-Tabelle (Microsoft) übertragen, welche automatisch die Berechnung der Verhältnisse der Peakflächen und des LOH-Scores durchführte. Homozygote Allele sind hierbei auf Grund gleicher Länge nicht informativ.

2.11. Klinische und histopathologische Parameter

Bei allen Patienten wurde in Zusammenarbeit mit der urologischen Klinik und dem Institut für Pathologie eine Anzahl klinischer und histopathologischer Parameter bestimmt. So können anhand dieser Untersuchungsergebnisse eventuelle Unterschiede oder Gemeinsamkeiten der Patienten in Bezug auf die genetischen Parameter, die anhand der in den Kapiteln 2.4. und 2.10. beschriebenen Mikrosatellitenanalyse und Kapillarelektrophorese ermittelt wurden, ausgewertet werden.

Die Kenndaten der Patienten (Lebensalter und Körpergewicht) und bereits gut etablierte Prognoseparameter für das klinisch begrenzte PCa (Malignitätsgrad, pT-Stadium, PSA, Nodalstatus, Kapselbefund etc.) wurden ermittelt. Einige dieser Parameter werden werden im folgenden Abschnitt nochmals kurz dargestellt.

Präoperativer Palpationsbefund

Die digitale rektale Untersuchung (DRU) stellt ein wichtiges diagnostisches Kriterium zur Erkennung des PCa dar. Zusammen mit der Bestimmung des t-PSA kann es die Neuentdeckungsrate des PCa deutlich erhöhen (34). Eventuelle Übereinstimmungen zwischen Tastbefund, t-PSA-Wert und anderen histologischem Parametern sollen daher auch in dieser Studie ermittelt und ausgewertet werden.

TNM-Stadium

Zur Einteilung von Tumoren existiert ein in regelmäßigen Abständen überarbeitetes TNM-System, das für jedes Organ eine pathologisch ermittelte Stadieneinteilung bezüglich Tumorgröße und -lokalisierung (pT), regionärem Lymphknotenstatus (pN), Fernmetastasen (M) und Residualtumor (R) vorgeben, um den Tumor besser klassifizieren zu

können. Das TNM-System für das Prostatakarzinom nach UICC wurde bereits in der Einleitung Abschnitt 1.2.6. vorgestellt.

pT-Stadium

Das Stadium eines PCa's wird unter anderem durch seine Größenausdehnung und oder seine Lokalisation bestimmt. Damit verbunden sind weiterhin Aussagen über Kapselpenetration, Infiltration von umgebenden Organstrukturen z.B. Samenblasen, pelvinem Bindegewebe, Urethra, Harnblase oder Rektum. Neben der Ausbreitung *per continuitatem* sind auch die lymphogene Aussaat und die hämatogene Metastasierung für das weitere therapeutische Procedere und die Prognose von immenser Bedeutung.

Daher ist die Auswertung der Daten bezüglich pT-Stadium, Nodalstatus (N) und auch das Vorhandensein von Fernmetastasen (M) für diese Studie von besonderer Bedeutung.

Nodalstatus

Im Rahmen der TNM-Klassifikation findet auch eine Beurteilung des Lymphknotenstatus statt. Dieser Parameter ist als Zeichen der lymphogenen Aussaat zu sehen und daher für das weitere therapeutische Vorgehen und die Prognose ähnlich entscheidend wie das pT-Stadium und aus diesem Grund ebenso Gegenstand der Untersuchung in dieser Studie.

Fernmetastasen

Fernmetastasen treten als Zeichen der hämatogenen aber auch lymphogenen Metastasierung meist im fortgeschrittenen Stadium einer Krebserkrankung auf. Das Vorhandensein von Fernmetastasen hat für den Patienten Auswirkungen bezüglich der Therapie sowie für die Gesamtprognose der Erkrankung und soll daher in dieser Studie Beachtung finden.

Grading

Der Grad der Malignität (Grading) wird nach dem histomorphologischen Aufbau und dem Grad der Zellkernatypie beurteilt und in die Grade 1-3 mit entsprechenden Untergruppen unterteilt (s. Abschnitt 1.2.4.). Durch die Kenntnis der Ähnlichkeit bzw. End-

differenzierung des Tumors mit seinem Ursprungsgewebe können Aussagen über die Aggressivität und Invasivität gemacht und Therapiemaßnahmen adaptiert werden.

Gleason-Score

Der Gleason-Score ist ein weiteres häufig benutztes Grading-System. Das System nach Gleason (84) sieht eine Einteilung in 5 Grade (1-5) vor. Der aufsteigenden Reihe der Ziffern folgend nimmt der Differenzierungsgrad des vorherrschenden Tumorstyps ab. Auch der Gleason-Score korreliert mit der Prognose des Patienten und ist wie das Grading ein wichtiger zu untersuchender Parameter.

Histologischer Kapselbefund

Da das Prostatakarzinom überwiegend im peripheren Bereich des Drüsenkörpers seinen Ausgang nimmt, ist eine Infiltration der Kapsel oder eine Kapselpenetration (besonders im Bereich der neurovaskulären Gefäßbündel) sehr häufig zu beobachten.

Resektionsrand

Durch Beurteilung des Resektionsrandes kann die Aussage getroffen werden, ob der Tumor *in toto* entfernt und ein ausreichender Sicherheitsabstand eingehalten werden konnte. Bei nicht tumorfreiem Schnitttrand des Resektates ist von dem Verbleib von Resttumorgewebe auszugehen. Durch diesen histologisch ermittelten Parameter kann somit zusätzlich die weiterführende Therapie geplant werden.

Tumorvolumen

Da möglicherweise auch über das Tumorvolumen Aussagen zur Erkrankung gemacht werden können, wurden postoperativ, im Rahmen der histologischen Untersuchung, für alle Patienten dieser Studie in den Resektaten die Tumorumfänge mit Hilfe der Landkarten geschätzt, in dem der geschätzte prozentuale Tumoranteil mit dem Gesamtgewicht der Prostata korreliert wurde. Da diese ein spezifisches Gewicht von 1 g/ccm besitzt, kann man so indirekt auch das Tumorvolumen abschätzen. Zusammen mit dem Befund der Prostatakapsel und des Resektionsrandes kann die lokale Tumorausdehnung definiert und zur Prognoseabschätzung verwendet werden.

Blutsverwandte mit PCa

Da bei der Entstehung des Prostatakarzinoms die erbliche Disposition als bedeutender Risikofaktor (32) bekannt ist, wurden bezüglich dieses Parameters anamnestisch Daten zu Prostatakreberkrankungen innerhalb der Patientenfamilien erhoben.

PSA-Wiederaanstieg

Da die Prostata der einzige Bildungsort des PSA ist, sollte nach durchgeführter radikaler Prostatektomie, der PSA-Wert im Serum nach einem bestimmten Zeitraum unterhalb der Nachweisgrenze liegen. Kommt es postoperativ zu einem Wiederaanstieg der PSA-Serumkonzentration, so gilt dies als sicheres Zeichen für ein Rezidiv. Dieser serologische Hinweis geht dem klinischen Progressionsnachweis u. U. um Jahre voraus (78, 87, 147, 173, 193; 256) und verschlechtert die Prognose.

Todesfälle

Die während des Beobachtungszeitraums an Prostatakrebs verstorbenen Patienten sollen ebenfalls aufgeführt werden. Möglicherweise können über die Konstellation zwischen genetischen und klinisch-histopathologischen Parametern Vermutungen über die Aggressivität eines Tumors aufgestellt werden.

Um die klinischen Parameter in Form einer 0/1-Matrix exakt den genetischen Parametern zuordnen zu können, wurde für einige dieser Parameter der Median bestimmt, der die Gesamtheit der Daten in zwei Gruppen unterteilt. Werte unterhalb des Medians wurden mit 0 gekennzeichnet; Werte größer oder gleich dem Median mit der Ziffer 1. Andere Parameter ließen sich durch die Auswertungen bezüglich dieses Parameters in die Gruppen ja und nein unterteilen, wobei ja die Ziffer 1, nein die 0 erhielten.

2.12. Statistische- und Bioinformatische Methoden

2.12.1. Statistische Methoden- Der Chi-Quadrat-Test

Zur Bestätigung eines signifikanten Zusammenhangs zwischen zwei Merkmalen wurde bei der Ergebnisauswertung, die die Häufigkeit von LOH eines der zu untersuchenden der Mikrosatellitenmarker in Relation zu bestimmten klinischen und histopathologischen Parametern darstellt, der Chi-Quadrat-Test angewendet.

Der Chi-Quadrat-Test wird zur Überprüfungen von Häufigkeitsverteilungen eingesetzt. Mit diesem Test wird die Hypothese überprüft, ob bestimmte Merkmale voneinander unabhängig sind oder ein signifikanter Zusammenhang zwischen diesen Merkmalen besteht. Nach Aufstellung einer Vier-Felder-Tafel wird in einer Kreuztabelle die beobachtete Häufigkeit beider Merkmale bestimmt. Dann wird rechnerisch die Häufigkeit bestimmt, die zu erwarten wäre, wenn die Merkmale völlig unabhängig voneinander wären. Diese beiden Werte dienen zur Berechnung des Chi-Quadrat-Wertes. Auf eine genauere Ausführung des Rechengvorgangs wird hier verzichtet, und auf entsprechende Statistiklehrbücher verwiesen.

Sowohl in Statistiklehrbüchern, als auch in den üblichen Statistikprogrammen, gibt es Tabellen, wo man für jeden Chi-Quadrat-Wert die entsprechende Signifikanz p ablesen kann. Allgemein ist es üblich, einen p -Wert von weniger als 0.05 mit “signifikant“ und von weniger als 0,01 als “sehr signifikant“ zu bezeichnen. Bei p -Werten die also kleiner als 0,05 sind, kann so mit hoher Wahrscheinlichkeit davon ausgegangen werden, dass es einen Zusammenhang zwischen diesen beiden Merkmalen gibt. (Quelle: Daten-Consult.de: Empirische Dienste in Medizin und Marktforschung, Der Chi-Quadrat-Test)

In dieser Arbeit wurde der Chi-Quadrat-Test mit 'Yates'-Korrektur für kleine Zählmen gen angewendet.

2.12.2. Distanzanalysen und Clusteranalysen

Die Berechnung von Distanzen sowie die Clusteranalysen ermöglichen es, eine Auswertung und Interpretation der zahlreichen unsortierten genetischen Tumordaten vorzunehmen (68, 95, 248).

Distanzanalysen

Die Distanzanalysen in der vorliegenden Arbeit wurden durch Herrn Dr. rer. nat. Reinhard Voss vom Institut für Arterioskleroseforschung, Abteilung Bioinformatik, der WWU Münster durchgeführt.

Dabei wurden die genetischen Merkmale jedes Tumors mit denen aller anderen verglichen. Das Programm berechnet zunächst direkt aus einer erstellten 0/1 Rohdaten-Matrix eine Distanzmatrix.

Dazu werden die Profile der Patienten als Vektoren aufgefasst, und die Distanzen (zwischen allen möglichen Profilen) als euklidische Abstände im n-dimensionalen Raum nach Gleichung 1 berechnet.

Bei dem eigentlichen Cluster-Vorgang werden ähnliche Vektoren oder bereits bestehende Cluster (mit minimaler Distanz zueinander) einer bestimmten Gruppe zugeordnet.

Gleichung 1:

$$d_{Pat_i, Pat_j} = \sqrt{\sum_{k=1}^m (x_k^i - x_k^j)^2}$$

Clusteranalysen

Das Programm für die 2-dimensionale hierarchische agglomerative Clusteranalyse beruht auf einer Eigenentwicklung von Herrn Dr. Voss und basiert auf Standardroutinen aus dem kommerziell erhältlichen Software-Paket S-Plus[®] (Insightful). Clusteranalysen ermöglichen es, eine unsortierte Menge an Daten in Gruppen aufzuteilen, die sich in einer bestimmten Anzahl von Merkmalen gleichen. Die Funktion "hclust" vereinigt (bei vorgewählten Optionen) alle Daten bis sich ein sortiertes Gesamtbild ergibt, in dem alle Objekte schrittweise zu immer größeren Klassen zusammengefasst werden. Da zweidimensional geclustert wird, kommt es im ersten Schritt zu einer Sortierung der Patienten, bzw. deren Profile, auf Grund ihrer Ähnlichkeiten in bestimmte Gruppen. Der 2. Schritt sieht eine Gruppierung der Merkmale nach Transposition der Matrix durch vertauschen der Zeilen und Spalten vor. Aus diesen beiden Clustern (Patientenbaum und Markerbaum) ergibt sich ein Ordnungsschema, das als farbkodiertes Bild mit den beiden zusätzlichen Clusterbäumen dargestellt werden kann.

Unter den zahlreichen Möglichkeiten für Clusteranalysen wurden in dieser Studie unter dem Model des euklidischen "hierarchical clustering" die zwei Methoden *Average linkage* und *Complete linkage* ausgewählt. Bei beiden werden die in der Distanzmatrix ermittelten Werte durch Fusion von Distanzen zu neuen Distanzen zusammengeführt. Somit ergeben sich durch immer weiterführende Zusammenführungen der jeweils geringsten Distanzen neue Cluster oder bestehende Cluster werden erweitert. Benachbarte

Subcluster ergeben wiederum größere Cluster. Bei der Methode *Average linkage*, die der Methode *Single linkage* sehr ähnlich ist, werden die Distanzen durch den Mittelwert der fusionierten Distanzen ersetzt. Die Sortierung erfolgt von innen nach außen, sprich von kleineren zu größeren Partitionen. Bei der Methode *Complete linkage* wird zur Berechnung die größte Distanz zwischen zwei Objekten in einem Cluster zu einem Punkt in einem anderen Cluster benutzt. Die Anordnung erfolgt also von größeren zu immer kleineren Partitionen. Die so sortierten genetischen Tumordaten werden in Form von Phenogrammen graphisch dargestellt. So können durch Betrachtung der entstandenen Cluster bzw. Ästen am Genbaum die ermittelten Daten ausgewertet und interpretiert werden.

3. Ergebnisse

In dieser Studie wurden 92 Patienten untersucht, die auf Grund eines gesicherten Prostatakarzinoms einer operativen Therapie im Sinne einer radikalen Prostatektomie zugeführt wurden. Bei 76 dieser Patienten wurde nach histologischer Aufarbeitung ein monofokaler Tumor diagnostiziert und bei weiteren 16 Patienten ein bifokales Tumorge-schehen, da bei ihnen im Prostatagewebe jeweils zwei unterschiedliche Tumorfoci gefunden wurden.

3.1. Beschreibung der Kollektive anhand klinischer und histopathologischer Parameter

3.1.1. Präoperativ erhobene klinische Daten

3.1.1.1. Lebensalter der Patienten

Zur Darstellung des Patientenalters wurde eine Einteilung gewählt, die sich in jeweils 5 Jahre umfassende Altersstufen gliedert. Insgesamt waren die Patienten zum Zeitpunkt der Operation zwischen 49 und 78 Jahre alt. 2/3 der Patienten befanden sich in den Altersstufen zwischen 60 Jahre bis 69 Jahren.

Tab.7: Lebensalter aller Patienten der 3 Kollektive, eingeteilt in verschiedene Altersstufen (k. A. = keine Angaben)

Alter in Jahren	45–49	50–54	55–59	60–64	65–69	70–74	75–79	k. A.
Gesamtkollektiv (n =92)	1	4	9	29	32	14	3	0
Monofokale Tumoren (n = 76)	1	2	9	27	23	11	3	0
Bifokale Tumoren (n = 16)	0	2	0	3	7	3	1	0

3.1.1.2. t-PSA-Wert

Zur besseren Zuordnung und Darstellung wurde eine begrenzende Stufeneinteilung vorgenommen, die jeweils um 5 ng/ml ansteigt.

Bei allen 92 untersuchten Patienten fand sich in der untersten Einteilungsstufe (0-4,99 ng/ml) nur bei einem Patienten ein t-PSA-Wert unter 4 ng/ml. Neben einigen wenigen Patienten mit extrem hohen t-PSA-Werten bis 170 ng/ml wurden bei 35% der Patienten Werte zwischen 5 ng/ml und 10 ng/ml gemessen. Für zwei Patienten lagen keine Angaben vor.

Tab.8: t-PSA- Wert aller Patienten der 3 Kollektive (k. A. = keine Angaben)

t-PSA in ng/ml	0-4,99	5-9,99	10-14,99	15-19,99	20-24,99	25-29,99	30,4	55-59,99	65,44	90,45	160-170	k. A.
Gesamtkollektiv (n=92)	12	33	20	7	6	4	2	2	1	1	2	2
Monofokale Tumoren (n = 76)	11	24	15	7	5	4	2	2	1	1	2	2
Bifokale Tumoren (n = 16)	1	9	5	0	1	0	0	0	0	0	0	0

3.1.1.3. Präoperativer Palpationsbefund

Tabelle 9 stellt die für die einzelnen Patienten ermittelten Tastbefunde dar, die in 3 Rubriken: 1. ohne pathologischen Befund, 2. dubios und 3. palpatorisch PCa-verdächtig eingeteilt wurden. Für insgesamt 34 Patienten konnten keine Angaben gemacht werden.

Tab.9: Verteilung aller Patienten der 3 Kollektive nach Beurteilung des Palpationsbefunds (k. A. = keine Angaben)

Palpation	ohne pathologischen Befund	dubios	palpatorisch PCa verdächtig	k. A.
Gesamtkollektiv (n=92)	12	12	34	34
Monofokale Tumoren (n = 76)	9	9	31	27
Bifokale Tumoren (n = 16)	3	3	4	6

3.1.2. Postoperativ ermittelte Daten

3.1.2.1. pT-Stadium

Insgesamt wurden bei dem hier untersuchten Patienten pT-Stadien von pT1 bis pT4 ermittelt.

81% der Patienten des Gesamtkollektivs wiesen ein Tumorstadium zwischen pT3a und pT3b auf, was auf ein Überschreiten der Organkapsel hinweist. Für 2 Patienten lagen keine Daten bezüglich des pT-Stadiums vor.

Tab.10: pT-Stadien aller Patienten der 3 Kollektive (k. A. = keine Angaben)

pT-Stadium	2a	2b	2c	3a	3b	3c	4	k. A.
Gesamtkollektiv (n=92)	4	2	30	28	15	11	1	2
Monofokale Tumoren (n = 76)	3	2	23	22	14	10	1	2
Bifokale Tumoren (n = 16)	1	0	7	6	1	1	0	0

3.1.2.2. Grading

77% der Patienten zeigte ein Grading zwischen G2a und G3a. Grading 1 wurde für 1 Patienten festgestellt, ebenso für Grading 1b und für 13 Patienten wurde das Grading 3b ermittelt. Für 4 Patienten lagen keine Angaben vor. GI entspricht hier G1 und 1a, GII Grading G2a-2b und GIII entspricht G3a-3b.

Tab.11: Ermitteltes Grading der Tumoren aller Patienten (k. A. = keine Angaben)

Grading	1	1b	2a	2	2b	3a	3	3b	k. A.
Gesamtkollektiv (n = 92)	1	1	21	0	31	19	0	15	4
Monofokale Tumoren (n = 76)	1	1	16	0	24	17	0	13	4
Bifokale Tumoren (n = 16)	0	0	5	0	7	2	0	2	0

3.1.2.3. Gleason-Score

Bei der Zuordnung zum Gleason-Score ergab sich in dieser Studie für 1 Patienten der Wert 4, Fünf Patienten erreichten den Wert 5. 70% der Patienten wurden den Bereichen Gleason 6-9 zugeordnet und Gleason 10 wurde für zwei Patienten ermittelt. Für 4 Patienten lagen keine Angaben bezüglich des Gleason-Scores vor.

Tab.12: Ermittelter Gleason-Score der Tumoren aller Patienten, dargestellt für die 3 Kollektive (k. A. = keine Angaben)

Gleason-Score	2	3	4	5	6	7	8	9	10	k. A.
Gesamtkollektiv (n = 92)	0	0	1	7	22	35	14	7	2	4
Monofokale Tumoren (n = 76)	0	0	1	7	17	27	13	5	2	4
Bifokale Tumoren (n = 16)	0	0	0	0	5	8	1	2	0	0

3.1.3. Weitere klinische Charakteristika

3.1.3.1. Positive Familienanamnese

Aus dem Gesamtkollektiv der 92 Patienten mit bekanntem PCa, sind bei insgesamt 16% (15 Patienten) Familienmitglieder bekannt, die entweder am PCa erkrankt oder verstorben sind. Für 12 dieser Patienten wurden monofokale Tumoren ermittelt. Bei den betroffenen Familienmitgliedern handelt es sich um Verwandte 1. Grades. Bei 10 Patienten aus dem monofokalen Tumorkollektiv sind Brüder an einem PCa erkrankt sind. Bei

einem dieser Patienten sind sogar zwei Brüder, davon ein Zwillingsbruder, betroffen. Ein Patient dieser Gruppe hat einen erkrankten Halbbruder. Die verwandtschaftliche Verbindung besteht über den gemeinsamen Vater. Bei zwei Patienten sind die Väter an einem bekannten PCa verstorben. Drei Patienten des Kollektivs mit bifokalen Tumoren haben Brüder mit diagnostiziertem PCa.

Tab.13: Anzahl der Patienten mit an PCa erkrankten oder verstorbenen Familienmitgliedern

PCa in Verwandtschaft	ja	nein
Gesamtkollektiv (n =92)	15	77
Monofokale Tumoren (n = 76)	12	64
Bifokale Tumoren(n = 16)	3	13

3.1.4. Follow-up Daten

3.1.4.1. PSA-Wiederaanstieg

Im Kollektiv der 92 Patienten, nach radikaler Prostatektomie, wurde während des 3-jährigen Follow-up bei 17 Patienten (18%) ein PSA-Wiederaanstieg beobachtet.

Tab.14: Anzahl der Patienten mit PSA-Wiederaanstieg

PSA-Wiederaanstieg	ja	nein
Gesamtkollektiv (n =92)	17	75
Monofokale Tumoren (n = 76)	15	61
Bifokale Tumoren (n = 16)	2	14

3.2. Nachweis von allelischen Imbalanzen ausgewählter Mikrosatellitenmarker im Tumorgewebe der Prostatakarzinome

Von den 92 untersuchten Patienten zeigten 76 ein monofokales Tumorgeschehen, 16 Patienten zeichneten sich durch das Vorhandensein eines bifokalen Tumors, der jeweils 2 Tumorfoci beinhaltet, aus. Insgesamt konnten so 108 Tumoren bzw. Foci untersucht und ausgewertet werden. Patienten die entweder in einem Focus oder in beiden Foci einen LOH aufwiesen werden in der Beschreibung des Gesamtkollektivs (92 Patienten) als Patienten mit einem LOH klassifiziert.

Mit Hilfe der Mikrosatellitenanalyse konnte bei den Tumoren allelische Imbalancen in Form eines LOH nachgewiesen werden (s. Abb.4). Diese, als auch der Anteil der heterozygoten Foci ohne LOH und die homozygoten, in diesem Fall nicht auszuwertenden Foci, sollen im Folgenden dargestellt werden.

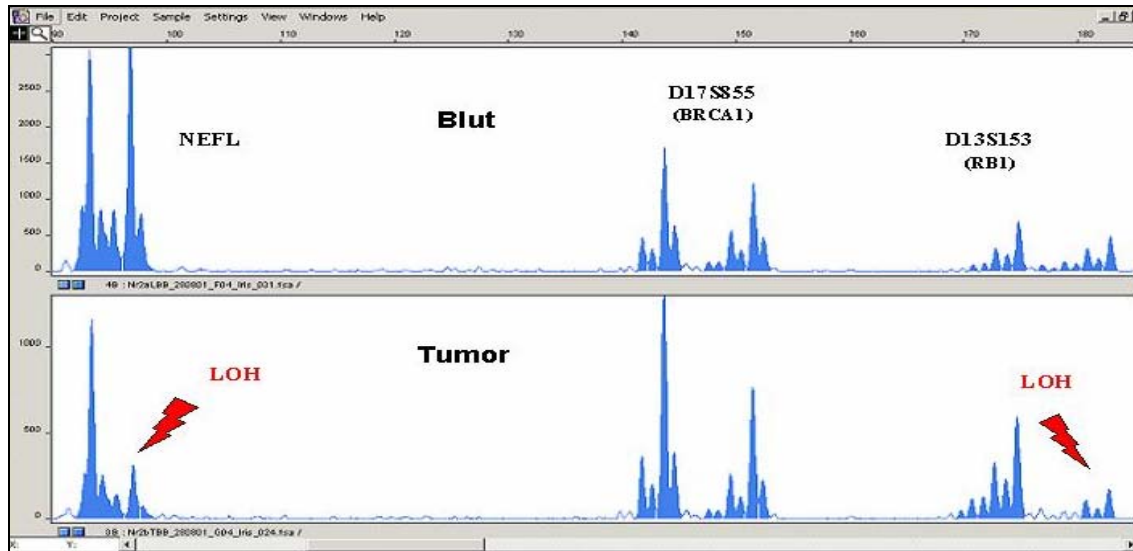


Abb.4: Elektropherogramm der kapillarelektrophoretischen Auftrennung einer Multiplex-PCR mit den Markern NEFL, D17S855 und D13S153 mit sichtbarem LOH der Marker NEFL und D13S153.

3.2.1. Heterozygotiegrad des Gesamtkollektivs

Da nur die heterozygoten Merkmalsträger im Rahmen einer Mikrosatellitenanalyse auswertbar sind, sollte der Heterozygotiegrad des Gesamtkollektivs in den untersuchten Mikrosatellitenmarkern hoch genug sein, damit bei der Mikrosatellitenanalyse gute Ergebnisse erzielt werden können. Die Auswertung des Heterozygotiegrades ergab für das untersuchte Gesamtkollektiv einen Anteil von über 80 % bei den Markern D10S541, D13S153, D16S404, und p53. Für die Marker D8S258, D16S402, D16S422 und D17S855 wurden Heterozygotiegrade zwischen 60 % und 80 % festgestellt. Marker D7S522 wies einen Anteil von 49 % auf und Marker NEFL zeigte mit 35 % den geringsten Anteil an heterozygoten Merkmalsträgern (s. Abb.5).

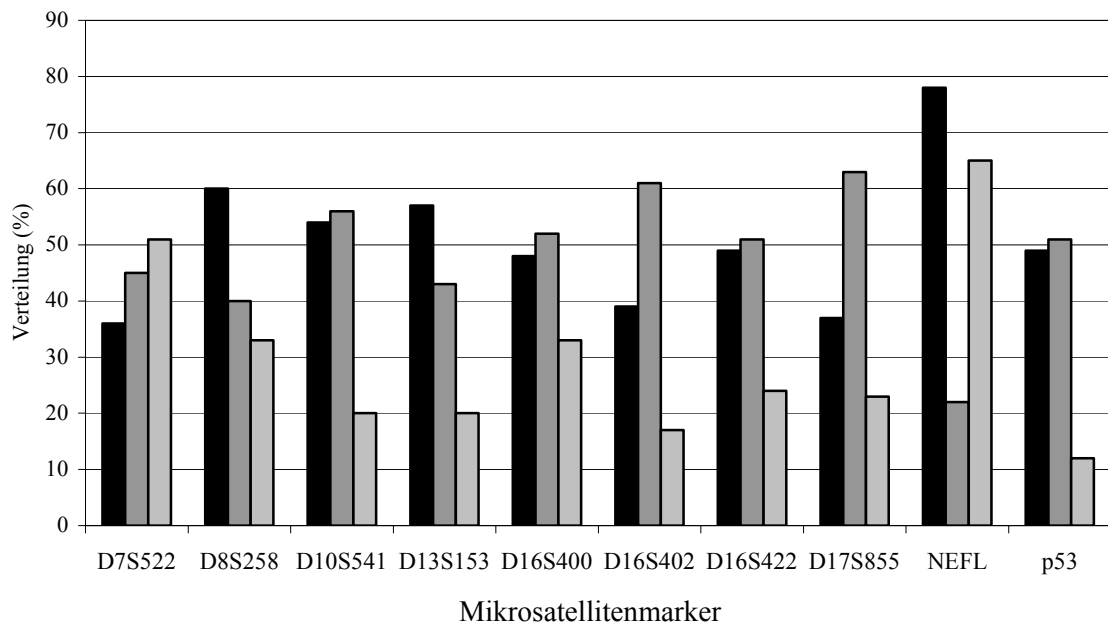


Abb.6: Prozentuale Verteilung der Häufigkeit der allelischen Imbalancen in den polymorphen Mikrosatellitenmarkern für 92 Patienten mit PCa (■ = LOH; ■ = heterozygot ohne LOH; ■ = homozygot)

Es stellt sich ein sehr hoher Anteil an homozygoten Merkmalsträgern für die Marker NEFL (65%) und D7S522 (51%) im Gesamtkollektiv dar. Allein für die heterozygoten Merkmalsträger des Kollektivs überwiegt der Anteil der heterozygoten Patienten mit LOH im Vergleich zu den heterozygoten Patienten ohne einen LOH in den Markern D8S258 (60% zu 40%), D13S153 (57% zu 43%) und NEFL (78% zu 22%). Die Marker D7S522, D10S541, D16S400, D16S422 und p53 zeigen einen minimal höheren Anteil an heterozygoten Merkmalsträgern ohne einen LOH. Deutlichere Unterschiede zu Gunsten der Heterozygoten ohne LOH zeigen Marker D16S402 (61%) und Marker D17S855 (63%).

3.2.3. Untersuchung der 76 Patienten mit monofokalen Tumoren

Tabelle 16: Allelische Imbalanzen der 10 polymorphen Mikrosatellitenmarker im Kollektiv der 76 Patienten mit monofokalen Tumoren

	D7 S522	D8 S258	D10 S541	D13 S153	D16 S400	D16 S402	D16 S422	D17 S855	NEFL	p53
heterozygot	38	53	59	60	52	63	56	59	27	67
heterozygot mit LOH	19	30	29	31	25	23	26	22	21	32
heterozygot ohne LOH	19	23	30	29	27	40	30	37	6	35
homozygot =nicht informativ	38	23	17	16	24	13	20	17	49	9
Σ	76	76	76	76	76	76	76	76	76	76

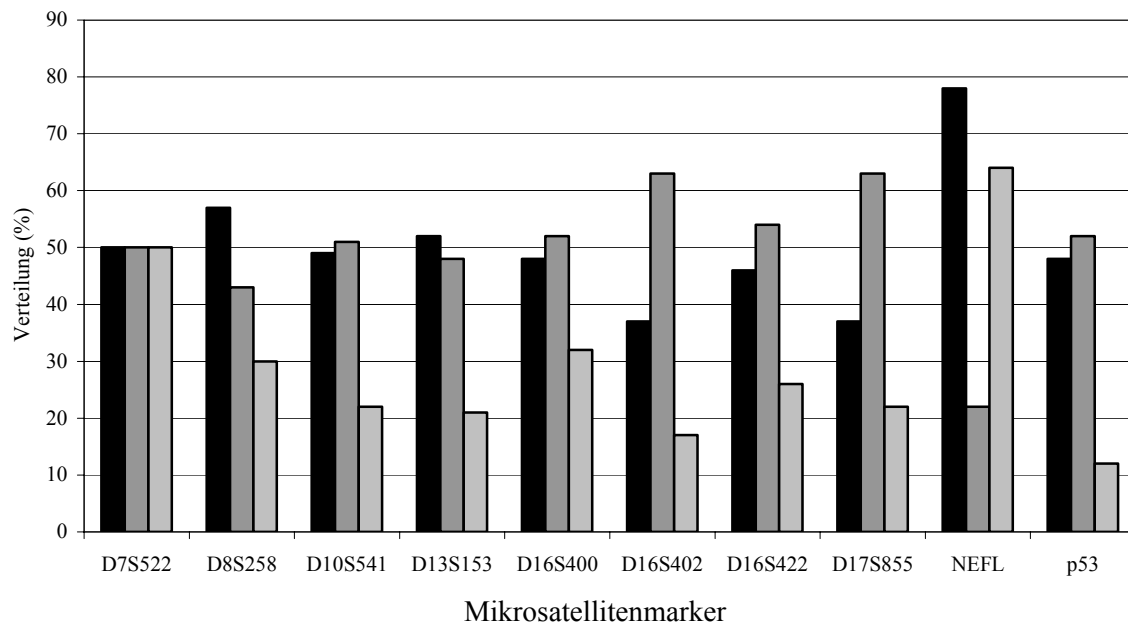


Abb.7: Prozentuale Verteilung der Häufigkeit der allelischen Imbalanzen in den polymorphen Mikrosatellitenmarkern bei 76 Patienten mit monofokalen Tumoren (■ = LOH; ■ = heterozygot ohne LOH; ■ = homozygot)

Auch bei der Auswertung dieses Subkollektivs fallen die Marker NEFL (64%) und D7S522 (50%) mit hohem Anteil an homozygoten Merkmalsträgern auf. Bezogen allein auf die Heterozygoten ist in Marker D8S258 (57% zu 43%) und besonders in Marker NEFL (78% zu 22%) ein Überwiegen der heterozygoten Merkmalsträger mit einem LOH zu beobachten. Marker D10S541, D13S153 und D16S400 zeigen ein relativ ausgeglichenes Verhältnis. Alle anderen Marker stellen sich mit einem höheren Anteil für

Tab.18: Darstellung der bifokalen Tumorfoci (unterschiedliche Ergebnisse sind unterlegt)

Lfd. Nr.	Focus	D7 S522	D8 S258	D10 S541	D13 S153	D16 S400	D16 S402	D16 S422	D17 S855	NEFL	p53	Anzahl LOH-Unterschiede der Foci
1	AB31_1	0	<u>1</u>	0	<u>1</u>	0	0	0	0	0	1	2
	AB31_9	0	<u>0</u>	0	<u>0</u>	0	0	0	0	0	1	
2	AJ33_25	0	0	<u>0</u>	0	1	1	1	1	1	1	1
	AJ33_9	0	0	<u>1</u>	0	1	1	1	1	1	1	
3	BB36_7	0	<u>1</u>	<u>0</u>	1	0	<u>0</u>	1	1	0	<u>1</u>	4
	BB36_17	0	<u>0</u>	<u>1</u>	1	0	<u>1</u>	1	1	0	<u>0</u>	
4	BJ37_NW21	0	0	0	<u>1</u>	0	0	0	0	0	<u>1</u>	2
	BJ37_8	0	0	0	<u>0</u>	0	0	0	0	0	<u>0</u>	
5	FK33_14	0	0	<u>1</u>	0	0	0	0	0	0	0	1
	FK33_17	0	0	<u>0</u>	0	0	0	0	0	0	0	
6	GP36	0	1	0	1	1	0	0	0	<u>0</u>	0	1
	GP36_2	0	1	0	1	1	0	0	0	<u>1</u>	0	
7	HK35_10	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0
	HK35_35	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	
8	HP39_18	0	0	1	1	<u>1</u>	1	1	0	0	0	1
	HP39_9	0	0	1	1	<u>0</u>	1	1	0	0	0	
9	KH49_5	0	0	<u>0</u>	0	0	<u>1</u>	0	0	0	<u>1</u>	3
	KH49_16	0	0	<u>1</u>	0	0	<u>0</u>	0	0	0	<u>0</u>	
10	LH32_9	0	0	0	1	<u>1</u>	0	<u>1</u>	0	1	1	3
	LH32_23	0	0	0	1	<u>0</u>	0	<u>0</u>	0	0	1	
11	MW36_9	0	0	<u>1</u>	1	0	0	1	0	0	1	2
	MW36_22	0	0	<u>0</u>	1	0	0	0	0	0	1	
12	RH31_12	0	0	<u>0</u>	1	<u>0</u>	0	<u>0</u>	0	<u>0</u>	0	4
	RH31_19	0	0	<u>1</u>	1	<u>1</u>	0	<u>1</u>	0	<u>1</u>	0	
13	SR49_7	0	1	1	<u>0</u>	0	1	0	<u>1</u>	0	1	2
	SR49_12	0	1	1	<u>1</u>	0	1	0	<u>0</u>	0	1	
14	SG39_19	0	1	1	1	0	<u>0</u>	<u>0</u>	0	0	0	2
	SG39_34	0	1	1	1	0	<u>1</u>	<u>1</u>	0	0	0	
15	THJ33_1	<u>1</u>	1	1	0	0	1	0	0	0	0	1
	THJ33_2	<u>0</u>	1	1	0	0	1	0	0	0	0	
16	HJ34_1	0	<u>1</u>	<u>1</u>	0	0	0	0	<u>0</u>	0	0	3
	HJ34_2	0	<u>0</u>	<u>0</u>	0	0	0	0	<u>1</u>	0	0	
Σ LOH		1	7	11	10	5	7	8	4	4	8	
Σ untersch. LOH		1	3	7	3	3	3	2	2	3	4	

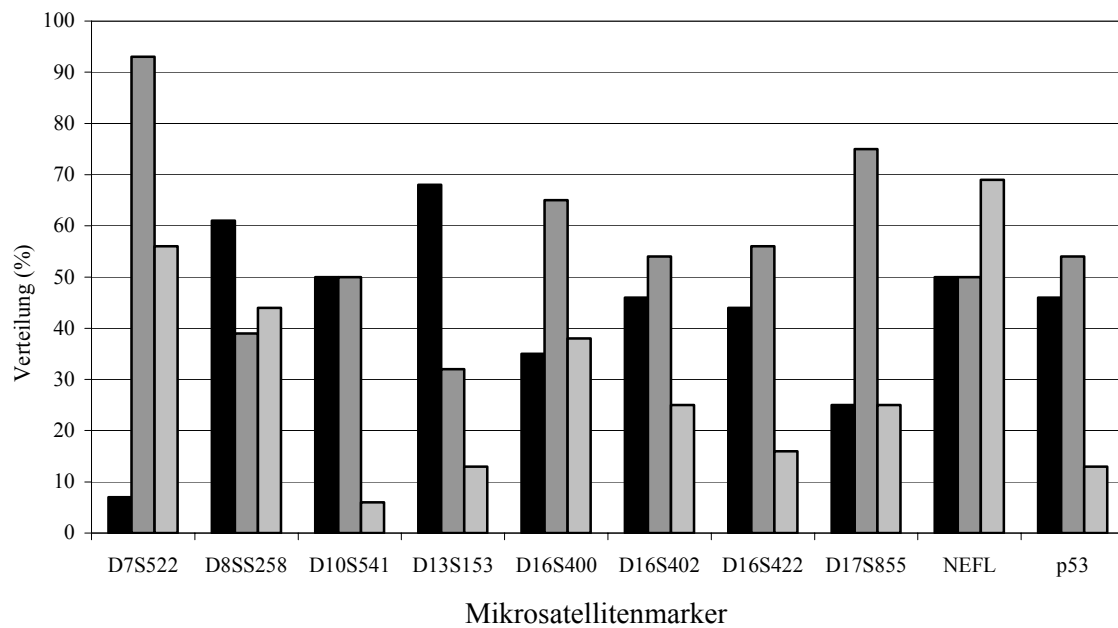


Abb.8: Prozentuale Verteilung der allelischen Imbalanzen in den polymorphen Mikrosatellitenmarkern für 32 Foci der 16 Patienten mit bifokalen Tumoren (■ = LOH; ■ = heterozygot ohne LOH ■ = homozygot).

Wie auch beim Kollektiv der monofokalen Tumoren findet sich wiederum in Marker D7S522 (56%) und in Marker NEFL (69%) ein hoher Anteil an homozygoten Merkmalsträgern. Marker D17S855 präsentiert sich für die Heterozygoten mit einem deutlich erhöhten Anteil an Heterozygoten ohne einen LOH (75%). Marker D13S153 ist in dem Kollektiv der 32 Foci mit einem Anteil von 68 % LOH deutlich überrepräsentiert. Außer diesem zeigt nur noch Marker D8S258 mit 61% einen deutlich höheren Anteil an heterozygoten Merkmalsträgern mit LOH. In diesem Kollektiv präsentiert sich der Marker D7S522 neben seinem hohen Anteil an homozygoten Merkmalsträgern außerdem mit einem sehr niedrigen Prozentsatz (7%) an heterozygoten Merkmalsträgern mit LOH.

3.2.4.2. Allelische Imbalanzen der 16 Patienten mit bifokalen Tumoren

In dieser Auswertung werden die 16 Patienten mit bifokalen Tumoren als Subkollektiv untersucht und dargestellt. Hierfür wurden die Ereignisse in den beiden Tumorfoci eines Tumors bei Vorliegen eines LOH auf einem Focus, oder bei Vorliegen eines LOH auf beiden Foci zu einem Tumor mit LOH zusammengefasst.

Tab.19: Anzahl der Häufigkeit der allelischen Imbalancen der polymorphen Mikrosatellitenmarker im Kollektiv der 16 Patienten mit bifokalen Tumoren

	D7 S522	D8 S258	D10 S541	D13 S153	D16 S400	D16 S402	D16 S422	D17 S855	NEFL	p53
heterozygot	7	9	15	14	10	13	14	12	5	14
heterozygot mit LOH	1	7	11	11	5	7	8	4	4	8
heterozygot ohne LOH	6	2	4	3	5	6	6	8	1	6
homozygot	9	7	1	2	6	3	2	4	11	2
Σ	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16

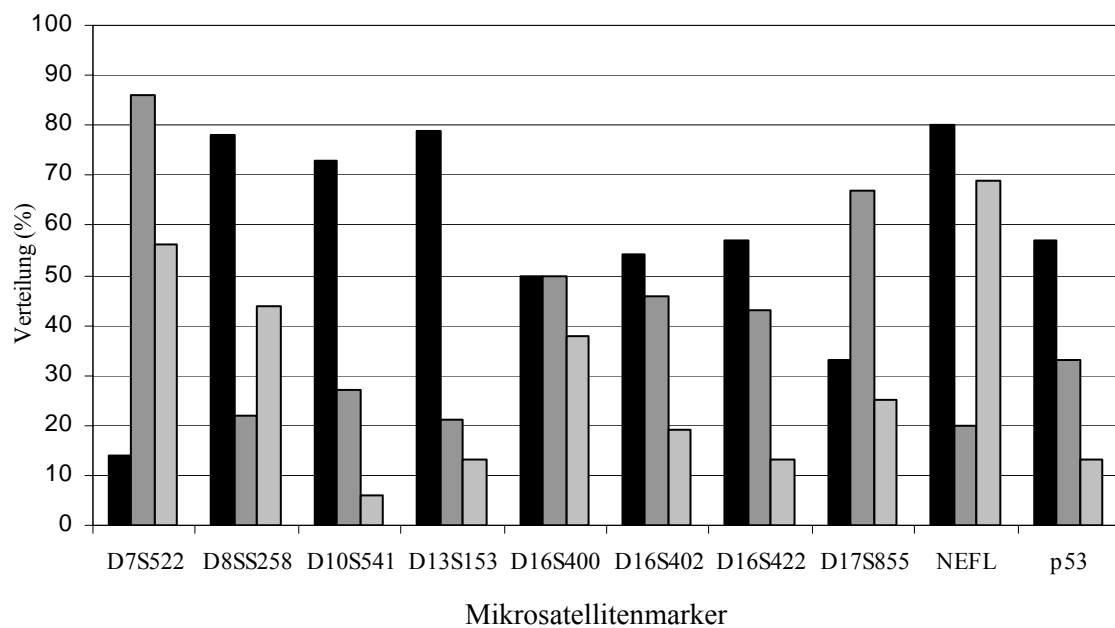


Abb.9: Prozentuale Verteilung der Häufigkeit der allelischen Imbalancen für die polymorphen Mikrosatellitenmarker im Kollektiv der 16 Patienten mit bifokalen Tumoren (■ = LOH; ■ = heterozygot ohne LOH ■ = homozygot)

Auch hier fallen in der Darstellung die Marker D7S522 mit 56% und NEFL mit 69% durch einen verhältnismäßig großen Homozygotie-Anteil auf. Zu dieser Gruppe gehört auch der Marker D8S258 (44%). Von allen Heterozygoten sind mit Ausnahme von Marker D7S522 und Marker D17S855, die einen hohen Anteil heterozygoter Merkmals-träger ohne LOH zeigen (86% bzw. 67%), sind in allen anderen Markern prozentual deutlich mehr Heterozygote mit LOH vertreten. Hervorzuheben sind die Marker D8S258, D10S541, D13S153 und NEFL die LOH von 73-80% aufweisen.

3.2.5. Vergleichende Darstellung beider Subkollektive (76 Patienten und 16 Patienten) für die Mikrosatellitenanalyse

Da die Untersuchung der LOHs und ihre eventuellen Auswirkungen auf die Prognose des PCa zum Hauptinteresse dieser Studie zählt, wird in diesem Abschnitt der prozentuale Anteil der LOHs bezogen auf die jeweiligen Subkollektive (76 Patienten mit monofokalen Tumoren/16 Patienten mit bifokalen Tumoren) einander gegenübergestellt. Betrachtet wird nur der prozentuale Anteil der Heterozygoten mit LOH der beiden Subkollektive.

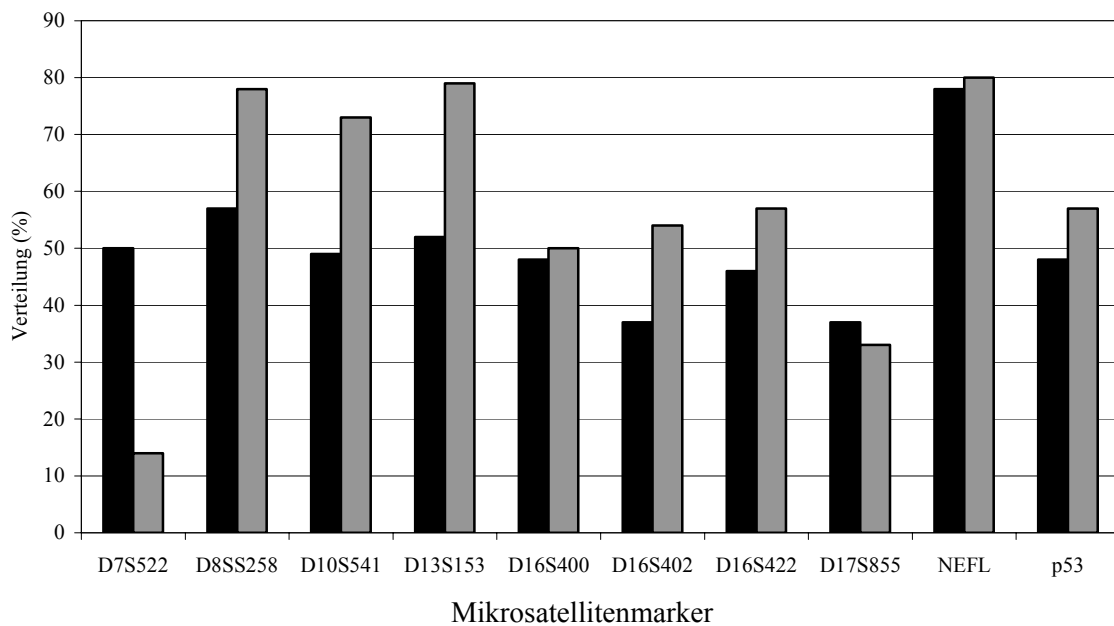


Abb.10: Prozentuale Verteilung der LOH in den polymorphen Mikrosatellitenmarkern für beide Subkollektive (■ = monofokal; ▒ = bifokal).

Im Gegensatz zu dem Marker D7S522, bei dem LOH im Patientenkollektiv mit monofokalen Tumoren mit 50% vorkommt, beim Kollektiv der 16 Patienten jedoch nur zu 14%, ist das Verhältnis in den übrigen Markern umgekehrt. Besonders betroffen sind im heterozygoten Kollektiv der bifokalen Tumoren die Marker D8S258 mit 78%, D10S541 mit 73% und D13S153 mit 79% aller heterozygoten Merkmalsträger. Die übrigen Marker zeigen weniger deutliche Unterschiede.

3.2.6. Vergleich des Heterozygotiegrades und der Alterationsfrequenz dieser Studie zu Literaturdaten

Abschließend wird in einer Tabelle der in der Literatur ermittelte Heterozygotiegrad und die Alterationsfrequenz (LOH in %) der polymorphen Mikrosatellitenmarker vergleichend neben die in dieser Studie ermittelten entsprechenden Werte gestellt.

Tab.20: Getestete Marker für das Prostatakarzinom

Genlocus	Lokalisation	Heterozygotiegrad (Literatur)	Heterozygotiegrad (vorliegende Arbeit)	LOH [%] (Literatur)	LOH [%] (vorliegende Arbeit)
D7S522 (caveolin 1+2) (MET)	7q31.1	0,67	0,49	13-31,3 %	22 %
D8S258	8p22	0,71	0,67	8,1-24,1 %	40 %
NEFL	8p21	0,83	0,35	16,3-35,4 %	27 %
D10S541 (PTEN)	10q23	0,78	0,8	45,1 %	43 %
D13S153 (Rb1)	13q14.2	0,82	0,81	25-30 %	46 %
D16S400	16q22.2-23.1	0,62	0,68	18,8 %	35 %
D16S402	16q24.2	0,86	0,83	28,8 %	33 %
D16S422	16q24.2	0,8	0,76	42 %	37 %
p53	17p13.1	0,84	0,88	38 %	43 %
D17S855 (BRCA1)	17q21	0,82	0,77	34,8 %	28 %

Im Vergleich zu den in der Literatur beschriebenen Ergebnissen wurden in der vorliegenden Arbeit bezüglich des Heterozygotiegrades und der LOH-Häufigkeit annähernd ähnliche Ergebnisse erzielt. Gravierende Unterschiede zur Literatur zeigte in der vorliegenden Arbeit jedoch die Region 8p. Hier wurden bezüglich des Heterozygotiegrades für den Marker D8S258 und bezüglich der LOH-Häufigkeit für den Marker NEFL deutlich höhere Werte ermittelt.

3.3. Allelische Imbalanz der Marker in Korrelation zu klinischen und histopathologischen Parametern

In folgendem Abschnitt soll die Häufigkeit eines LOH der informativen Fälle in den 10 getesteten Mikrosatellitenmarkern der 76 Patienten bzw. deren Tumorfoci in Relation zu klinischen und histopathologischen Parametern beschrieben werden. Im nächsten Abschnitt sollen auch die 16 Patienten mit bifokalen Tumoren ausgewertet werden.

3.3.1. Allelische Imbalanzen der Mikrosatellitenmarker in monofokalen Tumoren in Korrelation zu klinischen und histopathologischen Parametern

3.3.1.1. Präoperativ erhobene Daten

Ausgewertet wurden alle klinischen Daten, die aus der urologischen Klinik übermittelt wurden. Zu einzelnen Parametern lagen für einige Patienten keine klinischen oder histopathologischen Angaben vor. Die Anzahl der fehlenden Daten der Patienten ist für jeden Parameter jeweils im betreffenden Abschnitt aufgeführt.

3.3.1.1.1. Häufigkeit eines LOH der informativen Fälle in Relation zum Lebensalter der Patienten

Die Berechnung des mittleren Lebensalters der Patienten ergab für das Gesamtkollektiv der 92 untersuchten Patienten ein Alter von 64 Jahren. Das Kollektiv der 76 Patienten mit monofokalen Tumoren setzte sich dementsprechend aus 34 Patienten die jünger als 64 Jahre waren, und 42 Patienten die 64 Jahre oder älter waren, zusammen.

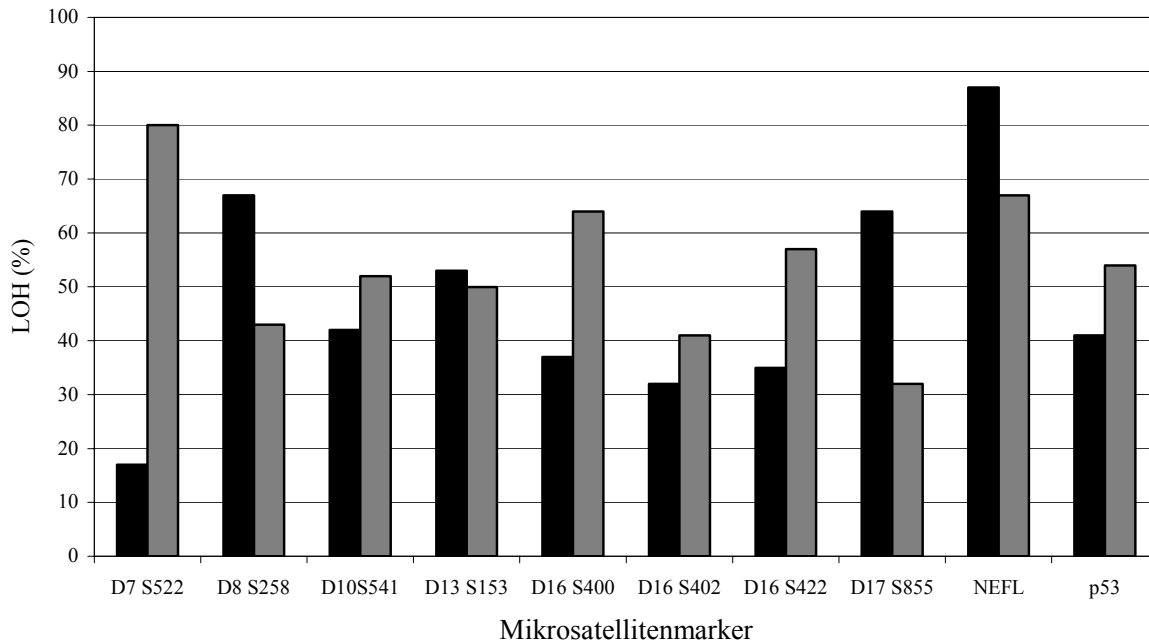


Abb.11: Prozentualer Anteil an LOH der Mikrosatellitenmarker in Relation zum Lebensalter. Gesamtverteilung: n = 76; Mittleres Lebensalter = 64 Jahre; n mit Alter < 64 = 34; ; n mit Alter ≥ 64 = 42; n ohne Altersangabe = 1 (■ = LOH bei Alter < 64 Jahre; ▒ = LOH bei Alter ≥ 64 Jahre)

Deutliche Unterschiede zwischen den beiden Altersgruppen der heterozygoten Merkmalsträger bezüglich der LOH-Häufigkeit stellen sich in folgenden Markern dar. Die Gruppe der unter 64-jährigen Patienten zeigt in Marker D8S258 (67%), D17S855 (64%) und Marker NEFL (87%) wesentlich häufiger LOH, als die entsprechende Gruppe der über 64-jährigen Patienten. Genau entgegengesetzt verhalten sich die Marker D7S522, D16S400 und D16S422, bei denen mit 80%, 64% bzw. 57% deutlich häufiger LOH in der Gruppe der über 64-jährigen Patienten zu beobachten ist. Der Marker p53 folgt mit 54% dieser Tendenz. Für alle anderen Marker lassen sich keine deutlichen Unterschiede feststellen.

3.3.1.1.2. Häufigkeit eines LOH der informativen Fälle in Relation zum t-PSA-Wert

Der Trennwert der beiden Gruppen wurde für t-PSA bei 10 ng/ml festgelegt, da sich der klinischen Erfahrung nach bei t-PSA-Werten über 10 ng/ml die Prognose deutlich verschlechtert. Da im Kollektiv der 76 Patienten mit monofokalen Tumoren für 1 Patienten keine Angabe vorlag, wurden 38 Patienten der Klasse t-PSA < 10 ng/ml zugeordnet und 37 Patienten befanden sich in der Klasse t-PSA \geq 10 ng/ml.

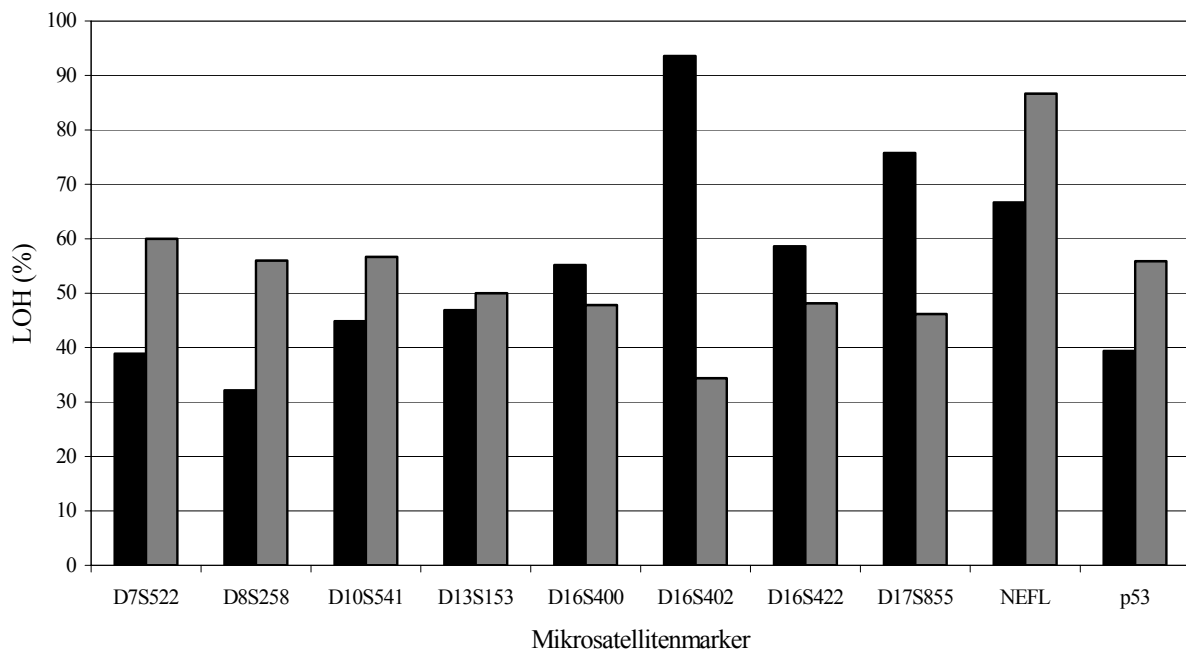


Abb.12: Prozentualer Anteil an LOH der Mikrosatellitenmarker in Relation zum t-PSA-Wert. Gesamtverteilung: n = 76; Trennwert = 9,99 ng/ml; n mit t-PSA < 10 ng/ml = 38; n mit t-PSA \geq 10 ng/ml = 37; keine Angabe = 1 (■ = LOH bei t-PSA < 10 ng/ml; ▒ = LOH bei t-PSA \geq 10ng/ml)

Hierbei zeigt sich für die Marker D7S522 (60%), D8S258 (56%) ein deutlicher Unterschied, da der Anteil an LOH in der Klasse der Patienten mit t-PSA \geq 10 ng/ml deutlich überwiegt. Alle anderen zeigen eine relativ ausgewogene Verteilung an LOH in beiden Klassen. Der deutlichste Unterschied wird allerdings für den Marker D16S402 gefunden, bei dem 94% aller Patienten mit t-PSA <10 ng/ml einen LOH zeigen.

3.3.1.1.3. Häufigkeit eines LOH der informativen Fälle in Relation zum präoperativen Palpationsbefund

Die zur Verfügung stehenden Daten bezüglich des Tastbefundes wurden in 2 verschiedene Gruppen eingeteilt. Der 1. Gruppe wurden Patienten zugeordnet, die während der digitalen rektalen Tastuntersuchung einen unauffälligen Befund (ohne pathologischen Befund) aufwiesen. In die 2. Gruppe wurden Patienten aufgenommen, die bei der Untersuchung einen dubiosen oder PCa-verdächtigen (also fortgeschrittenes Tumorstadium) Befund aufwiesen. So ergab sich unter Berücksichtigung von 27 fehlenden Daten, für die 1. Gruppe ein Kollektiv von 9 Patienten, die 2. Gruppe schloss 40 Patienten ein.

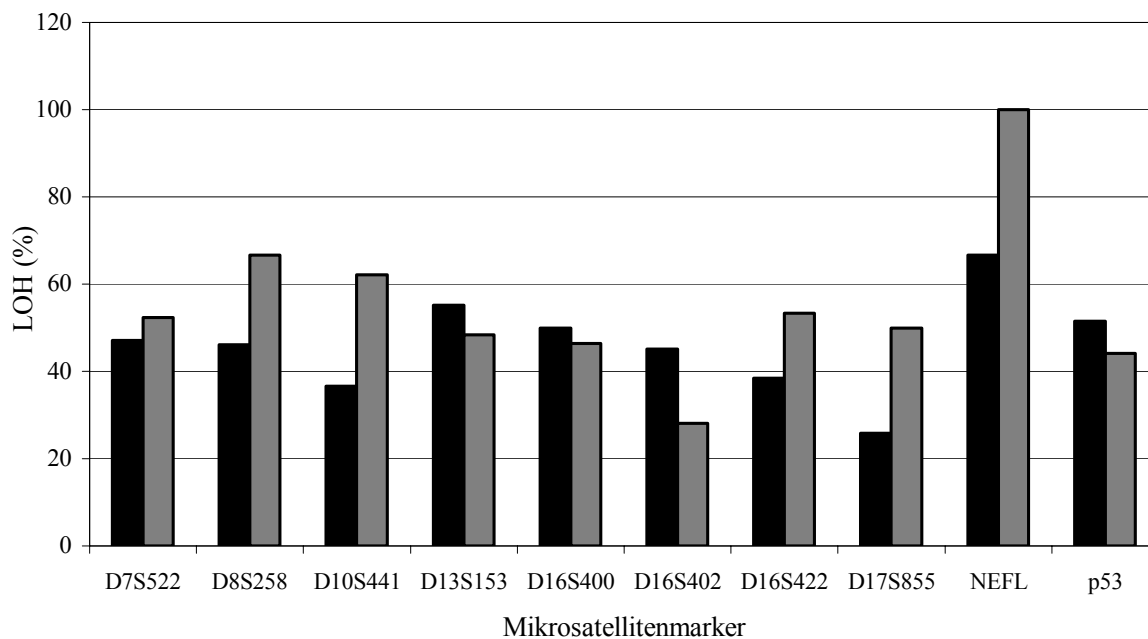


Abb.13: Prozentualer Anteil an LOH der Mikrosatellitenmarker in Relation zum Palpationsbefund. Gesamtverteilung: n = 76 n mit Palpation ohne pathologischen Befund = 9; n mit Palpationsbefund dubios oder PCa-verdächtig = 40 Patienten; n ohne Angabe = 27 (■ = LOH bei Palpation ohne pathologischen Befund; ■ = LOH bei Palpationsbefund dubios oder PCa-verdächtig)

Unter den heterozygoten Merkmalsträgern war häufiger einen LOH der Markern NEFL, D8S258, D10S541, D17S855 und gering auch in Marker D7S522 und Marker D16S422 zu beobachten. Besonders auffällig stellt sich der Marker NEFL dar, da hier für alle heterozygoten Merkmalsträger (100%) ein dubioser bzw. PCa-verdächtiger Palpationsbefund ermittelt wurde.

3.3.1.1.4. Häufigkeit eines LOH der informativen Fälle in Relation zu von PCa-betroffenen Blutsverwandten

Da bei der Entstehung des PCa auch die genetische Disposition eine Rolle spielt, wurden die Patienten bei Aufnahme nach Erkrankungsfällen innerhalb der Familie befragt. Von den 76 Patienten gaben 64 Patienten an, daß in ihrer Familie kein Fall einer Prostatakrebserkrankung bekannt sei. 12 Patienten waren PCa-Erkrankungen in der Verwandtschaft bekannt. Die Betroffenen sind entweder Väter oder Brüder der Patienten.

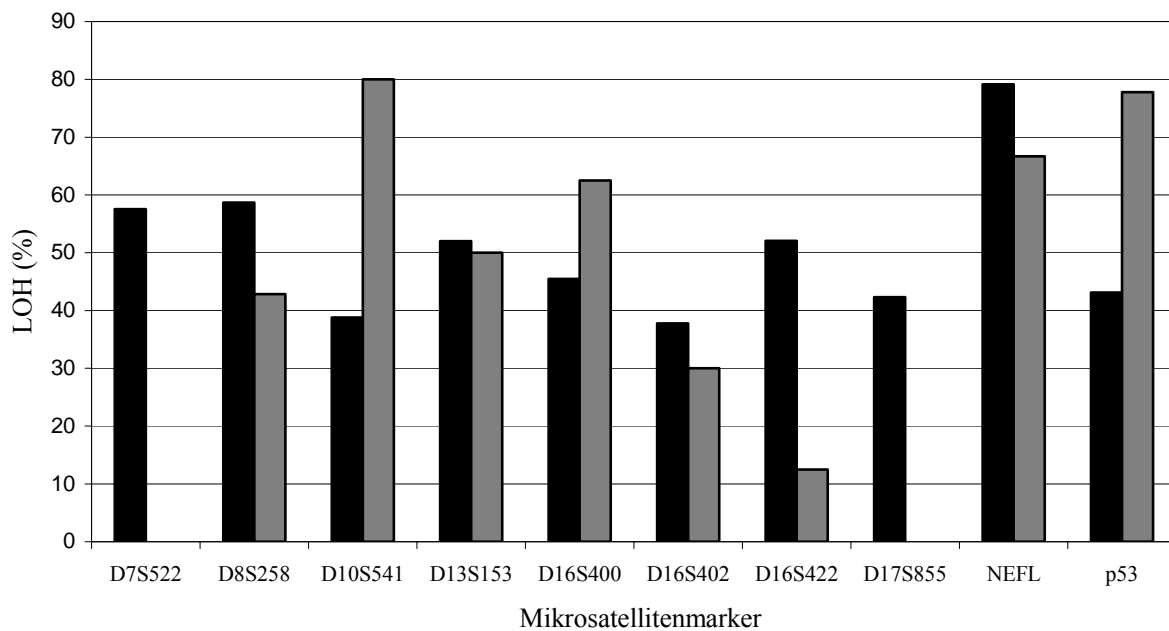


Abb.14: Prozentualer Anteil an LOH der Mikrosatellitenmarker in Relation zu betroffenen Blutsverwandten. Gesamtverteilung: n = 76; n ohne Blutsverwandte mit PCa = 64; n mit Blutsverwandten mit PCa = 12 (■ = LOH ohne Blutsverwandte mit PCa ; ■ = LOH mit Blutsverwandten mit PCa)

Vier Marker zeigen deutlich häufiger einen LOH bei den Patienten mit PCa bei Blutsverwandten. Dies sind Marker D10S541 mit 80% aller heterozyoten Merkmalsträger, Marker D16S400 mit 63% und der Marker p53 mit 78%. Marker D7S522 und D17S855 weisen in der Gruppe der Patienten mit positiver Familienanamnese keinen LOH auf. LOH in den Markern D8S258 (59%), NEFL (79%) und besonders deutlich in Marker D16S422 (52 %) tritt bei den heterozygoten Merkmalsträgern Blutsverwandte mit PCa deutlich häufiger auf.

3.3.1.2. Postoperativ erhobene Daten

3.3.1.2.1. Häufigkeit eines LOH der informativen Fälle in Relation zum pT-Stadium

In Absprache mit der urologischen Abteilung wurde eine Aufteilung des Kollektivs vorgenommen, die die Verteilung der 76 Patienten in die Klassen pT-Stadium 1-2c und pT-Stadium 3a-4 vorgab. Ab pT 3a verschlechtert sich die Prognose des Patienten erheblich. Somit konnten 28 Patienten der Klasse pT 1-2c, 47 Patienten der Klasse pT 3a-4 zugeordnet werden. Für einen Patienten lagen keine Angaben vor.

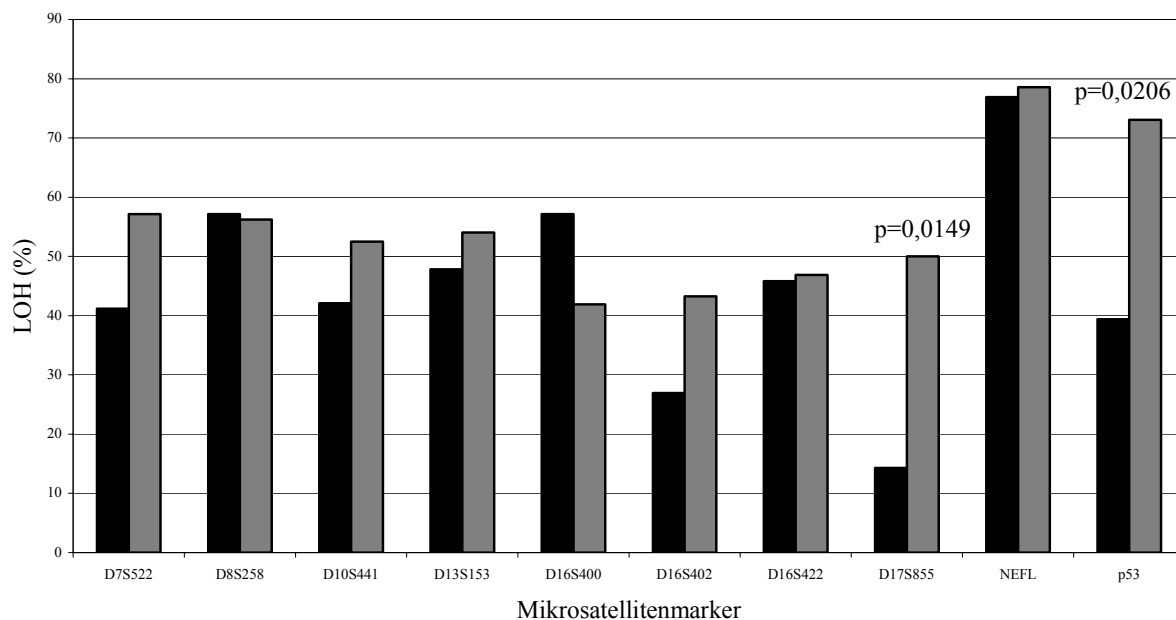


Abb.15: Prozentualer Anteil an LOH der Mikrosatellitenmarker in Relation zum pT-Stadium. Gesamtverteilung: n = 76; n mit pT1-2c = 28; n mit pT3a-4 = 47 Patienten; n ohne Angabe = 1 (■ = LOH bei pT1-2c; ■ = LOH bei pT3a-4)

Hierbei zeigt sich für die Verteilung des Anteils an LOH für Marker D17S855 ein deutlicher Unterschied mit häufigerem LOH in der Klasse pT 3a-4 (50%). In der Klasse pT1-2c zeigen nur 14% LOH dieses Markers. Der Unterschied ist sehr deutlich und mit $p=0,0149$ signifikant. Die gleiche Tendenz zeigt sich für Marker p53 bei dem zu 73% LOH in der Gruppe mit pT-Stadium pT3a-4 beobachtet werden kann. Nur 39% sind in der Klasse pT 1-2c von LOH betroffen. Mit $p=0,0206$ auch hier ein signifikanter Unterschied. Für die Marker D7S522, D10S541 und D16S402 zeigen sich leichte Unterschiede mit häufigerem LOH in der Klasse pT 3a-4. Der Marker D16S400 zeigt ein leichtes Überwiegen von LOH in der Klasse pT1-2c. Keine deutlichen Unterschiede sind für die restlichen Marker zu ermitteln.

3.3.1.1.2. Häufigkeit eines LOH der informativen Fälle in Relation zum Grading

Für die Auswertung der genetischen Parameter wurden für das Grading folgende Klassen gebildet: 1. Grading < 2 und 2. Grading ≥ 2 . Diese Auswahl wurde erneut durch die sich ab Grading > 2 verschlechternden Prognose für den Patienten bestimmt. Aus dem Kollektiv konnten der Klasse Grading < 2 so 17 Patienten zugeordnet werden, der Klasse Grading ≥ 2 55 Patienten. Ohne Angabe bezüglich des Gradings blieben 4 Patienten.

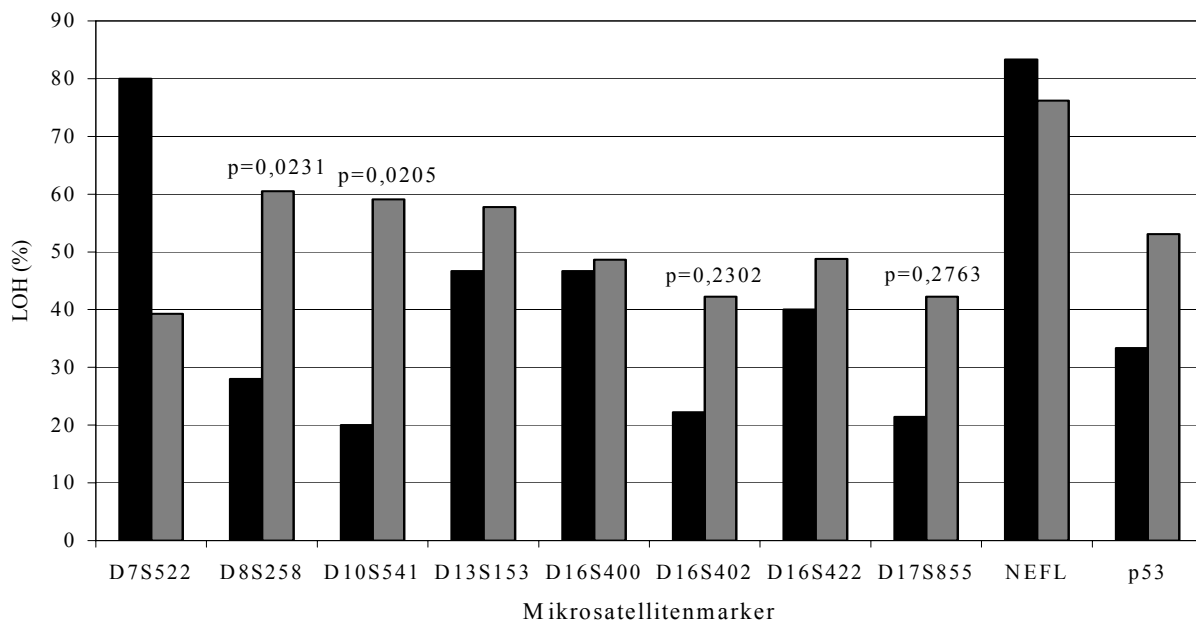


Abb.16: Prozentualer Anteil an LOH der Mikrosatellitenmarker in Relation zum Grading. Gesamtverteilung: $n = 76$; n mit Grading $< 2 = 17$; n mit Grading $\geq 2 = 55$; n ohne Angaben = 4 (■ = LOH bei Grading < 2 ; ▒ = LOH bei Grading ≥ 2)

Deutliche Unterschiede mit höherem Anteil an LOH in der Klasse Grading ≥ 2 zeigen die heterozygoten Merkmalsträger für die Marker D8S258 (61% zu 28% in der Gruppe Grading <2) und D10S541 (59% zu 20% in der Gruppe Grading <2). Die Unterschiede sind mit $p=0,0231$ für den Marker D8S258 und $p=0,0205$ für Marker D10S541 statistisch signifikant. Die Marker D13S153, D16S402 und D17S855 folgen dem gleichen Trend. Die beiden zuletzt genannten Marker zeigen mit $p=0,2302$ (D16S402) und $p=0,2763$ (D17S855) sehr deutliche Unterschiede. Für Marker D7S522 überwiegt der LOH-Anteil der Gruppe Grading <2 (80% zu 39% in der Gruppe Grading ≥ 2). Für die übrigen Marker sind keine deutlichen Unterschiede festzustellen.

3.3.1.2.3. Häufigkeit eines LOH der informativen Fälle in Relation zum Gleason-Score

Die Verteilung der Patienten erfolgte bezüglich des Gleason-Scores in die Klassen Gleason 1-6 und Gleason 7-10 eingeteilt. Die erste Gruppe war 24 Patienten stark, die zweite mit den höheren Gleason-Werten bestand aus 48 Patienten. Für 4 Patienten standen bezüglich des Gleason-Scores keine Angaben zur Verfügung.

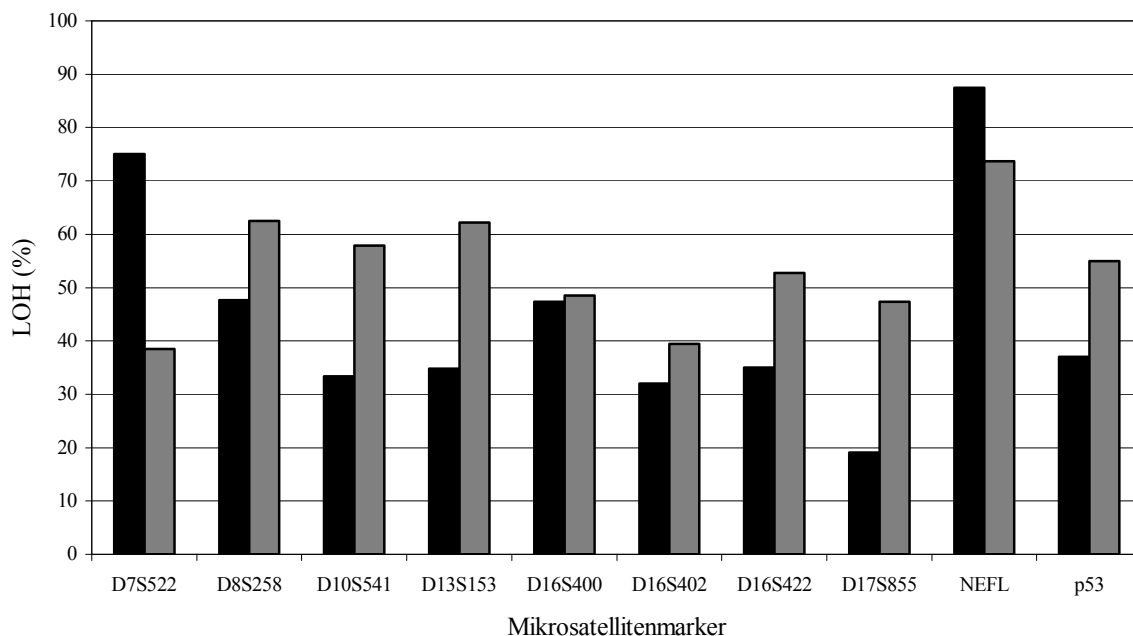


Abb.17: Prozentualer Anteil an LOH der Mikrosatellitenmarker in Relation zum Gleason-Score. Gesamtverteilung : $n = 76$ n mit Gleason 1-6 = 24; n mit Gleason 7-10 = 48 Patienten; n ohne Angabe = 4 (■ = LOH bei Gleason 1-6; ■ = LOH bei Gleason 7-10)

Ein Überwiegen von LOH in der Gruppe Gleason 1-6 ist in Marker D7S522 (75%) und Marker NEFL (88%) zu beobachten.

Alle anderen Marker und hier besonders die Marker D8S258 (63%), D10S541 lassen sich keine deutlichen Unterschiede bezüglich des LOH-Anteils feststellen. Lediglich Marker D13S153 und Marker D17S855 zeigen einen deutlichen Unterschied mit mehr LOH in der Gruppe Gleason 7-10. Der gleichen Tendenz folgt die Verteilung für die Marker D16S422 und p53.

Bei keinem der Marker ist jedoch eine signifikante Unterscheidung festzustellen.

3.3.1.2.4. Häufigkeit eines LOH der informativen Fälle in Relation zum PSA-Wiederaanstieg

Nach erfolgter radikaler Prostatektomie ist ein PSA-Wiederaanstieg prognostisch als sehr ungünstig zu bewerten ist und es muß von einem Rezidiv ausgegangen werden. Im Rahmen des "Follow-up" konnte im Kollektiv der Patienten mit monofokalen Tumoren bei 15 Patienten ein PSA-Wiederaanstieg beobachtet werden, 61 Patienten zeigten keinen PSA-Wiederaanstieg.

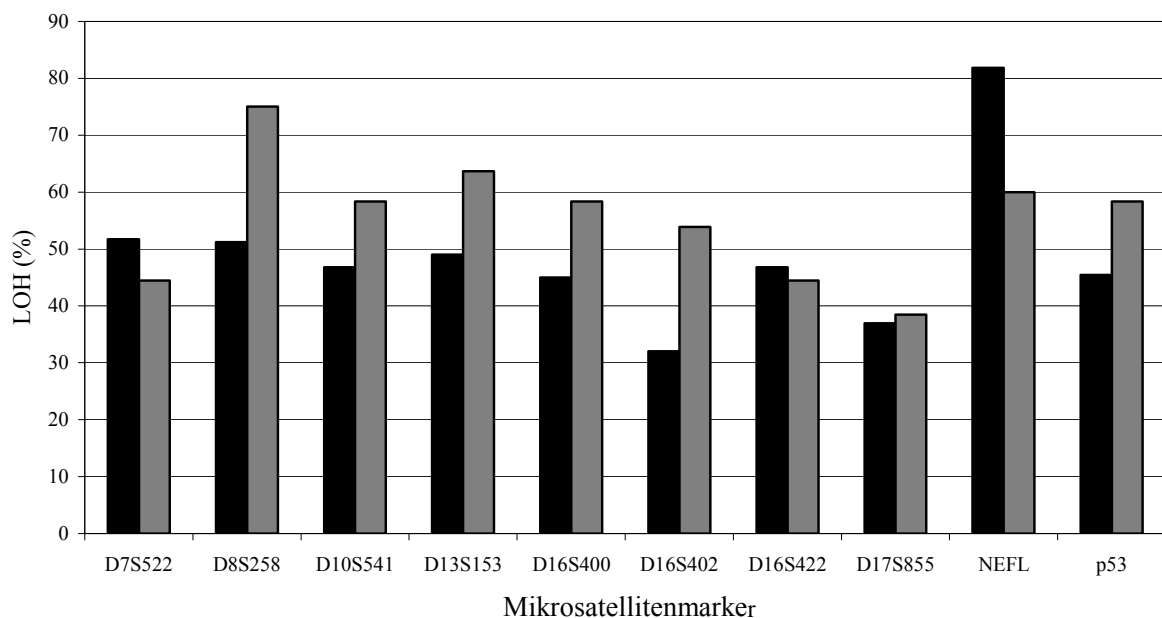


Abb.18: Prozentualer Anteil an LOH der Mikrosatellitenmarker in Relation zum PSA-Wiederaanstieg. Gesamtverteilung: n = 76 n mit PSA-Wiederaanstieg = 15; n ohne PSA-Wiederaanstieg = 61 (■ = LOH ohne PSA-Wiederaanstieg; ▒ = LOH mit PSA-Wiederaanstieg)

In der Gruppe der Patienten mit PSA-Wiederaufstieg zeigen 7 von 10 Markern der heterozygoten Merkmalsträger häufiger einen LOH. Besonders eindrucksvoll ist der Unterschied für die Marker D8S258 (75%) und D16S402 (54%). Ein Überwiegen des LOH-Anteils im Kollektiv der informativen Fälle ohne PSA-Wiederaufstieg zeigt ganz besonders der Marker NEFL mit 82%. Auffällig ist die Gegenläufigkeit mit der sich die Marker D8S258 und Marker NEFL darstellen, obwohl sie sehr nah beieinander auf Chromosom 8p liegen. Keiner der Unterschiede ist hier jedoch als statistisch signifikant zu bewerten. Wäre das Kollektiv größer, so würde möglicherweise eine statistische Signifikanz erreicht. Dies könnte als Hypothese für eine größere Studie genutzt werden.

3.3.2. Allelische Imbalancen der Marker der 16 Patienten mit bifokalen Tumoren in Korrelation zu klinischen und histopathologischen Parameter

Auf Grund des relativ kleinen Kollektivs wird auf eine graphische Darstellung verzichtet.

3.3.2.1. Präoperativ erhobene Daten

3.3.2.1.1. Häufigkeit eines LOH der informativen Fälle in Relation zum Lebensalter der Patienten

Anhand des für das Gesamtkollektiv ermittelten mittleren Lebensalters von 64 Jahren wurde auch für das Kollektiv der 16 Patienten eine Einteilung in die zwei Klassen:

1. Alter jünger als 64 Jahre
2. Alter gleich oder älter 64 Jahre

vorgenommen.

Der 1. Gruppe konnten 5 Patienten zugeordnet werden, der 2. Gruppe 11 Patienten.

Bei der Auswertung der heterozygoten Merkmalsträger zeigten sich in der Gruppe der jüngeren Patienten die Mikrosatellitenmarker D10S541, D16S402 und D13S153 besonders auffällig, da in diesen Markern entweder alle oder n-1 der heterozygoten Patienten LOH aufwiesen. Dies bedeutet im Einzelfall, dass von den informativen Fällen bezüglich des Markers D10S541 von 5 betroffenen Patienten 4 jünger als 64 Jahre sind, bei Marker D13S153 sind alle 4 Betroffenen < 64 Jahre und bei Marker D16S402 von 5 betroffenen Fällen 4 jünger als 64 Jahre. In der Gruppe der Patienten \geq 64 Jahre fiel als einziger der Marker D8S258 auf, bei dem von insgesamt 6 betroffenen Merkmalsträgern 5 ein höheres Lebensalter hatten.

3.3.2.1.2. Häufigkeit eines LOH der informativen Fälle in Relation zum t-PSA

Die Bestimmung der t-PSA-Serumkonzentration wurde auch bei den 16 Patienten mit bifokalen Tumoren durchgeführt. Dem Grenzwert 10 ng/ml folgend, wurden auch für diese Patienten zwei Klassen gebildet, zu denen zum einen 7 Patienten mit t-PSA < 10 ng/ml gehörten. Die zweite Gruppe mit einem t-PSA \geq 10 ng/ml umfasste auch 8 Patienten. Für einen Patienten lag bezüglich des t-PSA-Wertes keine Angabe vor.

Von den untersuchten Mikrosatellitenmarkern sind in der Gruppe der Patienten mit t-PSA-Wert \geq 10 ng/ml die Marker D8S258 mit 4 von insgesamt 4 informativen Fällen, D10S541 mit 6 von 8 informativen Fällen und D13S153 mit 7 von 8 informativen Fälle hervorzuheben.

3.3.2.1.3. Häufigkeit eines LOH der informativen Fälle in Relation zum präoperativen Palpationsbefund

Da für 7 der 16 Patienten mit bifokalen Tumoren bezüglich des Palpationbefundes keine Angaben vorlagen, wurde auf eine Auswertung der Daten verzichtet.

3.3.2.1.4. Häufigkeit eines LOH der informativen Fälle in Relation zu von PCa betroffenen Blutverwandten

Unter den 16 Patienten mit bifokalen Tumoren konnten für 3 dieser Patienten mit an Prostatakarzinom erkrankte Blutsverwandte ermittelt werden. Unter den heterozygoten Merkmalsträgern zeigen sich die Marker D13S153 mit von LOH 3 von insgesamt 3 informativen Fällen, D16S422 mit 2 von 3 und Marker p53 mit 3 von 3 Fällen als besonders auffällig.

3.3.2.2. Postoperativ erhobenen Daten

3.3.2.2.1. Häufigkeit eines LOH der informativen Fälle in Relation zum pT-Stadium

Entsprechend der festgelegten Einteilung konnten unter den Patienten mit bifokalen Tumoren für die Klasse pT1-2c insgesamt 8 Patienten und dementsprechend für die Klasse pT3a-4 auch 8 Patienten zugeordnet. Von den informativen Fällen zeigten sich in der Klasse der Merkmalsträger mit den höheren Tumorstadien die Marker D8S258 mit von LOH betroffenen 3 von insgesamt 4 informativen Fällen und der Marker p53

mit 3 von insgesamt 5 informativen Fällen. Im Gegensatz dazu waren die Marker D10S541 (in 4 von 5 Fällen) und NEFL (in 3 von 3 Fällen) in der Gruppe der informativen Merkmalsträger mit Tumorstadium pT1-2c besonders auffällig.

3.3.2.2.2. Häufigkeit eines LOH der informativen Fälle in Relation zum Grading

Der Verteilung folgend, die schon für die monofokalen Tumoren getroffen wurde, konnten für die bifokalen Tumoren 6 der Klasse Grading < 2 und 10 Tumoren der Klasse ≥ 2 festgestellt werden. In der Klasse Grading ≥ 2 waren für Marker D8S258 alle 5 informativen Fälle von LOH betroffen. Bei Marker D13S153 sind in derselben Grading-Gruppe alle 10 heterozygoten Merkmalsträger betroffen. Auch Marker NEFL zeigte LOH bei allen 3 informativen Fällen.

3.3.2.2.3. Häufigkeit eines LOH der informativen Fälle in Relation zum Gleason-Score

Von den bifokalen Tumoren konnten 6 Patienten der Klasse Gleason 1-6 und 10 Patienten der Klasse 7-10 zugeordnet werden. Auffällige Mikrosatellitenmarker für diesen Parameter sind in der Gruppe Gleason 7-10 die Marker D8S258 mit betroffenen 6 von insgesamt 6 informativen Fällen, der Marker D10S541 mit 8 von 10 und Marker D13S153 mit 8 von insgesamt 9 informativen Fällen. In der Gruppe Gleason 1-6 zeigen die Marker D16S402 LOH bei 3 von 4 und der Marker p53 LOH bei 4 von 5 der informativen Fälle.

3.3.2.2.4. Häufigkeit eines LOH der informativen Fälle in Relation zum PSA-Wiederaanstieg

Für das Kollektiv der 16 Patienten mit bifokalen Tumoren wurde im Rahmen des Follow-up bei 2 Patienten ein PSA-Wiederaanstieg ermittelt. Bei 14 Patienten lag die PSA-Serumkonzentration weiterhin unter der Nachweisgrenze. Mikrosatellitenmarker D13S153 zeigte 2 von LOH betroffene bei insgesamt 2 informativen Fällen, die Marker D8S258, D10S541, D17S855 und p53 jeweils 1 von LOH betroffenen Fall von insgesamt auch je 2 heterozygoten Merkmalsträgern.

3.3.2.2.5. Häufigkeit eines LOH der informativen Fälle in Relation zum Nodalstatus

Der Klasse der nodalnegativen Patienten konnten aus dem Kollektiv der 16 Patienten mit multifokalen Tumoren 9 Patienten zugeordnet werden. Zwei Patienten waren nodalpositiv und für 5 Patienten lagen bezüglich des Lymphknotenstatus (LK) keine Angaben vor. Für die Marker D8S258, D13S153 und D17S855 konnte für jeweils beide nodalpositiven heterozygoten Merkmalsträger ein LOH festgestellt werden. Jeweils 1 LOH bei 2 informativen Fällen zeigten die Marker D10S541, D16S402 und p53.

3.3.2.2.6. Häufigkeit eines LOH der informativen Fälle in Relation zum Befund der Prostatakapsel

Für die Verteilung in die Klasse Prostatakapsel tumorfrei konnte aus dem Kollektiv der 16 Patienten 1 Patient ermittelt werden. Bei 15 Patienten war die Prostatakapsel durch den Tumor infiltriert oder penetriert. In der Gruppe dieser Patienten zeigten sich besonders die Marker D8S258 (mit 6 LOHs bei 8 informativen Fällen), D13S153 (mit 11 LOHs bei 13 informativen Fällen) und NEFL (mit 3 LOHs bei 4 informativen Fällen) auffällig. 10 LOHs bei 15 heterozygoten Merkmalsträgern konnte für Marker D10S541 ermittelt werden. Marker p53 wies 7 LOHs bei 11 informativen Fällen auf.

3.3.2.2.7. Häufigkeit eines LOH der informativen Fälle in Relation zum Schnitttrand

Die Einteilung in die Klassen bezüglich des Schnitttrandes folgte der, die schon für das Kollektiv der 76 Patienten vorgenommen wurde. Nach histologischer Begutachtung des Schnitttrandes des Resektates wurden 10 Patienten der Klasse Schnitttrand tumorfrei und der Klasse Schnitttrand nicht tumorfrei 6 Patienten zugeordnet. Für die Klasse Schnitttrand tumorfrei konnte für den Marker D13S153 von insgesamt 10 informativen Fällen bei 9 LOHs festgestellt werden. Alle anderen auffälligen Marker finden sich in der Klasse Schnitttrand nicht tumorfrei. Es handelt sich um die Marker D8S258 (mit 3 LOHs bei 4 informativen Fällen), D10S541 (mit 6 LOHs von 8 informativen Fällen) und D13S153 (mit 6 LOHs bei 7 informativen Fällen). Auch Marker p53 zeigt mit 5 LOH bei insgesamt 6 heterozygoten Merkmalsträgern eine hohe LOH-Häufigkeit.

3.3.2.2.8. Häufigkeit eines LOH der informativen Fälle in Relation zum Tumorumen

Die histologische Bestimmung des Tumorumens ergab im Kollektiv der 16 Patienten mit multifokalen Tumoren nach Festlegung des Median bei 6 ml die Einordnung von 8 Patienten in die Klasse Tumorumen < 6 ml, die übrigen 8 Patienten konnten der Klasse Tumorumen ≥ 6 ml zugeordnet werden. Eine auffällige LOH-Häufigkeit konnte in der Klasse mit Tumorumen ≥ 6 ml für die Marker D13S153 (mit 7 LOHs bei 7 informativen Fällen) und D10S541 (mit 6 LOHs bei 8 informativen Fällen) beobachtet werden. In der Klasse Tumorumen < 6 ml zeigten für den Marker D8S258 alle 4 heterozygoten Merkmalsträger einen LOH.

3.4. Clusteranalysen

3.4.1. Clusteranalyse der monofokalen Tumoren

Um eventuelle Ähnlichkeiten der 76 monofokalen Tumoren in Bezug auf bestimmte Markerkombinationen feststellen zu können, wurde das Kollektiv einer Clusteranalyse unterzogen. Es wurden die Algorithmen *Average linkage* und *Complete linkage* angewendet.

In Abbildung 19 und 20 sind die entsprechenden Markerbäume (A) und Patientenbäume (B) graphisch dargestellt. Bereiche mit LOH sind grau unterlegt, Bereiche ohne LOH sind schwarz unterlegt.

3.4.1.1. Average linkage-Clusteranalyse

Insgesamt lassen sich im Markerbaum 5 größere Cluster erkennen (Abb. 19 A). Der erste Cluster wird durch den LOH des Markers D10S541 bestimmt. Er hält eine Gruppe von Tumoren zusammen, die neben diesem auch häufig von LOH der Marker D16S402 und D16S422 betroffen sind. Die Verbindung dieser 3 Marker ist auch im Patientenbaum deutlich zu beobachten (Abb.25 Ia). Der 2. Hauptcluster wird durch den Marker D16S400 festgelegt. In Kombination mit diesem tritt in dieser Gruppe häufig der Marker D8S258 auf. Dieses Paar ist auch Genbaum als signifikanter Ast wiederzufinden (Abb.25 Ia). Innerhalb des Clusters um Marker D16S400 erscheint ein Subcluster, das durch die Verbindung zu Marker p53 und D13S153 besonders auffällig wird. Der Marker D17S855 bildet ein kleines Subcluster, das er nahezu allein bestimmt, zudem

erscheint er zusammen mit Marker D7S522 als Cluster. Die Kombination der Marker D13S153 und p53 einerseits und der Marker NEFL andererseits bilden jeweils eigene Cluster, kommen jedoch auch in Verbindung miteinander vor. Auch sind diese 3 Marker häufig in den Clustern um D16S400 und D10S541 zu finden. Dieses erklärt die Mittelstellung, die ihnen im Genbaum zugeordnet wird (Abb.32 Ia).

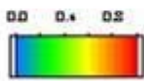
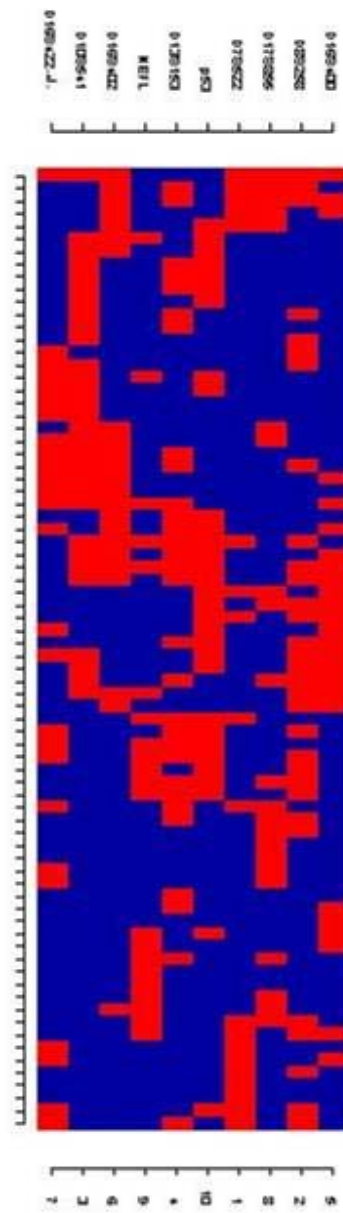
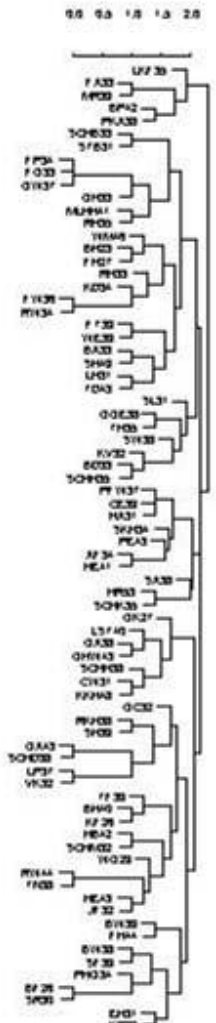
Innerhalb des Patientenbaumes (Abb.19 B) treten zwei Patientengruppen deutlich hervor. Zum einen handelt es sich um 3 Patienten (FP43, FG33, GW37) deren Zugehörigkeit zu einem Cluster durch den gemeinsamen LOH der Marker D10S541 und p53 gekennzeichnet ist. Im Vergleich zu histologischen und klinischen Parametern zeigen sie weitere Übereinstimmungen. Sie waren bei Entdeckung der Erkrankung über 64 Jahre alt und der PSA-Wert lag bei allen deutlich über 10 ng/ml. Histologisch wurde für alle ein Grading ≥ 2 und eine Gleason-Summe 7-10 festgestellt. Alle Präparate zeigten Kapselinfiltration oder -penetration. Die Tumorumfänge maßen jeweils über 6 ml. Alle hatten an Prostatakrebs erkrankte Familienangehörige.

Das zweite auffällige Patientencluster wird durch LOH des Markers D8S258 bestimmt und umfasst 4 Patienten (GA43, SCHD38, LP37, VK32). Übereinstimmend zum LOH findet sich klinisch bzw. histologisch eine hohes Grading, einen hohen Gleason-Score und bei allen eine Kapselinfiltration oder -penetration.

3.4.1.2. Complete linkage-Clusteranalyse

Auch nach diesem Algorithmus geordnet (Abb.20), lassen sich in diesem Kollektiv die gleichen Markerkombinationen und Clusterbildungen erkennen, die sich schon unter der Methode *Average linkage* gezeigt haben.

Die Hauptcluster, die durch die Marker D10S541, D16S400, die Kombination von D17S855 und D7D522, NEFL und die Kombination von p53 mit Marker D13S153 zusammengehalten werden bleiben weiterhin existent, erfahren jedoch auf Grund des anderen Zuordnungsverfahrens kleine Änderungen und Verschiebungen. Diese lassen sich im Genbaum (Abb.25 Ib) an den etwas veränderten Positionen der Markerkombinationen belegen. An der Grundpaarung der Marker ändert sich jedoch nichts.

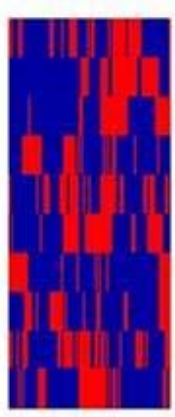
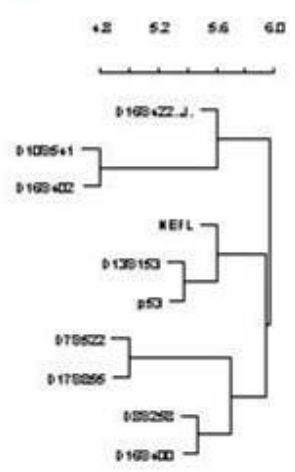


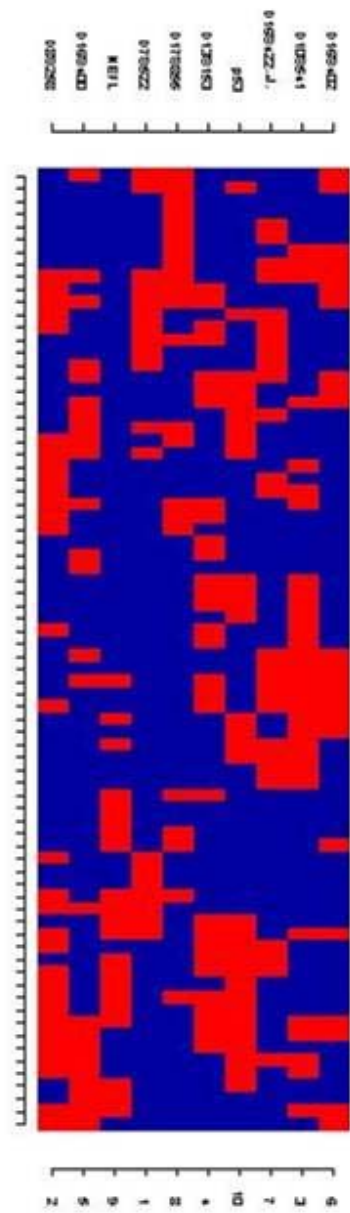
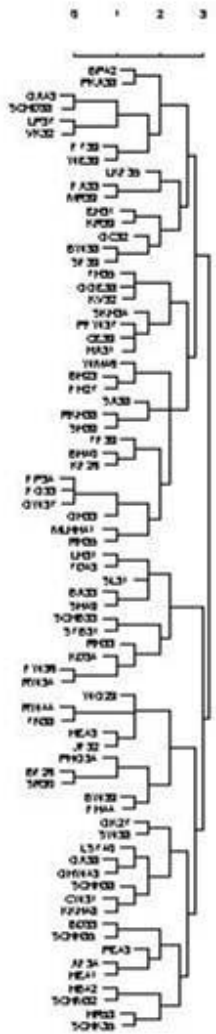
Two way hierarchical clustering

Data: Monofokale_01
 Variables: D7S522 ... p53
 Observables: AF34 ... VM46
 Sub set: 1:76
 Num. of Variables: 10 Observables: 76
 Model: hclust (hierarchical clustering)
 Method: average (group average linkage)
 Metric: euclidean (root(sum of squares))
 Scale: FALSE , rows: no , cols: no



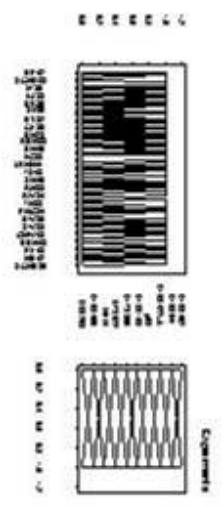
Profil of 0168422.J, ... 0168423
 Cluster of 0168422.J, ... 0168423





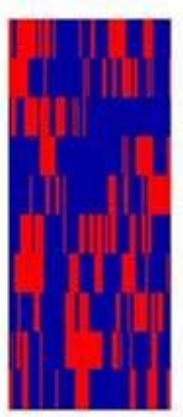
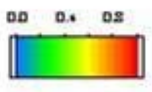
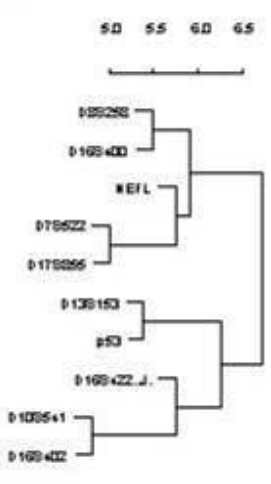
Two way hierarchical clustering

Data: Monofokale_01
 Variables: D7S522 ... p53
 Observables: AF34 ... VMM46
 Sub set: 1:76
 Num. of Variables: 10 Observables: 76
 Model: hclust (hierarchical clustering)
 Method: compact (complete linkage)
 Metric: euclidean (root(sum of squares))
 Scale: FALSE , rows: no , cols: no



Profile of distances ... 0169422

Number of distances ... 0169422



3.4.2. Clusteranalyse der bifokalen Tumoren

Um festzustellen, wie die Gesamtverteilung des Kollektives der 16 Patienten mit den bifokalen Tumoren aussieht und sich eventuell darstellen läßt, ob die beiden Foci eines bifokalen Tumors gleiche, ähnliche oder unterschiedliche genetische Markerkombinationen aufweisen wurden mit den Ergebnissen der genetischen Untersuchungen der bifokalen Tumoren Clusteranalysen durchgeführt. Zusätzlich sollte ermittelt werden, ob bestimmte Marker zusammen clustern. Gewählt wurden hierzu wiederum die Methoden *Complete linkage* und *Average linkage*.

Betrachtet man bei den 16 Tumoren jeweils die zwei einzelnen Foci (s. Tab. 18, Abschnitt 3.2) so fällt auf, daß sich die Tumorfoci eines Organs sich nicht alle genetisch gleich verhalten, sondern sich bezüglich des Auftreten eines LOH unterschiedlich darstellen (grau unterlegt). Diese Unterschiede lassen sich bei 15 der 16 bifokalen Tumoren beobachten. Einige Patienten zeigen nur für einen Marker ungleiche Foci, manche jedoch für bis zu 4 verschiedenen Marker. Der Marker, der in diesem Kollektiv am häufigsten durch unterschiedliche Tumorfoci auffällt, ist Marker D10S541. Für ihn weisen 7 von 15 Patienten Unterschiede auf.

Die Tumorfoci der entsprechenden Patienten wurden durch beide Clustering-Algorithmen auf Grund ihrer Ähnlichkeiten bezüglich LOH auf den verschiedenen Markern geordnet. Die so entstandenen Gruppen sind im Markerbaum in Abbildung 21 und 22 graphisch dargestellt. Bereiche mit LOH sind hier grau, Bereiche ohne LOH schwarz dargestellt. Zusätzlich findet sich in Abb. 25 die Darstellung der Genbäume. Hier wurden die genetischen Marker entsprechend der Häufigkeit ihres gemeinsamen Auftretens zusammengeclustert.

3.4.2.1. Average-linkage-Clusteranalyse

Die Anordnung der 32 Tumorfoci der 16 Patienten in Abbildung 21 zeigt, daß es Foci jeweils eines Patienten gibt, die direkt zusammen clustern, was indiziert, das beide Foci eine gleiche oder sehr ähnliche Markerkombination aufweisen. In diesem Kollektiv lassen sich unter Anwendung dieses Algorithmus 5 Patienten feststellen für die dies zutrifft. 11 Patienten zeigen jedoch Tumorfoci, die sich heterogen verhalten. Sie sind weder identisch, noch einander ähnlich, und zeigen zu Foci anderer Patienten mehr Ähn-

lichkeit. Die 2 Foci der einzelnen Patienten liegen dann jeweils sehr weit auseinander, und zeigen keine verbindenden genetischen Eigenschaften.

Insgesamt lassen sich 3 Hauptcluster und ein Bereich mit wenigen genetischen Veränderungen feststellen. Das erste auffällig große Cluster wird durch den gemeinsamen LOH von Marker D10S541 bestimmt. Dieser Marker hält das Cluster zusammen. Der zweithäufigste Marker, der in diesem Cluster von LOH betroffen ist, ist der Marker D16S402. Auch LOH von Marker D8S258 sind in diesem Cluster häufig zu beobachten. Auch wird eine Verbindung zu Marker D13S153 deutlich, jedoch ist dies ein Marker, der in diesem Kollektiv die meisten LOH aufweist und daher häufig zu finden ist.

Der Marker D13S153 bildet selbst ein weiteres, eigenes großes Cluster. Innerhalb dieses Clusters finden sich häufig gleichzeitig LOH des Markers p53. Dieser ist nach D13S153 der zweithäufigste Marker, bei dem man in diesem Kollektiv einen LOH findet. Bei Betrachtung des Genbaums stehen daher die Marker D13S153 und p53 an der Basis. Der dritte Marker, der mit diesen beiden zusammenclustert ist der Marker D16S422.

Das 3. Hauptcluster wird durch den Marker D16S400 bestimmt. Hier findet sich ein Bereich, in dem viele unterschiedliche genetischen Veränderungen zu finden sind. Innerhalb dieses von D16S400 zusammengehaltenen Clusters findet sich ein Subcluster, das durch Verbindung mit dem Marker NEFL gebildet wird. Diese Zweierkombination erscheint im Genbaum als Außenast (Abb.25 IIa). NEFL ist außer in diesem Cluster in keinem anderen Bereich des Markerbaums vertreten. Andere Marker die innerhalb des D16S400-Clusters häufiger auftauchen sind D16S422, D17S855 und p53. Der Marker p53 sowie Marker D13S153 sind in diesem Cluster auf Grund ihrer Häufigkeit an LOHs auch in diesem Cluster zu finden, was im Genbaum (Abb.32 IIa) durch ihre Stellung an der Basis verdeutlicht wird. Als eine Art „Grauzone“ stellt sich im Markerbaum ein Bereich dar, in dem Foci eingeordnet werden, die keine oder geringste genetische Veränderungen aufweisen, und daher keiner Gruppe zuzuordnen sind.

Der Marker D7S522 nimmt in diesem Kollektiv eine Sonderstellung ein, da nur für einen der 32 Foci ein LOH gefunden wurde. Da er zusammen mit dem Marker D17D855 in diesem Kollektiv am wenigsten LOH aufweist, sind diese beiden Marker im Genbaum in direkter Nachbarschaft zueinander zu finden (Abb. 25 IIa).

3.4.2.2. *Complete linkage*-Clusteranalyse

Die Abbildung 22 stellt für das Kollektiv die entsprechenden Phenogramme dar, nachdem die Daten der 16 Patienten mit bifokalen Tumoren (32 Tumorfoci) mittels der Methode *Complete linkage* analysiert wurden.

Auch nach diesem Algorithmus geordnet, zeigen die gleichen 5 Patienten in Bezug auf ihre Tumorfoci identische bzw. sehr ähnliche Markerkombinationen. Diese Tumorfoci clustern direkt zusammen. Alle anderen Foci verhalten sich wiederum heterogen.

Auch unter diesem Algorithmus lassen sich 3 Hauptcluster erkennen, die jeweils durch LOH der Marker D10S541, D13S153 und D16S400 bestimmt werden. Daneben besteht wiederum ein Bereich, der durch die Gruppe der Tumorfoci gebildet wird, die keine oder nur geringste Ähnlichkeiten in ihrer Markerkombination aufweist.

Innerhalb der 3 Hauptcluster kommt es auf Grund des unterschiedlichen Algorithmus zu minimalsten Verschiebungen, die einzelne Tumorfoci betreffen. Insgesamt bleiben die schon durch die Methode *Average linkage* ermittelten Cluster bzw. Markerkombinationen der Cluster nahezu identisch.

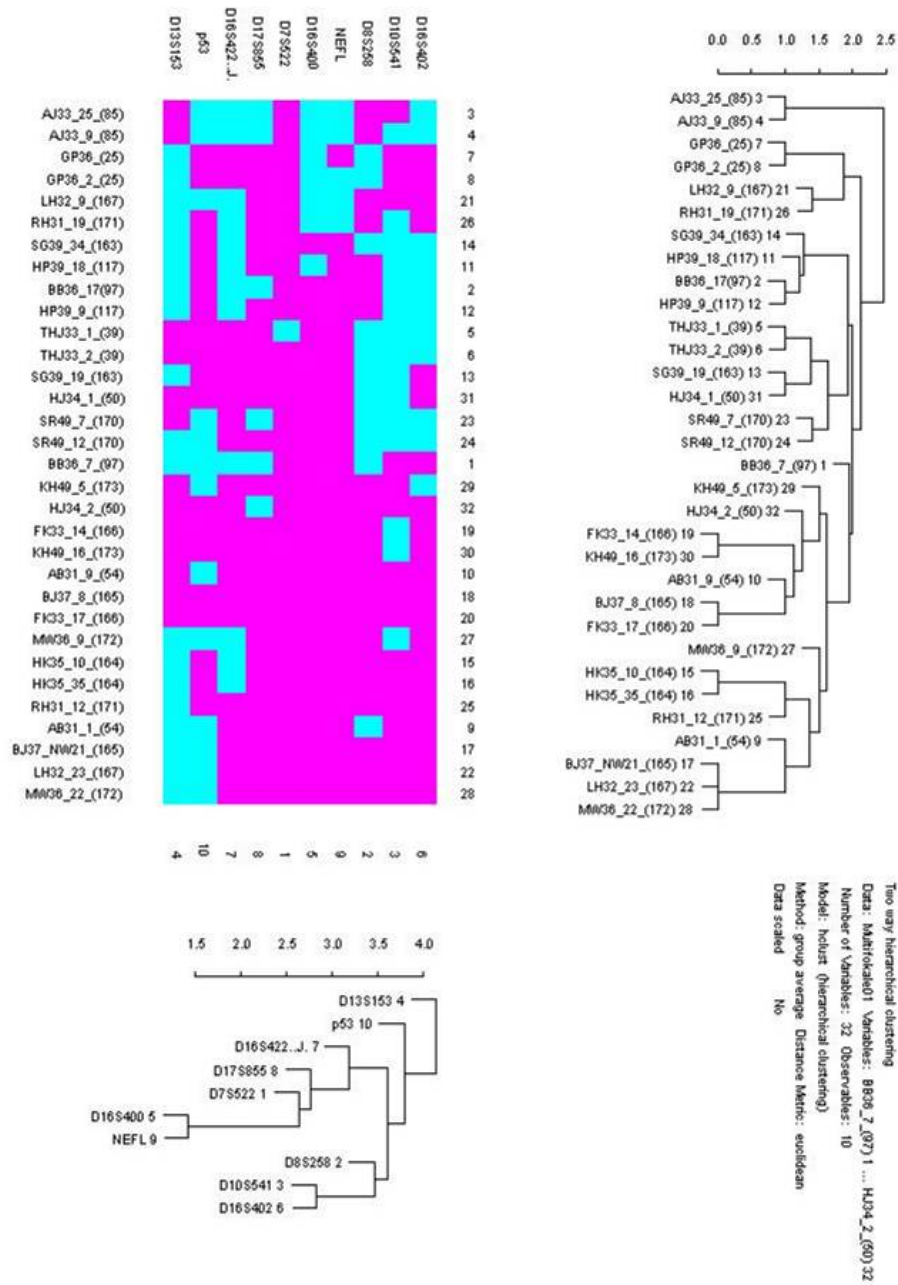


Abb.28

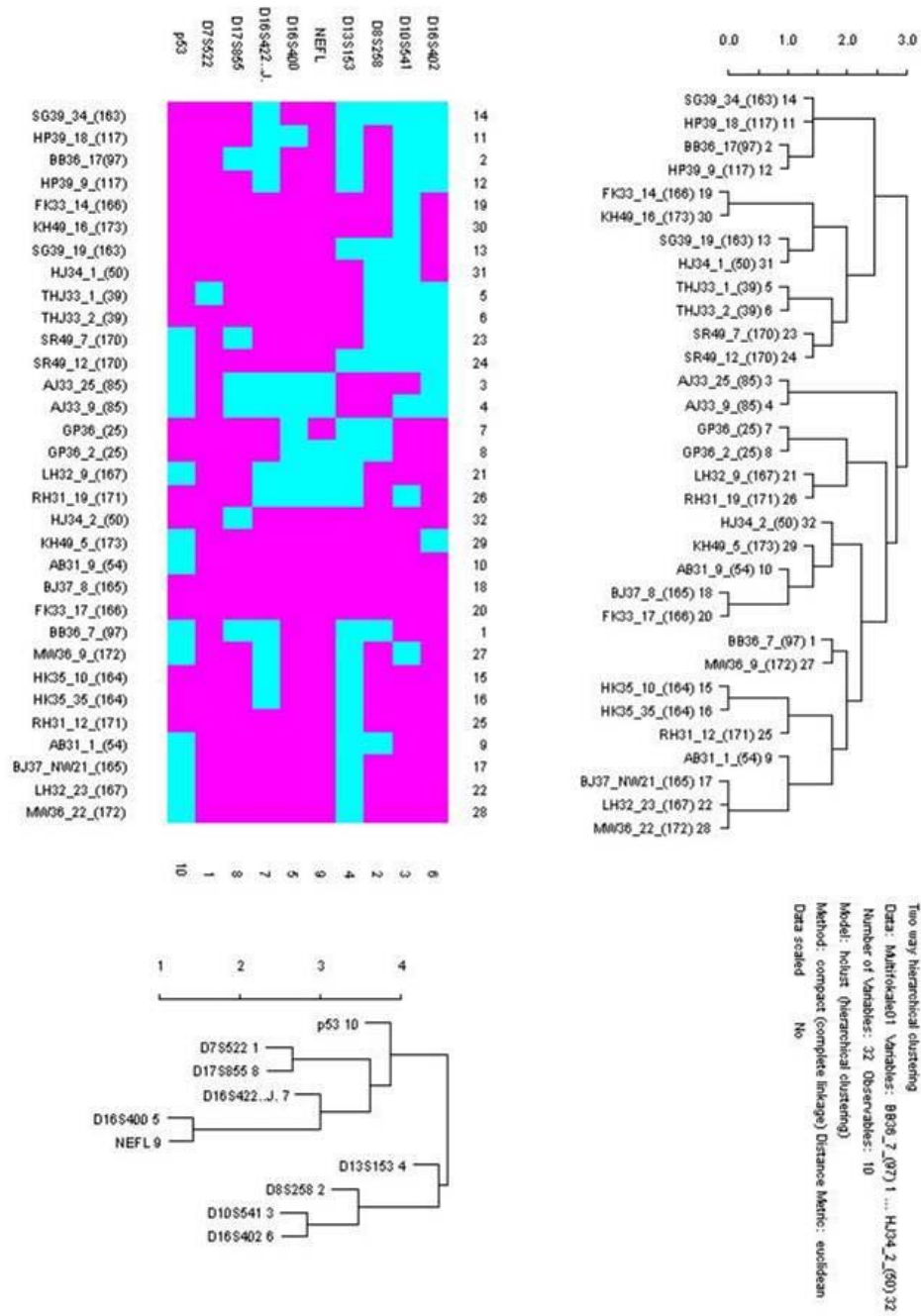


Abb.29

2.4.3. Vergleich der Subkollektive

Beim Vergleich des Kollektivs der 76 monofokalen Foci zu den 32 bifokalen Foci lassen sich sowohl Unterschiede als auch Übereinstimmungen bzw. Ähnlichkeiten in Bezug auf genetische Eigenschaften und Markerkombinationen feststellen.

Ganz eindeutig für beide Kollektive zeigt sich die Dominanz der Markerkombination D10S541 / D16S402. Diese beiden Marker clustern in beiden Kollektiven direkt zusammen. Als einzige Veränderung ist hier das Verhalten des Markers D16S422 zu beschreiben, der im Kollektiv der 76 monofokalen Tumoren mit der oben beschriebenen Markerkombination clustert, im Kollektiv der 32 bifokalen Tumoren dem Cluster um Marker D17S855 zuzuordnen ist.

Während die Marker D13S153 und p53 im Kollektiv der 76 monofokalen Tumoren ein Cluster bilden, das sich im Markerbaum als eine von 5 Gruppen darstellt, findet sich diese Kombination im Kollektiv der 32 bifokalen Tumoren an der Basis wieder, denn in diesem Kollektiv zeigen diese beiden Marker sehr häufig einen LOH. In beiden Kollektiven besteht zwischen diesen beiden Markern aber eine deutliche Nähe, zudem sind sie zumeist in allen Clustern der Kollektive auch vertreten.

Während NEFL im Kollektiv der monofokalen Tumorpatienten ein eigenes Cluster darstellt, das sich an die Kombinationen D16S400 / D8S258 und D17S855 / D7S522 anlehnt, zeigen sich im Kollektiv der 32 bifokalen Tumoren die Positionen dieser Marker ein wenig verändert. Der Marker NEFL clustert hier eindeutig mit Marker D16S400 zusammen. Die Kombination D17S855 / D7S522 bleibt bestehen, auch die Nähe zu NEFL ist noch existent. Der Marker D8S258 jedoch wird nun häufig in Kombination mit D10S5412 und D16S402 gesehen. Obwohl der Marker D7S522 im bifokalen Kollektiv mit einem LOH auf nur einem Focus deutlich unterrepräsentiert war, bestätigt sich auch in dieser Clusteranalyse seine Nähe zu dem Marker D17S855, die schon im Kollektiv der 76 monofokalen Tumoren zu beobachten war.

3.4.4. Clusteranalyse des Gesamtkollektivs

Um Aussagen über bestimmte Markerkombinationen im Gesamtkollektiv machen zu können, wurden die Daten des Kollektivs der 76 Patienten mit monofokalen Tumoren und die des Kollektivs der 16 Patienten mit bifokalen Tumoren zusammengefügt. Für die Clusteranalysen der 108 Tumorfoci wurden wiederum die Algorithmen *Average*

linkage und *Complete linkage* angewendet. Die entsprechenden Phenogramme sind in Abbildung 23 und 24 dargestellt. Bereiche mit LOH sind grau, Bereiche ohne LOH schwarz unterlegt. Die Genbäume hierzu finden sich in Abbildung 25 III a und 25 III b.

3.4.4.1. Average linkage-Clusteranalyse

Im Patientenbaum (Abb. 23 B) finden sich unter den Gesamtfoci 6 Tumorfoci von 3 Patienten mit bifokalen Tumoren die direkt zusammen clustern. Bei 5 Patienten mit bifokalen Tumoren liegen die zugehörigen Foci in unmittelbarer Nachbarschaft. Dieses bedeutet, daß sie sich bezüglich der Markerkombination relativ ähnlich verhalten, es jedoch Foci aus dem Gesamtkollektiv gibt, denen sie ähnlicher sind. Die anderen bifokalen Foci liegen sehr verstreut und zeigen somit keine oder nur geringste Ähnlichkeiten mit dem Zweitfocus desselben Tumors.

Auch für das Gesamtkollektiv finden sich bestimmte Marker und Markerkombinationen, die es in unterschiedliche Cluster einteilt. Diese Cluster zeigen deutliche Übereinstimmungen zu denen der anderen beiden Kollektive.

Ein Hauptcluster wird wiederum durch den Marker D10S541 bestimmt. Unter seiner Führung und zusammen mit den Markern D16S402 und D16S422 beschreibt er eine große Gruppe von Foci, deren Eigenschaften durch einen LOH dieser 3 Marker definiert sind. Auch im Genbaum (Abb. 25 IIIa) grenzt sich diese Markerkombination deutlich sichtbar von anderen ab.

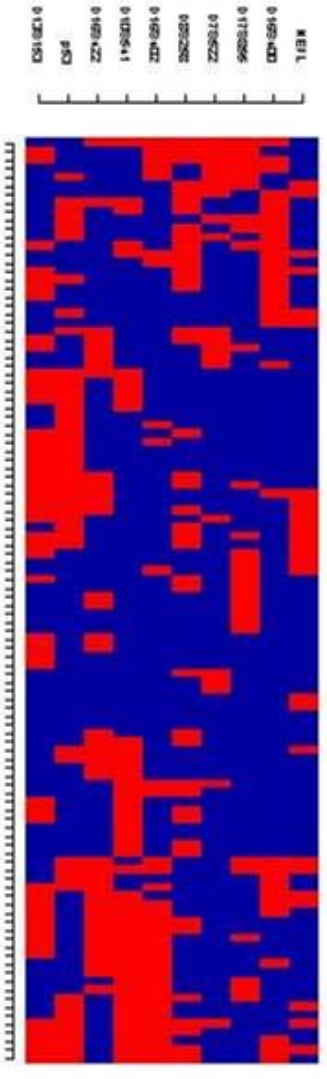
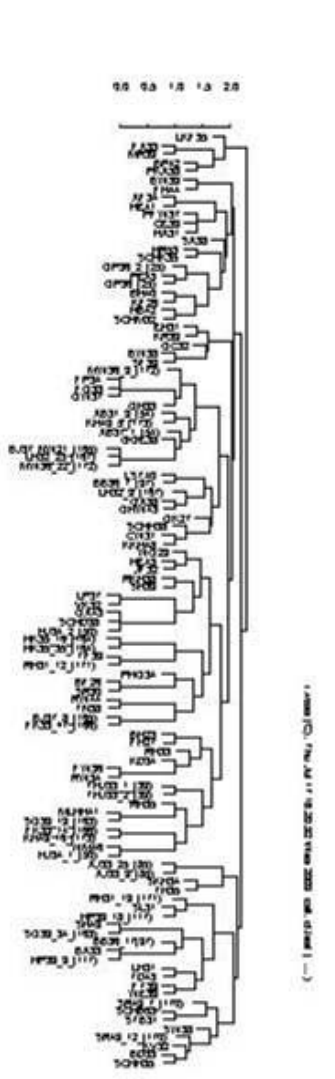
Das 2. Hauptcluster wird durch den Marker D16S400 festgelegt. Zum einen findet sich ein Subcluster, das ihn in naher Verbindung zu Marker NEFL zeigt, ein anderes stellt die Nähe zu Marker D8S258 dar. Ein weiteres Hauptcluster wird durch die Kombination von Marker D17S855 und Marker D7S522 bestimmt. Zusammen mit ihnen, und auch in einem Subkollektiv, das fast ausschließlich durch den Marker D17S855 definiert wird, taucht wiederum häufig der Marker D8S258 auf. Die Nähe dieses Markers zu den gerade beschriebenen Hauptclustern ist als Ast des Genbaums präzise dargestellt (Abb. 25 IIIa). Die Marker p53 und D13S153 bilden das letzte Hauptcluster. Da LOH dieser beiden Marker auch im Gesamtkollektiv sehr häufig ist, und sie daher auch in Verbindung zu anderen Markern auftauchen, sind sie im Genbaum wiederum an der Basis zu finden. Untereinander bilden sie jedoch ein eigenständiges Cluster, das sich deutlich von den anderen Clustern und deren Markerkombinationen unterscheidet.

Der Bereich mit wenigen genetischen Veränderungen, der sich mit Kollektiv der bifokalen Tumoren noch deutlich abgezeichnet hat, ist nun durch den größeren Datenumfang geschrumpft, aber immer noch sichtbar.

3.4.4.2. Complete linkage-Clusteranalyse

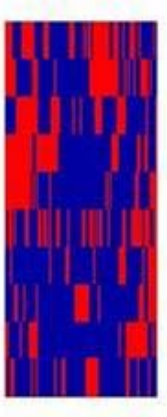
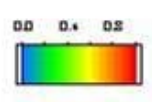
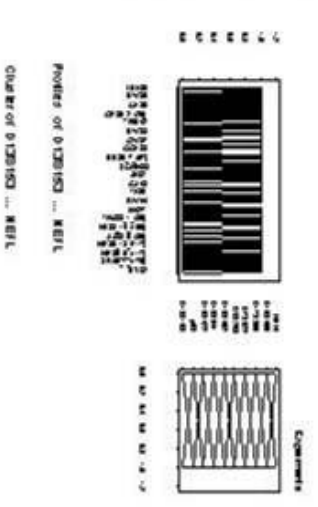
Durch Benutzung dieses Algorithmus ergeben sich in den so erstellten Phenogrammen (Abb. 24) kleine Veränderungen in Form von Verschiebungen einzelner Foci. Die Gesamtaussagen über die Markerkombinationen bleiben jedoch auch hier bestehen.

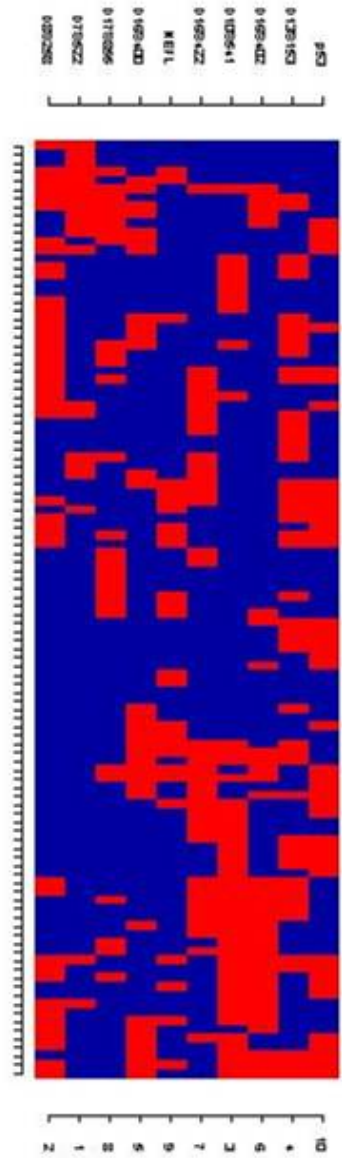
Die bifokalen Tumorfoci von 4 Patienten clustern hier direkt zusammen. 4 Foci von 2 Patienten sind relativ benachbart und der Rest verhält sich heterogen (Abb. 24 B). Die durch Dominanz bestimmter Marker oder durch bestimmte Markerkombinationen festgelegten Cluster entsprechen denen, die sich schon unter der Methode *Average linkage* dargestellt haben. Es sind lediglich Aufspaltungen des vormals großen Clusters p53 und D13S153 in mehrere kleinere Cluster zu erkennen, die jedoch weiterhin von diesen beiden dominiert werden. Auch der oben erwähnte kleine Bereich mit wenigen genetischen Veränderungen erscheint wieder.



Two way hierarchical clustering

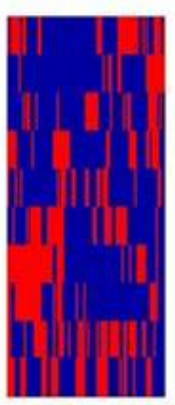
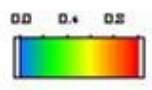
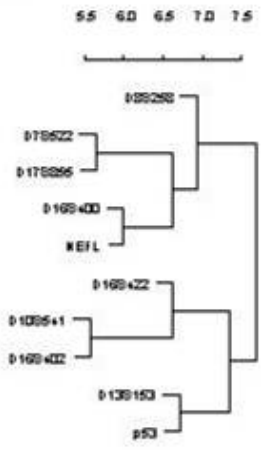
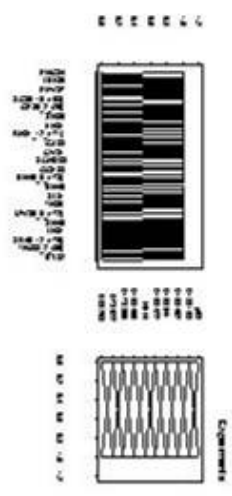
Data: Gesamtkollektiv 108 Daten
 Variables: D7SSZ2 ... p53
 Observables: AF34 ... H134_2 (50)
 Sub set: 1:108
 Num. of Variables: 10 Observables: 108
 Model: hclust (hierarchical clustering)
 Method: average (group average linkage)
 Metric: euclidean (root(sum of squares))
 Scale: FALSE , rows: no , cols: no





Two way hierarchical clustering

Data: Gesamtkollektiv.108.Daten
 Variables: D7S522 ... p53
 Observables: AF34 ... HJ34_2_(50)
 Sub set: 1:108
 Num. of Variables: 10 Observables: 108
 Model: hclust (hierarchical clustering)
 Method: compact (complete linkage)
 Metric: euclidean (root(sum of squares))
 Scale: FALSE , rows: no , cols: no



3.5. Genetische Unterschiede der bifokalen Foci

Von besonderem Interesse war in dieser Studie die Untersuchung von 16 Patienten mit bifokalen Tumoren. Bei der histologischen Untersuchung konnten jedem dieser Tumoren zwei unterschiedliche Foci zugeordnet werden. Tabelle 21 zeigt eine genaue Darstellung der mittels Mikrosatellitenanalyse ermittelten genetischen Eigenschaften (LOH / kein LOH) der Tumorfoci der 16 Patienten. Die Foci der Patienten, die sich auf den Markern unterschiedlich verhalten, sind fett dargestellt.

Tab.21: Genetische Eigenschaften der Tumorfoci der 16 Patienten mit bifokalen Tumoren (0 = kein LOH, 1 = LOH)

Lfd. Nr.	Patienten-kürzel	D7 S522	D8 S258	D10 S541	D13 S153	D16 S400	D16 S402	D16 S422	D17 S855	NEFL	p53	Anzahl LOH Unterschiede der Foci
1	AB31_1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	1	2
	AB31_9	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	
2	AJ33_25	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1
	AJ33_9	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1	
3	BB36_7	0	1	0	1	0	0	1	1	0	1	4
	BB36_17	0	0	1	1	0	1	1	1	0	0	
4	BJ37_NW21	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	2
	BJ37_8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
5	FK33_14	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1
	FK33_17	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
6	GP36	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0	1
	GP36_2	0	1	0	1	1	0	0	0	1	0	
7	HK35_10	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0
	HK35_35	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	
8	HP39_18	0	0	1	1	1	1	1	0	0	0	1
	HP39_9	0	0	1	1	0	1	1	0	0	0	
9	KH49_5	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	3
	KH49_16	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	
10	LH32_9	0	0	0	1	1	0	1	0	1	1	3
	LH32_23	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	
11	MW36_9	0	0	1	1	0	0	1	0	0	1	2
	MW36_22	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	
12	RH31_12	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	4
	RH31_19	0	0	1	1	1	0	1	0	1	0	
13	SR49_7	0	1	1	0	0	1	0	1	0	1	2
	SR49_12	0	1	1	1	0	1	0	0	0	1	
14	SG39_19	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	2
	SG39_34	0	1	1	1	0	1	1	0	0	0	
15	THJ33_1	1	1	1	0	0	1	0	0	0	0	1
	THJ33_2	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0	
16	HJ34_1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	3
	HJ34_2	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	

Von den 16 Patienten zeigen bezüglich der 10 untersuchten Marker 5 Patienten einen genetisch unterschiedlichen Focus. Weitere 5 Patienten zeigen auf 2 Markern unterschiedliche Foci, maximal vier sich in Bezug auf LOH unterschiedlich verhaltene Foci. 3 Patienten zeigen unterschiedliche Foci auf 3 Markern und 2 Patienten weisen auf 4 Markern genetisch unterschiedliche Foci auf. Ein Patient zeigt keine unterschiedlichen Foci. Bei ihm verhalten sich die entsprechenden Foci auf allen Markern gleich.

Der Marker D10S541 ist mit Abstand der häufigste bei dem genetisch unterschiedliche Foci zu finden sind.

Die sich in der Mikrosatellitenanalyse dargestellten Beobachten sind in Abbildung 26 beispielhaft dargestellt.

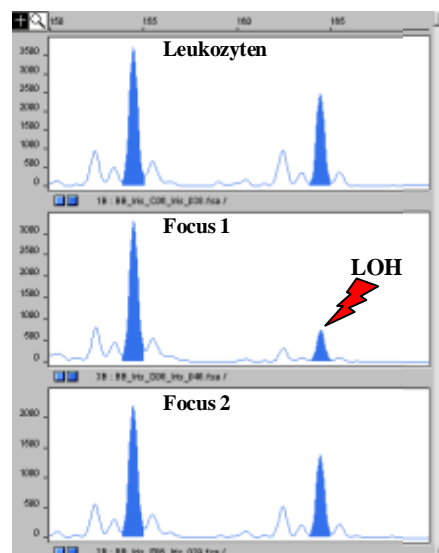


Abb.26: Darstellung von LOH auf einem Focus eines bifokalen Tumors

3.6. Daten zum “Follow-up“

3.6.1. Zeitdauer bis zum PSA-Wiederanstieg

Im Rahmen des Follow-up, das sich über maximal 3 Jahre erstreckte, konnten aus dem Gesamtkollektiv der 92 Patienten für 17 Patienten ein PSA-Wiederanstieg ermittelt werden. Eingeschlossen darin sind 4 Patienten die postoperativ keinen PSA-Abfall unter die Nachweisgrenze (je nach Assay und Hersteller 0,04-0,05 ng/ml) gezeigt haben. 2 dieser 17 Patienten waren Patienten mit bifokalen Tumoren (Patientenkürzel in Tab. 22 fett). Um zu prüfen, ob sich möglicherweise ein Zusammenhang zwischen PSA-

Wiederanstieg und genetischer Instabilität (hier LOH) besteht, wurden die 10 untersuchten genetischen Marker dieser Patienten genauer untersucht.

Tabelle 22 zeigt eine Auflistung der 17 Patienten mit PSA-Wiederanstieg und veranschaulicht gleichzeitig die Tage bis zum PSA-Wiederanstieg und das Vorliegen eines LOH der informativen Markern dieser Patienten.

Tab.22: Patienten mit PSA-Wiederanstieg und LOH. Die Kürzel von Patienten mit bifokalen Tumoren sind fett dargestellt. x = LOH, 0 = homozygot (nicht informativ)

Lfd. Nr.	Patienten-kürzel	PSA-Wiederanstieg (Tage)	D7 S522	D8 S258	D10 S541	D13 S153	D16 S400	D16 S402	D16 S422	D17 S855	NEFL	p53
1	FG33	0		0	x	x	0		0		0	x
2	GHW43	0		x		x			x		x	x
3	KV32	0	0	0	x	x	x	x		0	0	x
4	PE43	0	0	x		x	x				0	x
5	BJ37	146				x	0	0			0	x
6	BA33	177	0		x	x	0	x	x		0	0
7	HE43	204				0		0		x	x	
8	GH33	207	0					0			0	x
9	HA31	216	x	x	0	0	x				0	x
10	FA33	246	x	x		x		x		x	0	0
11	JF32	292		0	0	0	0	x		x	x	
12	AF34	549		x	x		x		x		0	x
13	LFK35	561	x	x	x	0	x	x	x	x	0	
14	MR39	581	x	x	0	x	x	x	0	x	0	0
15	SCHK35	647	0	x	0		x	x		0	0	
16	MLHH41	680	0	x	x	x					0	
17	HJ34	834		x	x	x		0		x	0	
ΣLOH			4	10	7	10	7	7	4	6	3	8

Unter den 17 Patienten mit PSA-Wiederanstieg befanden sich jeweils 10 Patienten, die einen LOH der Marker D13S153 und D8S258 zeigten. Da für den Marker D8S258 insgesamt 13 heterozygote Merkmalsträger ermittelt werden konnten entspricht die LOH-Häufigkeit hier 76,9%. Für den Marker D13S153 auch 76,9% da auch für diesen 13 informative Fälle festgestellt werden konnten. Des Weiteren waren in diesem Kollektiv die Marker p53 mit 8 LOHs bei 14 informativen Fällen (57,1%) und Marker D10S541 mit 7 LOH bei 13 informativen Fällen (53,8%) sehr häufig vertreten. Am wenigsten häufig fand sich eine genetische Alteration in Form eines LOH des Markers NEFL. Dieses lässt sich jedoch durch den außergewöhnlich hohen Homozygotieanteil dieses Kollektivs erklären. Die Kombination „LOH der Marker D8S258 und D13S153“ zeigten 6 der betroffenen Patienten, zwei dieser Patienten waren zusätzlich von einem

gleichzeitigen LOH des Markers D10S541 betroffen, zwei andere dieser Gruppe von einem zusätzlichen LOH des Marker p53.

Auffällig ist, daß bei den 4 Patienten ohne postoperativen PSA-Abfall und bei Patienten mit frühem PSA-Wiederanstieg (bis 177 Tage postoperativ) überproportional häufig einen LOH der Marker p53, D13S153 und D10S541 zu finden ist. Späte PSA-Wiederanstiege sind bei Patienten zu beobachten, die einen LOH des Markers D8S258 und der 16er Markern zeigen. Für alle anderen Marker zeigt sich bei der Untersuchung dieses Kollektivs keine eindeutige Tendenz in Richtung frühem oder spätem PSA-Wiederanstieg. Es findet sich häufig jedoch ein PSA-Anstieg innerhalb des 1. Jahres postoperativ.

3.6.2. Vergleich der LOH-Häufigkeit bei Patienten mit bzw. ohne PSA-Wiederanstieg

Tab.23: Vergleich der LOH-Häufigkeit in Prozent bei Patienten mit PSA-Wiederanstieg im Vergleich zu Patienten ohne PSA-Wiederanstieg (PSA-WA)

Mikrosatellitenmarker	% LOH mit PSA-WA	% LOH ohne PSA-WA
D7S522	36,4	47
D8S258	76,9	56,3
D10S541	53,8	46,6
D13S153	76,9	52,6
D16S400	58,3	46,9
D16S402	50	36,6
D16S422	36,6	50,9
D17S855	40	34,5
NEFL	100	75
p53	57,1	53,6

Im Vergleich zu den Patienten ohne PSA-Wiederanstieg konnte festgestellt werden, dass die prozentuale Häufung an LOH der Marker D8S258 und D13S153 bei den Patienten mit PSA-Wiederanstieg um mehr als 20% häufiger vorkommt. Alle anderen Marker zeigen diesbezüglich weniger deutliche Unterschiede.

3.6.3. Korrelation der Markerkombinationen bei Patienten mit PSA-Wiederanstieg zu Markerkombinationen in der Clusteranalyse

Betrachtet man den Patientenbaum der *Average linkage* Clusteranalyse der 76 Patienten mit monofokalen Tumoren (S. 76, Abb. 26) so finden sich 6 der Patienten mit PSA-Wiederanstieg im Zentrum der Grafik wieder. Die Sortierung richtet sich dort nach dem Auftreten der Kombination eines LOH der Marker D8S258 und D13S153. Drei Patienten mit PSA-Wiederanstieg die die Kombination eines LOH der Marker D10S451 und p53 zeigen, finden sich auch in der o.g. Clusteranalyse in unmittelbarer Nachbarschaft. Auch die Tendenz zur Kombination eines LOH der 16'er Marker, Marker D7S522 und Marker D17S855 findet sich für weitere 3 Patienten mit PSA-Wiederanstieg.

3.6.4. Verstorben an PCa

Innerhalb des Beobachtungszeitraums ist ein Patient an seiner Prostatakreberkrankung verstorben. Für ihn konnte präoperativ ein t-PSA-Wert von 72,6 mg/ml ermittelt werden. Postoperativ fiel der t-PSA-Wert zu keiner Zeit unter die Nachweisgrenze ab. Histologisch wurde der Tumor mit pT4, N1, G 3b und Gleason 10 klassifiziert. Zudem war bei der pathologischen Untersuchung im Resektat kein tumorfreier Schnittrand zu bestimmen. Bei der Untersuchung der genetischen Marker konnten bei diesem Patienten ein LOH der Marker D8S258, D13S153, D16S400 und p53 entdeckt werden.

4. Diskussion

4.1. Kollektiv

In dieser Studie wurden Proben von 92 Patienten mit histologisch gesichertem Prostatakarzinom, die am Universitätsklinikum Münster (UKM) im Zeitraum von 2000 bis 2003 behandelt wurden untersucht. Mittels Mikrosatellitenanalyse wurden 10 ausgewählte genetische Marker auf sechs verschiedenen Chromosomen auf allelische Imbalancen (AI) analysiert. Insgesamt standen 108 Tumorproben zur Verfügung, da für 16 Patienten histologisch bifokale Tumoren nachgewiesen werden konnten.

Bei den 92 Patienten handelte sich um männliche Europäer in einem Alter zwischen 49 und 78 Jahren mit einem mittleren Lebensalter von 64 Jahren. Die nach erfolgter radikaler Prostatektomie histologisch ermittelten pT-Stadien der Probanden ergaben Tumorstadien von pT1-pT4. Bei 80% der Patienten wurden Tumorstadien zwischen pT2c und pT3c (nach UICC) gesichert. Der präoperativ ermittelte t-PSA-Serumkonzentration der Patienten bewegte sich zwischen 2,93 ng/ml und 167 ng/ml (Median (9,95 ng/ml). Annähernd 90% der Patienten des Kollektivs zeigten PSA-Serumkonzentrationen zwischen 4 ng/ml und 30 ng/ml (s. Abschnitt 3.1.).

Die in dieser Arbeit zum Vergleich herangezogenen Studien über Mikrosatellitenanalysen umfassten Kollektive von minimal 12 Proben (132) und maximal 160 Proben (226). Zu den Studien mit großen Kollektiven ist jedoch anzumerken, daß dort nicht nur PCa-Proben sondern auch PIN (prostathe intraepitheliale Neoplasie) und Gewebe aus Metastasen untersucht worden ist (204, 209, 226). In den damaligen Studien wurden Patienten aus den USA (226, 209, 110), Japan (172), den Niederlanden (204), Schweden (143), Großbritannien (25) und Deutschland (256) untersucht. In den meisten wurden mehrere Mikrosatellitenmarker auf einem Chromosom untersucht. Die von Ruijter *et al.* (204) und Saric *et al.* (209) durchgeführten Untersuchungen wurden mit Mikrosatelliten von 9 bzw. 12 unterschiedlichen Chromosomen durchgeführt, aber wie schon erwähnt bestand das Kollektiv nicht nur aus Patienten mit primärem PCa. In dieser Arbeit war für alle teilnehmenden Patienten ein histologisch gesichertes PCa das Einschlußkriterium. Die bisher umfangreichste Studie, in der 16 Mikrosatellitenmarker auf 4 verschiedenen Chromosomen untersucht wurden, wurde 1998 von Jenkins *et al.* (110) durchgeführt.

Das von ihm untersuchte Kollektiv bestand aus 156 Patienten. In dieser Studie lag der Schwerpunkt auf der Untersuchung von Tumoren mit einem pT-Stadium pT3 (nach UICC). Die pT-Stadien der Patienten in den anderen Studien bewegten sich, wenn angegeben, zwischen 2 und 3. Einzig in der von Oba *et al.* (172) durchgeführten Studie wurden auch Patienten mit Tumorstadium pT4 untersucht. In dieser Studie wurden Patienten mit Tumorstadien von pT1-pT4 untersucht.

Wie bereits in Abschnitt 1.2.9.2. erläutert ist das PSA ein spezifischer, wichtiger Tumormarker bei der Diagnose des Prostatakarzinoms (4). Exzessive Werte der t-PSA-Serumkonzentration oder die Bestimmung des Quotienten f-PSA/t-PSA mit Feststellung eines hohen t-PSA-Anteils sind richtungsweisend, jedoch gerade bei Werten zwischen 4 ng/ml und 20 ng/ml ist eine eindeutige Zuordnung zu benignen oder malignen Prozessen nicht möglich. Positive Korrelation von PSA-Werten, bzw. des Quotienten f-PSA/t-PSA, und eines LOH können die Diagnosefindung vereinfachen (11, 111).

Das UKM hat, als ausgewiesenes Kompetenzzentrum für Prostata, ein sehr großes Einzugsgebiet. Eine Quote von ca. 170 radikalen Prostatektomien pro Jahr spricht für die Erfahrung und Kompetenz der Abteilung und liefert durch die Menge an Operationen dieser Studie die gute Kollektivgröße. Da am UKM Patienten jeglichen Alters, bei entsprechenden Voraussetzungen (z.B. die OP-Fähigkeit) prostatektomiert werden, handelt es sich bei den Teilnehmern dieser Studie um nicht vorselektionierte Patienten. Es ist daher anzunehmen, daß es sich bei dem in dieser Studie untersuchten Kollektiv um einen guten Querschnitt von an Prostatakrebs erkrankten und diagnostizierten Personen handelt.

4.2. Die genetischen Marker

Anders als bei vielen anderen Tumoren wie z.B dem Mammakarzinom (176) oder dem hereditären Colonkarzinom (71), wo es bekannte für die Tumorgenese prädisponierende Gene wie BRCA1 und BRCA2 (Mamma-Ca) bzw. das APC-Gen (Colon-Ca) gibt, liegen zur Detektion der genetische Disposition des Prostatakarzinoms keine Ergebnisse vor (170). Auch ein Tumorprogressionsmodell im Sinne Vogelsteins (72) fehlt. Daher wurde in dieser Studie ein Mikrosatellitenpanel zusammengestellt, um bestimmte Marker oder Markerkombinationen zu untersuchen, die auf Grund der genetischen Instabilität prognostische Aussagen für das Prostatakarzinom zum Beispiel zur

Abschätzung des Malignitätsgrades oder des Metastasierungspotentials liefern können. Diese Zusammenhänge wurden von mehreren Autoren schon für einige ausgewählte Marker beschrieben (41, 138, 235, 254). Die gleichzeitige Untersuchung von 10 Markern kann zu einer besseren Einschätzung der Erkrankung und zur Prognoseabschätzung beitragen. In dieser Studie wurden Mikrosatellitenmarker ausgewählt, deren Beteiligung an der Entstehung und Progression des PCa schon in anderen Studien beschrieben wurde (18, 47, 134, 142, 161, 188). Bei Kenntnis des molekularbiologischen Verhaltens von Prostatatumoren könnten möglicherweise neue Beurteilungs- und Behandlungsstrategien schon im Frühstadium der Erkrankung entwickelt und eingesetzt werden (21). Da gerade für das PCa unterschiedliche therapeutische Vorgehensweisen diskutiert werden (104), könnten molekularbiologische Untersuchungen zur Abschätzung des Risikos und der Prognose hilfreich sein (20). Auch die Bestimmung der Serumkonzentration des Tumormarkers PSA als PCa-Screening-Methode wird zurzeit kontrovers diskutiert (122). Daher sollten zur Erforschung des PCa auch andere Untersuchungsstrategien herangezogen werden. Ein Ansatzpunkt für die Detektion von PCa wäre die in dieser Studie angestrebte molekularbiologische Charakterisierung dieser Tumoren. Durch Kenntnis von Markern, die Hinweise auf weiterführende Enddifferenzierung von Tumoren zeigen und eine hohe Aggressivität des Tumors oder eine schlechte Prognose für den Patienten bedeuten könnten (21), wäre die Dignität der Erkrankung besser einzuschätzen. Auch der Einsatz von zum Teil sehr belastenden Therapien für den Patienten wäre besser abzuschätzen (104, 122).

Die Auswahl der 10 Mikrosatellitenmarker erfolgte in Zusammenarbeit mit Herrn Dr. rer. nat. Hartmut Schmidt. Zunächst wurde nach Markern gesucht, die schon in anderen Studien untersucht wurden (243), und bei denen sich dort bestätigt hatte, daß Alterationen dieser Marker, gehäuft beim Prostatakarzinom zu finden sind (56). Des Weiteren handelt es sich um Marker, deren Beteiligung bei der Tumorgenese anderer Krebserkrankungen als gesichert gelten kann. Einige von ihnen liegen in unmittelbarer Nachbarschaft bekannter Tumorsuppressorgene. Zusätzlich sollten sich alle diese Marker durch einen hohen Heterozygotiegrad, und somit durch hohen Informationsgehalt, und eine vergleichbar hohe Alterationsfrequenz (LOH-Häufigkeit) in Tumoren auszeichnen, damit sie der hier angewendeten Untersuchungsmethode, der

Mikrosatellitenanalyse, gut zugänglich sind (s. Tabelle 6, Abschnitt 2.6.). Die hier untersuchten Marker werden im Folgenden einzeln noch einmal vorgestellt und kommentiert.

1. D7S522

Dieser Marker befindet sich in der Region 7q33.1. Benachbart liegen der Hepatozyten-Wachstumsfaktor MET-Protoonkogen (181) und Caveolin1-und 2 (65). AI des langen Arms von Chromosom 7 ist sowohl cytogenetisch als auch durch Mikrosatellitenanalysen festgestellt und als bedeutsam sowohl für das Prostatakarzinom (8, 17, 48, 54, 109, 135, 152, 153, 229, 264) als auch für das Mammakarzinom (140), das Nierenzellkarzinom (223) oder auch das papilläre Schilddrüsenkarzinom (266) beschrieben worden. In dieser Studie konnte gezeigt werden, daß für diesen Marker 22% der Tumorproben LOH aufwiesen. Dieses entspricht den in der Literatur gefundenen Angaben anderer Autoren (229, 264). Bezüglich des Heterozygotiegrades wurde in dieser Studie mit 49% eine Abweichung von der Literatur (67%) festgestellt. Diese ist eventuell auf die unterschiedlichen Kollektivgrößen oder auf die ethnischen Unterschiede der Patienten zurückzuführen. Während in dieser Studie insgesamt 108 Tumorproben untersucht wurden, führten Takahashi *et al.* (229) (54 Tumorproben) und Zenklusen *et al.* (264) (16 Tumorproben) ihre Studien mit somit deutlich kleineren Kollektiven durch. Zusätzlich untersuchten diese beiden Autoren ausschließlich Patienten aus der amerikanischen Bevölkerung. Somit waren höchstwahrscheinlich Patienten mit kaukasischer und Patienten und afroamerikanischer Abstammung innerhalb dieser Kollektive vertreten. Für die zuletzt genannte Bevölkerungsgruppe konnten durch Washburn *et al.* (253) zumindest bezüglich LOH in der Region 8p23 andere Angaben hinsichtlich der Prognose gemacht werden als für Patienten kaukasischer Abstammung. Diese Beobachtung hinsichtlich der ethnischen Unterschiede könnte, wenn auch bis her nicht untersucht, auch bei AI der Region 7q eine Rolle spielen.

2. D8S258 und NEFL

Zahlreiche Studien zeigen, daß AI des kurzen Arms von Chromosom 8 zu den häufigsten vorkommende Alteration zählt. Dies gilt sowohl für das Prostatakarzinom

(19, 29, 39, 41, 42, 48, 67, 91, 107, 112, 128, 151, 157, 158, 162, 172, 189, 227, 236, 246, 253) aber auch für Karzinome der Mamma (107, 262), des Ösophagus (107), des Colons (107, 230), und der Lunge (129). Ishii *et al.* (107) vermuten im Bereich 8p22-23 zwei Tumorsuppressorgene (N33 und PRLTS). Bestätigt ist, daß in dieser Region das Tumorsuppressorgen FEZ1 liegt. Dieses kodiert für ein Leucin-Zipper-Protein. Dieses ist ein Protein dessen DNA-bindende Domäne Ähnlichkeiten mit der DNA-bindenden Domäne eines Transkriptionsfaktors besitzt. Funktionsverlust des FEZ1-Gens spielt nach Ishii *et al.* eine Rolle in der Entwicklung von Prostata- Brust- und Ösophaguskarzinomen. Zusätzlich liegt in der Nähe von D8S258 ein Gen, das für ein das Zytoskelett der Zelle stabilisierendes Protein kodiert. Ein Funktionsverlust dieses Proteins impliziert, daß bei fehlender Kontrolle über die Zellform Veränderungen in Richtung Tumorzelle erleichtert werden (151). Oba *et al.* (172) bestätigen dies in ihrer Studie und sprechen dieser Region eine wichtige Rolle bei der Tumordifferenzierung zu. Die LOH-Häufigkeit des Markers D8S258 wird in der Literatur mit 8,1-24,1%, der Heterozygotiegrad mit 0,71 angegeben. Die in dieser Studie durchgeführten Untersuchungen zeigten für diesen Marker einen LOH-Anteil von 40% und einen Heterozygotiegrad von 0,67. Der doch deutliche Unterschied bei der LOH-Häufigkeit mag, da es sich um annähernd gleich große Kollektive handelt, auf ethnische Unterschiede zu der amerikanischen Bevölkerungsgruppe (246) zurückzuführen sein. Andererseits kann dieser Unterschied auch in der Verbesserung der Detektionsmethoden begründet sein. Während früher die Acrylamidgelelektrophorese mit anschließender Silberfärbung mit zum Teil noch visueller Auswertung zum Einsatz kam, erfolgt heute der direkte Nachweis der fluoreszenzmarkierten Amplifikationsprodukte mittels Kapillarelektrophorese. Auch durch die 2001 von Buerger *et al.* modifizierte Formel zur LOH-Berechnung (28) können durch Veränderung der Berechnungskriterien heute deutlich mehr LOH detektiert werden als früher. Somit ist in älteren Arbeiten die Wichtigkeit dieses Markers für das Prostatakarzinom möglicherweise nicht erkannt worden. Die Region in der NEFL zu finden ist, ist nach Oba *et al.* für die Progression der Tumorerkrankung verantwortlich (170). Der Marker NEFL wird in Arbeiten von Kagan *et al.* (112), Macoska *et al.* (158), MacGrogan *et al.* (157) und Vocke *et al.* (246) mit einer LOH-Häufigkeit von 16,3-35,4% und einem Heterozygotiegrad von 0,83 beschrieben. In Übereinstimmung mit

den Literaturangaben konnte in unserer Studie für diesen Marker in 27% der Fälle LOH gezeigt werden. Der ermittelte Heterozygotiegrad für den Marker NEFL lag innerhalb dieses Kollektivs mit 0,35 unter dem in der Literatur ermittelten Wert. Dies kann möglicherweise wiederum durch ethnische Unterschiede oder unterschiedlich Kollektivgröße bedingt sein (s. D8S258).

3. D10S541

Der Marker D10S541 liegt in der Region 10q23 und hier in der Nähe des PTEN-Gens. Die Aberration des Tumorsuppressorgens PTEN und dessen Rolle bei der Tumorgenese ist für eine Vielzahl von malignen Neoplasien bekannt. Neben dem Prostatakarzinom (3, 30, 54, 57, 69, 73, 74, 131, 133, 136, 139, 141, 146, 152, 163, 177, 203, 245, 251) gilt dies z. B. für das Mammakarzinom (148), das Magenkarzinom (267) und das Blasenkarzinom (233) als bewiesen. Als Tumorsuppressorgen kann die Tyrosinphosphatase von PTEN über eine PI3-kinase den Zellzyklus in der G1-Phase blockieren (145). Zudem ist PTEN in der Lage apoptotische Vorgänge in Gang zu setzen (49). Die von den Tumorzellen verursachte Gewebshypoxie und induzierten Wachstumsfaktoren (z.B. IGF, VEGF) modulieren über Aktivierung des KAT1-Proteins die Angiogenese. PTEN blockiert die über AKT1 laufenden Phosphorylierungen (239, 270) und dessen Kinaseeigenschaften und somit die Tumorzellprogression (270). Überexpression von PTEN inhibiert die Zellmigration, funktionsloses PTEN erhöht sie (232). Diese Eigenschaften machen deutlich wie schwerwiegend sich Alterationen dieses Gens auswirken können. Cairns *et al.* bezeichnen den LOH von PTEN, und wenn mit dessen Inaktivität verbunden, dementsprechend als einer der ursächlichen Faktoren bei der Entwicklung des Prostatakarzinoms (30). In Übereinstimmung mit Feilotter *et al.* (73), die 51 Prostatagewebeproben untersuchten, wurden in dieser Studie ähnliche Werte bezüglich des Heterozygotiegrads (Feilotter: 0,78; hier: 0,8) und der LOH-Häufigkeit (Feilotter: 45,1%; hier: 43%) ermittelt. Beides bestätigt die Relevanz dieses Markers bei der Erforschung des Prostatakarzinoms.

4. D13S153

Dieser Marker liegt in unmittelbarer Nähe zum bekannten Tumorsuppressorgen Rb1 in der Region 13q14.1. Rb1, bzw. sein Genprodukt, ist, zusammen mit einigen von ihm

beeinflussten und für das Zellwachstum bedeutsamen Proteinen, Negativregulator der Zellproliferation (13). Die Komplexbildung von Rb1 mit dem Transkriptionsfaktor E2F führt zum Zellarrest in der G1-Phase des Zellzyklus, verhindert den Übergang in die S-Phase (88, 154, 255, 265). Die unkontrollierte Proliferation von Zellen, bei denen der inhibierende Einfluß der von Rb geführten Zellwachstumskontrolle fehlt, wird begünstigt. Die Bedeutung des Rb1-Gens bei der Entstehung des Retinoblastoms ist seit langem bekannt. (120). Neben diesem spielt dieses Tumorsuppressorgen aber auch eine Rolle bei der Entstehung von Ovarial- (93), Larynx- (127) und Nebenschilddrüsenkarzinomen (221). LOH dieser Region wurde beim Prostatakarzinom bisher durch zahlreiche Studien bestätigt (1, 15, 26, 45, 54, 55, 74, 75, 106, 126, 132, 144, 156, 171, 191, 231, 234, 238, 244, 258, 263). Zudem wird direkt neben dem Rb1-Gen ein anderes mögliches Tumorsuppressorgen vermutet, dessen Funktionsverlust die Tumorgenese zusätzlich begünstigt (75, 132, 263). Das Patientenkollektiv dieser Studie zeigte mit 46% LOH von D13S153 einen sehr hohen Wert, der den in der Literatur von Cooney *et al.* (45) und Li *et al.* (144) beschriebenen Wert (25-30%), allerdings bei Kollektivgrößen von 40 bzw. 36 Patienten, deutlich übersteigt. Diese Autoren fanden für den Marker D13S153 einen Heterozygotiegrad von 0,82 der in dieser Studie mit 0,81 bestätigt werden konnte. Diese Ergebnisse machen das Rb1-Gen zu einem weiteren repräsentativen Marker der sich sehr gut zu molekulargenetischen Untersuchungen von Malignomen hier speziell des PCa eignet.

5. D16S400, D16S402, D16S422

Die Auswahl dieser 3 Marker, die telomernah in den Regionen 16q22.2-23.1 und 16q24.2 zu finden sind, erfolgte auf Grund ihrer bekannten Beteiligung bei der Entwicklung des PCa (48, 54, 57, 63, 64, 67, 93, 110, 133, 143, 162, 178, 226, 228). Osman *et al.* vermuten in der Region 16q22.1-22.1 ein mögliches Tumorsuppressorgen (178) Genetische Instabilitäten der genannten Regionen sind auch für den Wilms-Tumor (206) und für das Mammakarzinom, hier als klassische Translokation, bekannt (102). Die für diese Marker in der Literatur ermittelten Heterozygotiegrade lagen für D16S400 bei 0,62 (178), für D16S402 bei 0,86 (133) und für D16S422 bei 0,8 (63). Diese Ergebnisse konnten hier mit Werten von 0,68 (D16S400), 0,83 (D16S402) und

0,76 (D16S422) bestätigt werden. Bezüglich der Alterationsfrequenz ergaben sich für die Marker D16S402 und D16S422 keine wesentlichen Unterschiede (Literatur: D16S402: 28,8% und D16S422: 42% (63, 133); hier: D16S402 33% und D16S422: 37%). Der Marker D16S400 zeigt in dieser Studie mit 35% häufiger LOH als in der Literatur beschrieben (18,8%), was möglicherweise auf das von Osman *et al.* (178) untersuchte deutlich kleinere Kollektiv (32 Prostatatumoren) oder die schon bei der Beurteilung des Markers D8S258 beschriebenen ethnischen Unterschiede der untersuchten Patienten zurückzuführen ist.

6. p53

p53 (Region 17p13.1) ist eines der bekanntesten Gene, dessen Beteiligung bei der Entstehung von Neoplasien nachgewiesen ist. p53 spielt eine essentielle Rolle in der Regulation des Zellzyklus. Sein Genprodukt (TP53) besitzt eine DNA-bindende Domäne und reguliert über diese Bindung die Expression zahlreicher Gene. Über p53 regulierte Genprodukte sind an Prozessen der Signaltransduktion, der Wachstumsregulation der DNA-Replikation und der DNA-Reparatur beteiligt. Zusätzlich werden über das p53-Protein verschiedene Gene aktiviert, deren Aufgabe es ist, das Wachstum und die Invasion von Zellen zu bremsen. p53 ist verantwortlich für den Zellarrest beim Übergang von der G1- in die S-Phase. Während dieses Arrests können DNA-Schäden repariert werden. Ist eine Reparatur nicht möglich, so kann über p53 die Apoptose eingeleitet werden. Es unterdrückt die Synthese eines Apoptose-inhibierenden Proteins (bcl-2) und steigert die Transkription eines Apoptose-fördernden Proteins (bax). In normalen Zellen findet sich nur eine sehr geringe Menge des p53-Proteins. In veränderten Zellen ist es stark exprimiert. Dies läßt vermuten, daß die durch ein mutiertes p53-Gen bedingte Überexpression von TP53 hier als Abwehrmechanismus zu sehen ist, der mit Zelltransformation und Kanzerogenese assoziiert ist. Auf der anderen Seite bietet der Funktionsverlust dieses Gens Raum zur unkontrollierten Proliferation kanzerogener Zellen (85). Zahlreiche Tumoren gehen mit einer Alteration dieses Gens einher. Neben dem Prostatakarzinom (5, 25, 70, 74, 123, 156, 160, 161, 187, 195, 231, 234) sei hier beispielhaft das Colonkarzinom (105), das Bronchialkarzinom (165) und das Blasenkarzinom (237) erwähnt. Die von Brewster *et al.* (25) bei 30 PCa-Proben in Großbritannien ermittelten Werte für den Grad der

Heterozygotie (0,84) und die LOH-Häufigkeit (38%) konnten in dieser Studie mit 0,88 für den Heterozygotiegrad und mit einer Alterationsfrequenz von 43% bestätigt werden.

7. D17S855

Dieser Marker liegt in Region 17q21. In unmittelbarer Nähe hierzu befindet sich das BRCA1-Gen. Dieses ist, neben BRCA2, das am häufigsten veränderte Gen beim hereditären Mammakarzinom (102, 108, 118). Die Funktion von BRCA1 liegt in der Kontrolle des Zellwachstums in Brust und Ovar. Zudem ist es an der Reparatur von DNA-Doppelstrang-Brüchen beteiligt (149). Chapman *et al.* (37) vermuten ein BRCA1-Protein, das ähnlich wie ein Transkriptionsfaktor arbeitet, und so an der Regulation anderer Proteine, die möglicherweise tumorsuppressive Eigenschaften besitzen, beteiligt ist. Unkontrolliertes, z.B. durch DNA-Schäden verursachtes Zellwachstum soll somit verhindert werden (37). Die Alteration von BRCA1 ist neben dem Mamma- (102, 108) und Ovarialkarzinom (93, 108) u. a. beim Bronchialkarzinom (258) und beim Colonkarzinom (202, 244) beobachtet worden. Auch bei der Entstehung des Prostatakarzinoms wurde eine Beteiligung von BRCA1 häufig nachgewiesen (41, 42, 54, 57, 80, 81). Mit in der Literatur beschriebenem Heterozygotiegrad von 0,82 und einer Alterationsfrequenz von 34,8% (80), die in dieser Studie jeweils mit 0,77 und 28% annähernd bestätigt werden konnten, ist auch der Marker D17S855 zum Nachweis allelischer Imbalancen gut geeignet.

4.3. Korrelation genetischer Instabilität und klinischer bzw. histopathologischer Parameter

Durch Vergleich der chromosomalen Aberrationen mit den klinischen und histopathologischen Parametern soll untersucht werden, ob bestimmte Marker oder Markerkombinationen mit den ausgewählten Parametern korrelieren

Bezüglich des Patientenalters konnte festgestellt werden, daß LOH der Marker D8S258, NEFL und D17S855 besonders bei jüngeren Patienten (< 64 Jahre) zu finden ist. Die Studie von Washburn *et al.* (253), der 45 Amerikaner kaukasischer und afrikanischer Herkunft untersuchte, bestätigt das deutlich häufigere Auftreten von LOH auf 8p bei Patienten mit PCa unter 70 Jahren. Die Auswertung der Ergebnisse dieser Studie bestätigt die Untersuchungen von Washburn *et al.*, denn auch in dieser Studie zeigten

diese Marker in der Altersgruppe der Patienten < 64 Jahre im Vergleich zur Gruppe der älteren Patienten deutlich mehr LOH. Im hier untersuchten Kollektiv zeigt der Marker D7S522 mit statistischer Signifikanz eine Korrelation zum jüngeren Patientenkollektiv. In der vorliegenden Studie fand sich eine deutliche Häufung von LOH für Marker D7S522 bei Patienten mit niedrigerem Staging (pT 1-2c, Grading < 2, Gleason 1-6). Dies bestätigt die von Latil *et al.* ermittelten Ergebnisse zu dem LOH von D7S522 (135) innerhalb eines französischen Patientenkollektivs. Dong (56) beschreibt bei seinen mittels CGH (comparative genomic hybridization) detektierten chromosomalen Aberrationen den Verlust von 8p als häufiges Ereignis schon bei Proben mit PIN. Im Gegensatz dazu sehen Washburn (253) und Oba (172) den LOH von D8S258 eher im Zusammenhang mit dem fortgeschrittenen Tumorstadium. Diese beiden Autoren untersuchten amerikanische bzw. japanische Patienten mit den Methoden der FISH und der Acrylamidgel-Elektrophorese. Das in dieser Studie mittels sehr genau arbeitender Kapillarelektrophorese untersuchte europäische Patientenkollektiv zeigt dazu Übereinstimmungen, denn auch hier wurde der LOH des Markers D8S258 bei Patienten mit fortgeschrittenem Tumorstadium beobachtet. Die Anwendung des genaueren Analyseverfahrens und die Übereinstimmungen mit Washburn und Oba sprechen für die in dieser Studie ermittelten Ergebnisse.

Weiterhin waren in dieser Studie Patienten mit hohem Staging (pT 3a-4, Grading \geq 2 und Gleason 7-10) häufiger von einem LOH der Marker D10S541, D13S153, D16S402, D17855 und p53 betroffen. Durch Ergebnisse anderer Studien ist für die Marker D10S541 (136), D13S153 (1, 55, 156), die Marker auf 16q (226) und p53 (25, 70) eine positive Korrelation zu spätem Tumorstadium bekannt. Zusätzlich verbinden Theodorescu *et al.* (234) und Qian *et al.* (195) die Inaktivität von Rb1, das in unmittelbarer Nähe zu dem hier untersuchten Mikrosatellitenmarker D13S153 liegt, und p53 mit rascher Progression und schlechter Prognose. Bei Patienten mit metastasierenden Tumoren war ein LOH der Marker D10S541 (203), D13S153 (106, 263) und p53 (160) sowie ein LOH der Marker aus der Region 16q (63, 64, 178) häufig zu beobachten. Die in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse zu diesen Markern bestätigen die Beobachtungen der anderen Studien.

Orisaka *et al.* (177) und Watanabe *et al.* (254) stellten in ihren Studien fest, daß in der japanischen Bevölkerung sowohl PTEN als auch BRCA1 bei der Entstehung von PCa

keine große Rolle spielen. Die in dieser Arbeit ermittelten Ergebnisse sowie die Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen (z.B. 41, 54, 73, 74) bestätigen jedoch die große Relevanz dieser Marker bei der Entstehung des Prostatakarzinoms für die europäische und amerikanische Bevölkerung.

Bezüglich des Markers NEFL stellten Vocke *et al.* in einer amerikanischen Studie fest, daß LOH dieses Markers in keinem Zusammenhang mit dem Tumorstadium steht (246). Auch in der vorliegenden Studie konnte ein LOH von NEFL weder der Gruppe mit niedrigerem noch der Gruppe mit dem höheren Staging eindeutig zugeordnet werden.

Entsprechend den Beobachtungen zum Staging wurde in dieser Studie bei Patienten mit unauffälligem Palpationsbefund, also möglicherweise noch unentdecktem Tumorfrühstadium, vermehrt ein LOH für keinen der hier untersuchten Marker festgestellt werden. Bei Patienten mit dubiosem oder schon PCa-verdächtigen Palpationbefund trat gehäuft ein LOH der Marker D8S258, D10S541, D16S422 und D17S855 auf. Da suspekta Tastbefunde häufig bei großem, schon fortgeschrittenem Tumorgeschehen ermittelt werden, findet sich für diese Marker eine Übereinstimmung mit der Aussage über die bei hohem Staging betroffenen Marker (s.o.). Auch NEFL scheint in diesem Fall zu den Markern zu gehören dessen genetische Veränderung mit diesem Malignitätskriterium korreliert.

Bezüglich der PSA-Serumkonzentration konnte in dieser Arbeit beobachtet werden, daß ein LOH der Marker in der Gruppe der Patienten mit t-PSA ≥ 10 ng/ml gleich häufig vorkam wie in der Gruppe der Patienten mit t-PSA < 10 ng/ml. Eine deutlich höhere Alterationsfrequenz bei t-PSA ≥ 10 ng/ml zeigten die Marker D7S522 und D8S258. PSA-Werte von 4 -10 ng/ml und Werte deutlich über 10 ng/ml deuten im Allgemeinen auf maligne Prozesse hin (33, 34), was in dieser Studie mit dem Auftreten dieser chromosomalen Aberrationen korreliert. Die Kombination eines LOHs dieser Marker und ein erhöhter PSA-Wert kann möglicherweise schon richtungsweisend bezüglich der Dignität der Erkrankung gewertet werden. Im Gegensatz zu dieser Hypothese stellen sich die Marker D16S402 und D17S855 dar. Mit statistischer Signifikanz sind in dem untersuchten Kollektiv die Patienten mit geringer PSA-Serumkonzentration von einem LOH dieser Marker betroffen. Die chromosomale Aberration des BRCA1-Gens scheint somit unabhängig von hoher PSA-Konzentration zu sein. Auch bei Messung niedriger

oder sogar unauffälliger Werte könnte die Mutation dieses Gens schon auf maligne Organveränderungen hinweisen.

Das biochemische Rezidiv in Form von PSA-Wiederanstieg wurde am Häufigsten von einem LOH der Marker D8S258, D13S153, D10S541, allen drei 16-er Markern und p53 begleitet. Dabei war auffällig, daß ein LOH der Marker D10S541, D13S153 und p53 besonders bei Patienten ohne postoperativen PSA-Abfall bzw. frühem PSA-Wiederanstieg (< 1Jahr) zu finden war, wohingegen Patienten mit späterem PSA-Wiederanstieg (> 1 Jahr) besonders häufig von einem LOH der Marker D8S258 und LOH der drei 16-er Marker betroffen waren. Mit Ausnahme zweier Patienten mit PSA-Wiederanstieg, für die präoperative PSA-Serumkonzentrationen von 3,2 ng/ml bzw. 9,2 ng/ml ermittelt wurden, zeigten alle anderen präoperative PSA-Werte über 10 ng/ml. Eine positive Korrelation von erhöhter präoperativer PSA-Serumkonzentration und PSA-Wiederanstieg in gemeinsamer Verbindung mit einem LOH der Marker D8S258, D10S541, D13S153 und p53 scheint vorzuliegen. Die speziell zu dem Marker D8S258 ermittelten Daten bezüglich präoperativer PSA-Serumkonzentration und postoperativem PSA-Wiederanstieg bestätigen die von Washburn *et al.* beobachteten Zusammenhänge zwischen klinischen Parametern und dem Verlust von 8p. Ein deutlicher Zusammenhang zwischen einem LOH von D8S258, t-PSA > 10ng/ml und einem PSA-Wiederanstieg ist dort belegt (253).

Bei vergleichenden Untersuchungen auf LOH bei sporadischem PCa (SPC) und hereditärem PCa (HPC) stellten Verhage *et al.* (242) fest, daß der LOH in Regionen von 8p, 10q, und 13q sowohl beim HPC als auch beim SPC besonders häufig vorkommt. LOH der Regionen 7q, 16q und 17q deutlich häufiger beim HPC. In dieser Studie konnte, in Übereinstimmung mit Verhage *et al.*, für Patienten mit positiver Familienanamnese gehäuft LOH der Marker D10S541, D16S400 und p53 ermittelt werden.

Noch deutlicher als bei Verhage *et al.* zeigte der Marker D8S258 in dieser Studie bei größerer Kollektivstärke an sporadischen Tumoren (hier: 77 Tumoren; Verhage: 35 Tumoren) gehäuft einen LOH in der Patientengruppe ohne familiäre Disposition. Diese bestätigt, daß diese genetische Veränderung auch unabhängig von der familiären Disposition auftritt.

4.4. Markerkombinationen

Die Berechnung von genetischen Distanzen sowie Clusteranalysen ermöglichen eine neutrale Sortierung der zahlreichen genetischen Tumordaten ohne Wichtung der Rohdaten. Je nach Wahl der Methode wurden die Daten entweder nach “*nearest neighbour*“ (*Average linkage*) also ausgehend von der geringsten Distanz, oder entsprechend ausgehend vom größten Abstand ausgehend, als “*furthest neighbour*“ (*Complete linkage*) geclustert. Die im Programm verarbeiteten Daten wurden, entsprechend der Wahl der Methode, in Form von Phenogrammen oder Genbäumen graphisch dargestellt. Die Clusteranalysen wurden jeweils mit den 76 monofokalen Tumoren, mit den 16 bifokalen Tumoren und schließlich mit dem Gesamtkollektiv der 92 Tumoren durchgeführt. Durch die Anwendung unterschiedlicher Algorithmen sollte die Stabilität der Ursprungsmatrix überprüft werden. Diese konnte bestätigt werden, da mit Ausnahme kleiner, methodisch bedingter Abweichungen jeweils die gleichen Markerkombinationen festgestellt wurden.

Bei der Betrachtung der Clusteranalysen zeigt sich, daß die kombinierte Aberration von D13S153 und p53 besonders häufig auftritt. Bei der Zusammenfassung der beiden, nach Mono- bzw. Bifokalität getrennten, Kollektive zum Gesamtkollektiv findet sich die Kombination D13S153/p53, die bei der Clusteranalyse der monofokalen Tumoren noch einen Seitenast im Genbaum darstellt, an der Basis des Markerbaums. Diese Position kann auch schon in der Clusteranalyse der bifokalen Tumoren beobachtet werden. Von insgesamt 16 Patienten weisen hier 9 Patienten LOH dieser beiden Marker auf. Ein weiteres Paar für das häufig synchrone Alterationen zu beobachten sind, wird durch die Marker D17S855 und D7S522 bestimmt. Der LOH des Markers D16S400 stellt sich in allen Clusteranalysen kontinuierlich in Kombination mit einem LOH des Markers NEFL dar. Ein weiterer Marker, der ein Hauptcluster, bildet ist D10S541. Er tritt meist in Kombination mit den Markern D16S402 und D16S422 auf. Der Anteil dieser Kombination mit dem Hauptmarker D10S541 ist im Kollektiv der Patienten mit bifokalen Tumoren besonders groß (s. Abb. 21 u. 22). Da 9 Patienten von einem LOH des Markers D10S541 betroffen sind, scheint gerade diese Alteration charakteristisch für bifokale Tumoren zu sein.

Der Marker D8S528 nimmt eine Sonderstellung ein, da die Alteration dieses Mikrosatelliten unabhängig von der Kombination mit anderen Markern beobachtet

wird. Nur gelegentlich tritt eine Verbindung zu den Clustern, die durch die Marker D16S400 und D17S855 bestimmt werden, auf. Mit hoher Wahrscheinlichkeit treten Alterationen dieses Markers unabhängig von Alterationen anderer Marker auf. Hinsichtlich der Ergebnisse, die sich für diesen Marker bei den Untersuchungen im Zusammenhang mit klinischen und histopathologischen Parametern und bei der Rezidiventwicklung darstellen, sowie die Auswertung der Clusteranalyse zeigt, daß es sich bei D8S258 um einen Marker handelt, der beim Prostatakarzinom eine wichtige Rolle zu spielen scheint.

In dem ausgewählten Mikrosatellitenpanel befinden sich Marker, die sich, cytogenetisch gesehen, in den gleichen Regionen befinden. Dies sind zum einen die Marker D8S258 und NEFL, die in der Region 8p21-22 liegen, zum anderen 3 Marker (D16S400, D16S402, D16S422) die der Region 16q22.2-24.2 zuzuordnen sind. In dieser Studie zeigt sich, dass Alterationen dieser benachbarten Mikrosatelliten in einigen Fällen miteinander kombiniert vorkommen. Dies kann auf größere Ereignisse innerhalb dieser Region hindeuten. Deutlich häufiger tauchen diese Marker jedoch in Verbindung mit anderen Markern auf. Der Marker D16S400 zeigt in den Clusteranalysen durchgehend eine Kombination mit NEFL. Zu den beiden anderen auf 16q gelegenen Markern zeigt er eine deutlich größere Distanz. Die gleiche Beobachtung läßt sich für die Marker D8S258 und NEFL machen. Sie kommen sehr selten kombiniert miteinander vor. Da sie zu anderen Markern in deutlich näherer Verbindung stehen, bilden sie im Genbaum kein gemeinsames Cluster. Wie schon erwähnt ist es für NEFL der Marker D16S400 zu dem er die geringste Distanz aufweist wohingegen der Marker D8S258 im Genbaum des Gesamtkollektivs sogar einen eigenen Seitenast bildet (s. Abb. 25). Die Distanz zu seinem cytogenetischen Nachbarn ist nicht kleiner als die Distanzen zu anderen Markern. Diese Beobachtungen sprechen mit hoher Wahrscheinlichkeit dafür, daß es sich bei den Ereignissen in den hier untersuchten Tumoren eher um kleine, lokal begrenzte chromosomale Aberrationen handelt.

Für dieses Patientenkollektiv kann festgestellt werden, daß die Kombinationen D13S153 und p53, D16400 und NEFL, D17S855 und D7S722 sowie die Marker D10S541 und D8S258 eine besondere Rolle bei der genetischen Charakterisierung von Prostata Tumoren spielen.

4.5. Genetik multifokaler Tumoren

Lange Zeit wurde angenommen, daß die Progression von Tumoren, ausgelöst durch erworbene genetische Instabilitäten, durch die Vermehrung klonaler Zellpopulationen mit subsequenter Anhäufung von Mutationen bedingt ist. Diese lineare Abfolge von Ereignissen wird zum Beispiel durch das Vogelstein'sche Tumorprogressionsmodell des Colonkarzinoms (72) erläutert (s. Abb.27).

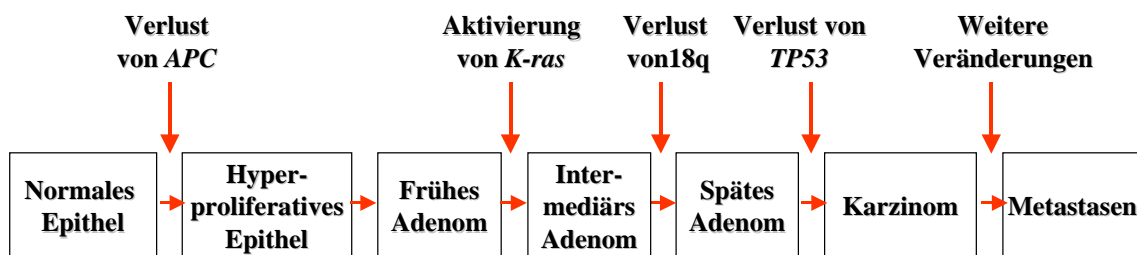


Abb.27 Tumorprogressionsmodell des Colonkarzinoms (Nach Fearon ER; Cell, 61: 759,1990 (72))

Barrett *et al.* (10) konnten jedoch am Beispiel des Barrettösophagus zeigen, daß es innerhalb eines Tumors verschiedene Bereiche mit unterschiedlichsten genetischen Mustern gibt (s. Abb. 28). Romagnoli *et al.* (201) und van Dekken *et al.* (240) konnten durch ihre Studien in verändertem Gewebe unterschiedliche Zellklone mit verschiedenen genetischen Alterationen bestätigen. Bei maligner Entartung könnten sich diese Bereiche in bifokale Tumoren entwickeln.

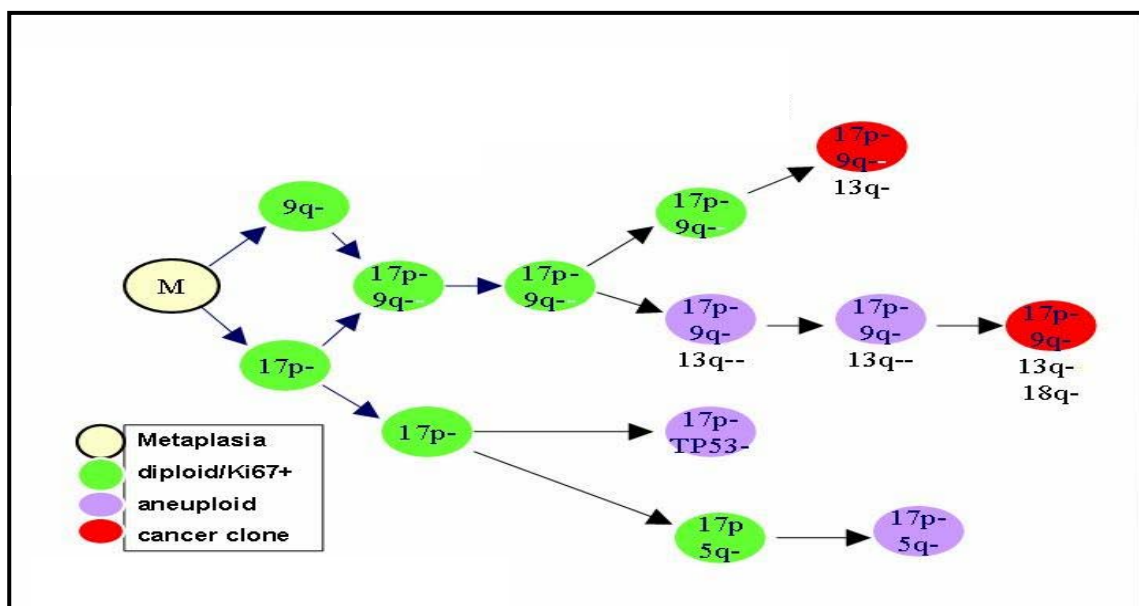


Abb.35 Unterschiedliche genetische Entwicklungswege des Barrett-Ösophagus-Gewebes

Es ist anzunehmen, daß die Tumorentwicklung nicht immer durch eine fixe, serielle Abfolge von Ereignissen bedingt ist. Vielmehr kann man davon ausgehen, daß in Abhängigkeit der Lokalisation des ersten "hits", die Differenzierung der betroffenen Zellen in unterschiedliche Richtung erfolgen kann.

Auf Grund dieser Erkenntnisse wurden in dieser Studie die 16 Tumorpatienten mit bifokalen Tumoren näher untersucht. Bei der Auswertung der klinischen und histopathologischen Daten zeigte sich, daß Patienten mit bifokalen Tumoren sich schon dadurch hervorheben, daß für sie alle relativ hohe pT-Stadien, hohes Grading, hoher Gleason-Score, schlechter Palpationsbefund und positive Kapselhistologie diagnostiziert wurden. Keiner dieser Patienten wies ein pT-Stadium $< pT2c$ auf, das Grading war niemals $< 2a$ und kein Patient konnte einem Gleason-Score < 5 zugeordnet werden. Die Mehrzahl der Patienten zeigte schon präoperativ einen tumorverdächtigen Tastbefund. Zudem wurde histologisch bei über 90 % dieser Patienten eine Kapselinfiltration oder -penetration festgestellt. Nach Djavan *et al.* (53) und Ebersdobier *et al.* (67) scheinen bifokale Tumoren häufiger als andere mit höherem Tumorstadium, hohem Grading und Rezidiv einher zu gehen. Auch die Assoziation von Bifokalität zu aggressivem Verlauf und schlechter Prognose der Erkrankung wird diskutiert (204). Die in dieser Arbeit ermittelten Ergebnisse lassen sich durch die Untersuchungen dieser Autoren bezüglich bifokaler Tumoren und ihrer Korrelation mit fortgeschrittenem Krankheitsstadium bzw. schlechter Prognose erhärten.

In dieser Studie wiesen 15 der 16 Patienten genetische Unterschiede ihrer beiden Tumorfoci auf (s. Tab. 21, Abschnitt 3.5). Diese Unterschiede betrafen bis zu 4 von 10 der untersuchten Mikrosatelliten. Am häufigsten fanden sich unterschiedliche Foci für den Marker D10S541, gefolgt von den Markern D8S258, D13S153, p53 und D16S400. Bei der Betrachtung des Patientenbaumes in der Clusteranalyse (s. Abb. 21 u. 22) wird deutlich, daß es 10 Tumorfoci von 5 Patienten gibt, die direkt zusammen clustern da sie identische oder sehr ähnliche Markerkombinationen aufweisen. Alle anderen Tumorfoci zeigen jedoch zu Tumorfoci anderer Patienten mehr Ähnlichkeiten als zu dem zweiten Focus des ihnen zugeordneten Patienten. Auf Grund dieser Ergebnisse scheint daher die Existenz zweier unterschiedlicher Primärtumorfoci oder unterschiedliche Entwicklung in unabhängige Tumoren sich auch im hier untersuchten Kollektiv zu bestätigen. Die von Ruijter *et al.* (204) beobachtete Heterogenität der von ihnen untersuchten bifokalen

Tumorfoci konnte in dieser Arbeit bestätigt werden. Dort wurde mit den Verfahren CGH (*Comparative Genomic Hybridization*) und Mikrosatellitenanalyse Tumorgewebe auf einen LOH bestimmter genetischer Regionen untersucht. Nach Ruijter *et al.* scheinen beim Prostatakarzinom sowohl nicht-monoklonale Primärtumoren, als auch die unabhängige Weiter- und Enddifferenzierung eines ursprünglich monoklonalen Primärtumors möglich zu sein.

Insgesamt zeigten die Clusteranalysen für die bifokalen Tumoren drei, auf Grund ihrer Alterationsfrequenz, besonders dominante Marker. Es handelt sich um die Mikrosatelliten D10S541, D13S153 und D16S400. PTEN könnte für bifokale Tumoren ein prädisponierendes Gen sein, da in der Gruppe der gerade genannten Mikrosatelliten der Marker D10S541 eine auffällig hohe Alterationsfrequenz aufwies. Zusätzlich kann man darauf schließen, daß diese drei Mikrosatelliten als übergeordnete alterierte Marker am Anfang der Tumorgenese stehen. Die anderen, hier untergeordnet erscheinenden amplifizierten Marker können als sekundäre Ereignisse in Zuge der Entdifferenzierung verstanden werden. Es zeigt sich auch für die bifokalen Prostatatumoren, daß nicht die Alteration eines Markers die übergeordnete Rolle spielt, sondern die Tumorgenese von unterschiedlichen Regionen her ihren Ausgang nimmt. In diesem Zusammenhang können eventuell auch Klonalitätsuntersuchungen zur weiteren Aufklärung dieses Phänomens beitragen.

Die in dieser Studie vorgenommenen Untersuchungen zur molekularbiologischen Charakterisierung bifokaler Tumoren bestätigen die Existenz genetisch völlig unterschiedlicher Foci innerhalb eines Tumors. Anders als bei anderen Tumoren wie z.B. dem Colonkarzinom (72) oder auch dem familiären medullären Schilddrüsenkarzinom (198), für die eine serielle Abfolge von Ereignissen bei der Tumorprogression gesichert scheint, lassen sich für das Prostatakarzinom verschiedene Wege der "genetischen Enddifferenzierung" nachweisen.

Insgesamt lässt sich feststellen, daß das Prostatakarzinom nicht durch einen der in dieser Studie untersuchten molekularbiologischen Marker zu charakterisieren ist. Es scheint sich nach Auswertung der Ergebnisse dieser Arbeit eher um eine polygene Erkrankung zu handeln, bei der Alterationen einiger Bereiche, bevorzugt in der Nähe bekannte Tumorsuppressorgene, zwar dominieren, jedoch ein nebeneinander verschiedenster

Alterationen immer beobachtet wird. Zudem scheinen bestimmte Marker die Progression und die Prognose der Prostatakreberkrankung mitzubestimmen.

Mikrosatelliten sind gleichmäßig und in großer Anzahl über das Genom verteilt. Die interindividuelle Variabilität ist sehr groß und sie sind experimentell einfach darstellbar (36). Da für das Prostatakarzinom bisher eindeutig verantwortliche Gene noch nicht detektiert werden konnten (170), sollten Studien mit anderen Mikrosatellitenpanels folgen. Zudem wird in Zukunft die stetig zunehmende verbesserte Automatisierung der Detektionsmethoden zur Ermittlung noch genauerer Ergebnisse beitragen. Durch die Untersuchung größerer Patientenkollektive könnten zusätzlich neue Erkenntnisse erzielt werden. Auch der Einsatz von SNP-Analysen (*Single Nucleotide Polymorphisms*), durch die ein noch umfangreicheres Gen-mapping möglich ist, wäre zur genetischen Untersuchung speziell auch von bifokalen Tumoren sinnvoll. Nach der Isolierung peripherer Tumorzellen aus dem Blut könnte das in dieser Arbeit verwendete oder ein vergleichbares Mikrosatellitenpanel eingesetzt werden, um das Metastasierungspotential der Tumoren zu untersuchen. All dies kann dazu beitragen, das Prostatakarzinom frühzeitig und im Hinblick auf seine Aggressivität oder die Prognose schneller einzuordnen, um für jeden Patienten individuell die besten Therapieoptionen herauszufinden.

5. Literaturverzeichnis

1. Afonso A, Emmert-Buck MR, Duray PH, Bostwick DG, Linehan WM, Vocke CD: Loss of heterozygosity on chromosome 13 is associated with advanced stage prostate cancer. *J Urol* 162(3 Pt 1):922-6, Sept.1999
2. Alberts B, Bray D, Lewis J, Ra M, Roberts K, Watson J: *Molecular Biology of the Cell*. Garland Publishing, Inc, 1994
3. Ali IU, Schriml LM, Dean M: Mutational spectra of PTEN/MMAC1 gene: A tumor suppressor with lipid phosphatase activity. *J Natl Cancer Inst* 91: 1922-1932, 1999
4. Allard WJ, Zhou Z, Yeung KK: Novel immunoassay for the measurement of complexed prostate-specific antigen in serum. *Clin. Chem.* 44(6 Pt.1): 1216-23, Jun.1998
5. Al-Maghrabi J, Vorobyova L, Chapman W, Jewett M, Zielenska M, Squire JA: p53 Alteration and chromosomal instability in prostatic high grade intraepithelial neoplasia and concurrent carcinoma: analysis by immunohistochemistry, interphase in-situ-hybridization, and sequencing of laser-captured microdissected specimens. *Mod Pathol* 14: 1252-1262, 2001
6. Amdur RJ, Parsons JT, Fitzgerald LT et al.: The effect of overall treatment time on local control in patients with adenocarcinoma of the prostate treated with radiation therapy. *International Journal of Radiation Oncology Biology, Physics* 19(6): 1377-1382, 1990
7. Arbeitsgemeinschaft Bevölkerungsbezogener Krebsregister in Deutschland in Zusammenarbeit mit dem Robert Koch- Institut: *Krebs in Deutschland Broschüre RKI*, 2003
8. Atkin NB, Baker MC: Chromosome study of five cancers of the prostate. *Hum. Genet* 70: 359-364, 1985
9. Bagshaw MA: External radiation therapy of carcinoma of prostate. *Cancer* 45(7): 1912-1921, 1980
10. Barrett MT, Sanchez CA, Prevo LJ, Wong DJ, Galipeau PC, Paulson TG, Rabinovitch PS, Reid BJ: Evolution in neoplastic cell lineages in Barrett oesophagus. *Nat. Genet.* 22(1): 106-9, May1999

11. Becker C, Lilja H: Individual prostate-specific antigen (PSA) forms as prostate tumor markers. *Clin. Chem. Acta.* 257(1): 117-32, Jan.1997
12. Beheshti B, Vucovic B, Marrano P, Squire JA, Park PC: Resolution of genotypic heterogeneity in prostate cancer using polymerase chain reaktion and comparative genomic hybridization on microdissected carcinoma and prostatic intra-epithelial neoplasia loci. *Cancer, Genet. Cytogenet.* 137 (1): 15-22, 2002
13. Benedict WF, Xu HJ, Hu SX, Takahashi R: Role of the retinoblastoma gene in the initiation and progression of human cancer. *J. Clin. Invest.* 85: 988-993, 1990
14. Berner A, Waere JM, Nesland JM, Paus E, Danielsen HE, Fosså SD: DNA ploidy, serum prostate specific antigen, histological grade and immunohistochemistry as predictive parameters of lymph node metastases in T1-T3/M0 prostatic adenocarcinoma. *Brit. J. Urol.* 75: 26-32, 1995
15. Bookstein R, Rio P, Madreperla SA, Hong F, Allred C, Grizzle WE, Lee WH: Promoter deletion and loss of retinoblastoma gene expression in human prostate carcinoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 87: 7762-7766, 1990
16. Bostwick DG: Prospective origins of prostate carcinoma. Prostatic intraepithelial neoplasia and atypical adenomatous hyperplasia. *Cancer* 78(2): 330-6, 1996
17. Bottaro DP, Rubin JS, Faletto DL, Chan AM, Kmieciak TE, Vande Woude GF, Aaronson SA: Identification of the hepatocyte growth factor receptor as the c-met protooncogene product. *Science* 15: 251 (4995): 802-804, 1991
18. Bova GS, Isaacs WB: Review of allelic loss and gain in prostate cancer. *World J Urol.*14(5):338-46,1996
19. Bova GS, Carter BS, Bussemakers MJ, Emi M, Fujiwara Y, Kyprianou N, Jacobs SC, Robinson Jc, Epstein IJ, Walsh PC, Isaacs WB: Homozygous deletion and frequent allelic loss of chromosomoe 8p22 loci in human prostate cancer. *Cancer Res* 53: 3869-3873, 1993
20. Brandt B, Schmidt H, de Angelis G, Zanker KS: Predictive laboratory diagnostics in oncology utilizing blood-borne cancer cells current best practice and unmet needs. *Cancer Lett.* 162,Suppl:S11-S16,Jan. 2001

21. Brandt B, Schmidt H, Feldner JC, Lelle RJ, Semjonow A, Beckmann A: Blood-borne cancer cells-quo vadis? *Int J Biol Markers* 15(1):111-3, Jan-Mar.2000
22. Baretton G, Vogts T, Blasenbren S, Löhrs U: Comparison of DNA-ploidy in prostate epithelial neoplasia and invasive carcinoma of the prostate. *Hum. Pathol.* 25: 506-513, 1994
23. Brawer MK, Benson MC, Bostwick DG, Djavan B, Lilja H, Semjonow A, Su S, Zhou Z: Prostate-Specific Antigen and Other Serum Markers: Current Concepts From the World Health Organisation Second International Consultation on Prostate Cancer. *Seminars in Urologic. Oncology* 17: 206-221, 1999
24. Brendler CB, Carmichael M, Walsh PC, Epstein JI: Radical prostatectomy (RP) for nonpalpable prostate cancer diagnosed by needle biopsy: pathologic and clinical findings. *J.Urol.* 149: 378A (abstract 660), 1993
25. Brewster SF, Browne S, Brown KW: Somatic allelic loss at the DCC, APC, nm23-H1 and p53 tumor suppressor gene loci in human prostatic carcinoma. *J Urol* 151 (4): 1073-1077, 1994
26. Brooks JD, Bova GS, Isaacs WB: Allelic loss of the retinoblastoma gene in primary human prostatic adenocarcinomas. *Prostate* 26: 35-39, 1995
27. Bühling KJ, Lepenies, Witt K: Intensivkurs: Allgemeine und spezielle Pathologie. Urban & Schwarzenberg 1995
28. Buerger H, Schmidt H, Beckmann A, Zänker KS, Boecker W, Brandt B: Genetic characterisation of invasive breast cancer: a comparison of CGH and PCR based multiplex microsatellite analysis. *J Clin. Pathol.* 54: 836-840, 2001
29. Cabeza-Arvelaiz Y, Sepulveda JL, Lebovitz RM, Thompson TC, Chinault AC: Functional identification of LZTS1 as a candidate prostate tumor suppressor gene on human chromosome 8p22. *Oncogene* 20: 4169-4179, 2001
30. Cairns P, Okami K, Halachmi S, Esteller M, Herman JG, Jen J, Isaacs WB, Bova GS, Sidransky D: Frequent inactivation of PTEN/MMAC1 in primary prostate cancer. *Cancer Res.* 57(22): 4997-5000, Nov.1997

31. Canzian F, Salovaara R, Hemminki A, Kristo P, Chadwick RB, Aaltonen LA, de la Chapelle A: Semiautomated assessment of loss of heterozygosity and replication errors in tumors. *Cancer Res.* 56: 3331-3337, 1996
32. Carter BS, Bova GS, Beaty TH, Steinberg GD, Childs B, Isaacs WB, Walsh PC: Hereditary Prostate Cancer: Epidemiologic and Clinical Features. *J.Urol.* 150(3): 797-802, 1993
33. Catalona WJ, Smith DS, Ratliff TL, Basler JW: Detection of organ-confined prostate cancer is increased through prostate specific antigen-based screening. *JAMA* 270(8): 948-54, 1993
34. Catalona WJ, Smith DS, Ratliff TL et al.: Measurement of prostate-specific antigen in serum as a screening test for prostate cancer. *New England Journal of Medicine* 324(17): 1156-1161, 1991
35. Catalona WJ, Bigg SW: Nerve-sparing radical prostatectomy: evaluation of results after 250 patients. *J.Urol.* 143(3): 538-544, 1990
36. Cichon S, Freudenberg J, Propping P, Nöthen MM: Variabilität im menschlichen Genom - Bedeutung für die Krankheitsforschung. *Deutsches Ärzteblatt* 46, 15. Nov. 2002
37. Chapman M: Molecular analysis of BRCA1 Function. Salk Institut for Biological Studies, 1997
38. Cheng, CW, Bergstralh, EJ and Zincke, H: Stage D1 prostate cancer. A nonrandomized comparison of conservative treatment options versus radical prostatectomy. *Cancer* 71(3 Suppl): 996-1004, 1993
39. Cheng L, Shan A, Cheville JC, Qian J, Bostwick DG: Atypical adenomatous hyperplasia of the prostate: a premalignant lesion? *Cancer Res* 58(3):389-91, Feb.1998
40. Cheng L, Bostwick DG, Li G, Wang Q, Hu N, Vortmeyer AO, Zhuang Z: Allelic imbalance in the clonal evolution of prostate carcinoma. *Cancer* 85 (9): 2017-2022,1999
41. Cheng L, Song SY, Pretlow TG, Abdul-Karim FW, Kung HJ, Dawson DV, ParkWS, Tsai M-L, Linehan WM, Emmert-Buck MR, Liotta LA, Zhuang Z: Evidence of independent origin of multiple tumors from patients with

- prostate cancer. *Journal of the National Cancer Institute*, Vol.90 (3): 233-237, 1998
42. 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* 56: 3091-3102, 1996
 43. Chodak GW, Thisted RA, Gerber GS et al.: Results of conservative management of clinically localized prostate cancer. *New England Journal of Medicine* 330(4): 242-248, 1994
 44. Coleman WB, Tsongalis GJ: Multiple mechanisms account for genomic instability and molecular mutation in neoplastic transformation. *Clin. Chem.* 41(5): 644-57. May 1995
 45. Cooney KA, Wetzel JC, Merajver SD, Macoska JA, Singleton TP, Wojno KJ: Distinct regions of allelic loss on 13q in prostate cancer. *Cancer Res* 56: 1142-1145, 1996
 46. Corral DA, Bahnson RR: Survival of men with clinically localized prostate cancer detected in the eighth decade of life *J.Urol.* 151(5): 1326-1329, 1994
 47. Coughlin SS, Hall IJ: A review of genetic polymorphisms and prostate cancer risk. *Ann Epidemiol* 12: 182-196, 2002
 48. 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.* 56: 4475-4482, 1996
 49. Dahia PLM, Aguiar RCT, Alberta J, Kum JB, Caron S, Sill H, Marsh DJ, Ritz J, Freedman A, Stiles C, Eng C: PTEN is inversely correlated with the cell survival factor Akt/PKB and is inactivated via multiple mechanisms in haematological malignancies. *Hum. Molec. Genet.* 8: 185-193, 1999
 50. Devilee P, Cleton-Jansen AM, Cornelisse CJ: Ever since Knudson. *Trends Genet* 17: 569-573, 2001
 51. Dhom G: Epidemiologie and morphogenetic aspects of prostate cancer. *Urologe A* 30 (3): 3-4, 1991

52. Dhom G: Pathological findings of the prostate and their consequences. a critical view *Verh. Dtsch. Ges. Pathol.* 77: 70-2, 1993
53. Djavan B, Susani M, Bursa B, Basharkhah A, Simak R, Marberger M: Predictability and significance of multifocal prostate cancer in radical prostatectomy specimen. *Tech Urol.* 5 (3): 139-42, Sept. 1999
54. Doll JA, Zhu X, Furman J, Kaleem Z, Torres C, Humphrey PA, Donis-Keller H: Genetic analysis of prostatic atypical adenomatous hyperplasia (adenosis). *Am J Pathol.*155(3):967-7120, Sep.1999
55. Dong JT, Boyd JC, Frierson HF Jr.: Loss of heterozyosity at 13q14 and 13q21 in high grade, high stage prostate cancer. *Prostate* 49:166-171, 2001
56. Dong, JT: Chromosomal deletions and tumor suppressor genes in prostate cancer. *Cancer and Metastasis Reviews* 20: 172-193,2001
57. Dumur CI, Dechsukhum C, Ware JJ, Cofield SS, Best AM, Wilkinson DS, Garrett CT, Ferreira-Gonzalez A: Genome-wide detection of LOH in prostate cancer using human SNP microarray technology. *Genetics* 81 (3): 260-9, Mar.2003
58. Edwards MC, Gibbs RA: Multiplex PCR: advantages, development, and applications. *PCR Methods* 3(4): 65-75, Feb.1994
59. Eisenberger MA: Chemotherapy for endocrine resistant cancer of the prostate. *Progr. Clin. Biol. Res.* 359:155-164, 1990
60. Eisenberger M: The evolving role of chemotherapy in hormone refractory cancer of the prostate with special emphasis on suramin. In: *ASCO Educational Book*, pp 148-150, Orlando, Florida, 1993
61. Eisenberger MA: Chemotherapy for prostate carcinoma. *Journal of the National Cancer Institute Monograph* 7: 151-163, 1988
62. Eisenberger MA, Simon R, O'Dwyer PJ, Wittes RE, Friedman MA: A reevaluation of nonhormonal cytotoxic chemotherapy in the treatment of prostatic carcinoma. *J Clin Oncol* 3:827-841, 1985
63. Elo JP, Kyllonen AP, Lukkarinen O, Vihko P: Three independently deleted regions at chromosome arm 16q in human prostate cancer: Allelic loss at 16q241-q24.2 is associated with aggressive behaviour of disease, recurrent

- growth, poor differentiation of the tumour and poor prognosis for the patient. *Br J Cancer* 79: 156-160, 1999
64. Elo JP, Harkonen P, Kyllonen AP, Poutanen M, Vihko R, Vihko P: Loss of heterozygosity at 16q24.1-q24.2 is significantly associated with metastatic and aggressive behaviour of prostate cancer. *Cancer Res* 57:3356-3359, 1997
65. Engelman JA, Zhang XL, Lisanti MP: Genes encoding human caveolin-1 and -2 are co-localized to the D7S522 locus(7q31.1), a known fragile site (FRA7G) that is frequently deleted in human cancers. *FEBS Lett* 436:403-410, Oct.1998
66. Epstein JI, Paull G, Eggleston JC et al.: Prognosis of untreated stage A1 prostatic carcinoma: a study of 94 cases with extended follow-up. *J.Urol.* 136(4): 837-839, 1986
67. Erbersdobier A, Graefen M, Wullbrand A, Hammerer P, Henke RP: Allelic losses at 8p, 10q, 11p, 16q, 17p and 18 q in prostatic carcinomas: The impact zonal location, Gleason grade, and tumour multifocality. *Prostate Cancer Prostatic Dis.* 2(4): 204-210, Jul. 1999
68. Everitt B: *Cluster Analysis* (second edition). Halsted, New York, 1980
69. Facher EA, Law JC: PTEN and prostate cancer. *J Med Genet* 35: 790, 1998
70. Fan K, Dao DD, Schultz M, Fink LM: Loss of heterozygosity and overexpression of p53 gene in human primary prostatic adenocarcinoma. *Diagn. Mol. Pathol.* 3(4):265-70, Dec.1994
71. Fearhead NS, Wilding JL, Bodmer WF: Genetics of colorectal cancer: hereditary aspects and overview of colorectal tumorigenesis. *Br. Med. Bull.* 64: 27-43, 2002
72. Fearon ER, Vogelstein B: A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell.* 61(5): 759-67, Jun.1990
73. Feilotter HE, Nagai MA, Boag AH, Eng C, Mulligan LM: Analysis of PTEN and the 10q23 region in primary prostate carcinomas. *Oncogene* 16: 1743-1748, 1998
74. Feroze- Merzoug F, Schober MS, Chen YQ: Molecular profiling in prostate cancer. *Cancer and Metastasis Review* 20: 165-171, 2001

75. Fiedler U, Ehlers W, Meye A, Fussel S, Faller G, Schmidt U, Wirth MP: LOH analyses in the region of the putative tumour suppressor gene C13 on chromosome 13q13. *Anticancer Res.* 21: Jul.-Aug.2001
76. Forman JD, Order SE, Zinreich ES et al.: Carcinoma of the prostate in the elderly: the therapeutic ratio of definitive radiotherapy. *Journal of Urology* 136(6): 1238-1241, 1986
77. Forman JD, Zinreich E, Lee DJ et al.: Improving the therapeutic ratio of external beam irradiation for carcinoma of the prostate. *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics* 11(12): 2073-2080, 1985
78. Foster LS, Jajodia P, Fournier G Jr, Shinohara K, Carroll P, Narayan P: The value of prostate specific antigen and transrectal ultrasound guided biopsy in detecting prostatic fossa recurrences following radical prostatectomy. *J Urol.* 149(5): 1024-8, May1993
79. Frohmüller HGW, Theiss M, Manseck A, Wirth MP: Survival and quality of life of patients with stage D1 (T1-2 pN1-2 M0) prostate cancer. *Eur.Urol.* 27: 202-206, 1995
80. Gao X, Zacharek A, Salkowski A, Grignon DJ, Sakr W, Porter AT, Honn KV: Loss of heterozygosity of the BRCA1 and other loci on chromosome 17q in human prostate cancer. *Cancer Res* 55:1002-1005, 1995
81. Gao X, Zacharek A, Grignon DJ, Sakr W, Powell IJ, Porter AT, Honn KV: Localization of potential tumor suppressor loci to a < 2 Mb region on chromosome 17q in human prostate cancer. *Oncogene* 11: 1241-1247, 1995
82. Garnick MB: Prostate cancer: screening, diagnosis, and management. *Annals of Internal Medicine* 118(10): 804-818, 1993. Gerber GS, Chodak GH: Routine screening for cancer of the prostate. *Journal of the National Cancer Institute* 83(5): 329-335, 1991
83. Gibbons RP: Prostate cancer – chemotherapy. *Cancer* 60:586-588, 1987
84. Gleason DF: Classification of prostatic carcinomas. *Cancer Chemother. Rep.* 50(3): 125-8, Mar.1966
85. Götz C, Montenarh M: Das Wachstumssuppressorgen p53 - Von der Grundlagenforschung bis zur klinischen Anwendung. Universität des Saarlandes, Publikation 1997

86. Gohagan JK: Early Detection Branch, Early Detection and Community Oncology Program, DCPC, NCI, NIH: A 16-Year Randomized Screening Trial for Prostate, Lung, Colorectal, and Ovarian Cancer PLCO Trial (Summary Last Modified 05/95), PLCO-1, clinical trial, active, 11/16/93
87. Goldrath DE, Messing EM: Prostate specific antigen: not detectable despite tumor progression after radical prostatectomy. *J Urol.* 142(4): 1082-4, Oct.1989
88. Goodrich DW, Wang NP, Quian YW, Lee EY, Lee WH: The retinoblastoma gene product regulates progression through the G1 phase of cell cycle. *Cell* 67: 293-302, 1991
89. Graverson PH, Nielsen KT, Gasser TC et al.: Radical prostatectomy versus expectant primary treatment in stages I and II prostatic cancer: a fifteen-year follow-up. *Urology* 36(6): 493-498, 1990
90. Gsur A, Preyer M, Haidinger G, Zidek T, Madersbacher S, Schatzl G, Marberger M, Vutuc C, Micksche M: Polymorphic CAG repeats in the androgen receptor gene, prostate-specific antigen polymorphism and prostate cancer risk. *Carcinogenesis* 23(10): 1647-1651, Oct.2002
91. Haggman MJ, Wojno KJ, Pearsall CP, Macoska JA: Allelic loss of 8p sequences in prostatic intraepithelial neoplasia and carcinoma. *Urology* 1997 Oct;50(4):643-7
92. Hanks GE, Myers CE, Scardino PT: Cancer of the prostate In: DeVita Jr VT, Hellman S, Rosenberg SA, eds: *Cancer - principles and practice of oncology*, 4th ed, pp 1073 - 1113, J.B. Lippincott Philadelphia 1993
93. Hansen LL, Jensen LL, Dimitrakakis C, Michalas S, Gilbert F, Barber HR, Overgaard J, Arzimanoglou II: Allelic imbalance in selected chromosomal regions in ovarian cancer. *Cancer Genet. Cytogenet.* 139 (1): 1-8, Nov.2002
94. Hartenstein R, Faul P: Prostatakarzinom. In: Huhn D, Herrmann R, Hrsg., *Medikamentöse Therapie maligner Erkrankungen*, 2. Aufl., pp 313-324, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1990
95. Hartigan JA: *Clustering Algorithms*. Wiley, New York, 1975
96. Healy B: From the National Institutes of Health: Does vasectomy cause prostate cancer? *JAMA* 269(20): 2620, 1993

97. Helpap B: Pathologie der ableitenden Harnwege und der Prostata. Springer 1989
98. Helpap B: Grading and prognostic significance of urologic carcinomas. *Urol. Int.* 48(3): 245-57, 1992
99. Helpap B, Bostwick DG, Montironi R: The significance of atypical neoplasia and prostatic intraepithelial neoplasia for the development of prostate carcinoma. An update. *Virchows Arch.* 426(5): 425-34, 1995
100. Helpap B, Böcking A, Dhom G et al.: Klassifikation, histologisches und zytologisches Grading sowie Regressionsgrading des Prostatakarzinoms. Eine Empfehlung des pathologisch-urologischen Arbeitskreises "Prostatakarzinom" *Pathologe* 6(1): 3-7, 1985
101. Hinman F: Screening for prostatic carcinoma. *J. Urol.* 145(1): 126-130, 1991
102. Hislop RG, Pratt N, Stocks SC, Steel CM, Sales M, Goudie D, Robertson A, Thompson AM: Karyotypic aberrations of chromosomes 16 and 17 are related to survival in patients with breast cancer. *Br. J. Surg.* 89 (12): 1581-6, Dec.2002
103. Hölzel D: Epidemiologie des Prostatakarzinoms. *Fortschr.Med.* 109(26): 521-525, 1991
104. Holmberg L, Bill-Axelsson A, Helgesen F, Salo J, Folmerz P, haggman M, Andersson SO, Spangberg A, Busch C, Nordling S, Palmgren J, Adami HO, Johanson JE, Bo J: A Randomized Trial Comparing Radical Prostatectomy with Watchful Waiting in Early Prostate Cancer. *N Engl. J Med.* 347(11): 781-789, Sep.2002
105. Huang J, Zheng S, Pan QR, Deng YC: p53 mutations in sporadic colorectal cancers with microsatellite instability. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi* 83 (13): 1130-3, Jul.2003
106. Hyytinen ER, Frierson HF, Boyd JC, Chung LW, Dong JT: Three distinct regions of allelic loss at 13q14, 13q21-22, and 13q33 in prostate cancer. *Genes Chromosomes Cancer* 25:108-114, 1999
107. Ishii H, Baffa R, Numata SI, Murakumo Y, Rattan S, Inoue H, Mori M, Fidanza V, Alder HJ, Croce CM: The FETZ1 gene at chromosome 8p22

- encodes a leucine-zipper protein, and its expression altered in multiple human tumors. PNAS 96: 3928-3933, 1999
108. Jancarkova N, Zikan M, Pohlreich P, Freitag P, Matous B, Zivny J: Detection and occurrence of BRCA1 gene mutation in patients with carcinoma of the breast and ovary. *Ceska Gynekol.* 68 (1): 11-6, Jan.2003
109. Jenkins RB, Qian J, Lee HK, Huang H, Hirasawa K, Bostwick DG, Proffitt J, Wilber K, Lieber MM, Liu W, Smith DI: A molecular cytogenetic analysis of 7q31 in prostate cancer. *Cancer Res.* 58(4):759-66, Feb1998
110. Jenkins RB, Takahashi S, DeLacey K, Bergstrahl E, Lieber M: Prognostic significance of allelic imbalance of chromosome arms 7q, 8p, 16q, 18q, in stage T3N0M0 prostate cancer. *Genes, Chromosomes and Cancer* 21: 131-143, 1998
111. Junker R, Brandt B, Zechel C, Assmann G: Comparison of prostate-specific antigen (PSA) measured by four combinations of free PSA and total PSA assays. *Clin. Chem.* 43(9): 1588-94, Sept.1997
112. Kagan J, Stein J, Babaian RJ, Joe YS, Pisters LL, Glassman AB, von Eschenbach AC, Troncoso P: Homozygous deletions at 8p22 and 8p21 in prostate cancer implicate these regions as the sites for candidate tumor suppressor genes. *Oncogene* 11: 2121-2126, 1995
113. Kaisary AV, Tyrrell CJ, Peeling WB et al.: Comparison of LHRH analogue (Zoladex) with orchiectomy in patients with metastatic prostatic carcinoma. *Brit. J.Urol.* 67(5): 502-508, 1991
114. Kalb VF Jr, Bernlohr RW: A new spectrophotometric assay for protein in cell extracts. *Anal. Biochem.* 82:363-371, 1977
115. Karan D, Lin M, Johansson SL, Batra SK: Current status of the molecular genetics of human prostatic adenocarcinomas. *Cancer* 103: 285-293, 2003
116. Kato I, Eastham J, Li B, Smith M, Yu H Genotype-phenotype analysis for the polymorphic CA repeat in the insulin-like growth factor-I (IGF-I) gene. *Eur. J. Epidemiol.* 18(3): 203-9, Aug.2003
117. Kennealey GT, Furr BJ: Use of the nonsteroidal anti-androgen Casodex in advanced prostatic carcinoma. *Urologic Clinics of North America* 18(1): 99-110, 1991

118. Kim S, Rimm D, Carter D, Khan A, Parisot N, Franco MA, Bale A, Haffty BG: BRCA Status, Molecular Markers, and Clinical Variables in Early, Conservatively Managed Breast Cancer. *Breast J.* 9 (3): 167-74, May-Jun.2003
119. Kleppe K, Ohtsuka E, Kleppe R, Molineux I, Khorana HG: Studies on polynucleotides. XCVI. Repair replications of short synthetic DNA's as catalyzed by DNA polymerases. *J Mol. Biol.* 14(2): 341-61, Mar.1971
120. Knudson AG: Two genetic hits (more or less) to cancer. *Cancer, Nature Reviews* 1(2):157-62, Nov.2001
121. Knudson AG: Cancer genetics. *Am J Med Genet* 111: 96-102, 2002
122. Koch K: Ein Beispiel für das Dilemma der Früherkennung, aus: *Medizinreport: PSA und Prostatakarzinom. Deutsches Ärzteblatt, Jg.100, Heft 39, 26. Sept. 2003*
123. Konishi N, Hiasa Y, Matsuda H, Tao M, Tzusuki T, Hayashi I, Kitahori Y, Shiraishi T, Yatani R, Shimazaki J, et al: Intratumor cellular heterogeneity and alterations in ras oncogene and p53 tumor suppressor gene in human prostate carcinoma. *Am J Pathol.* 147(4):1112-22, Oct.1995
124. Krahn MD, Mahoney JE, Eckman MH et al.: Screening for prostate cancer: a decision analytic view. *Journal of the American Medical Association* 272(10): 773-780, 1994
125. Kramer BS, Brown ML, Prorok PC et al.: Prostate cancer screening: what we know and what we need to know. *Annals of Internal Medicine* 119(9): 914-923, 1993
126. Kubota Y, Fujinami K, Uemura H, Dobashi Y, Miyamoto H, Iwasaki Y, Kitamura H, Shuin T: Retinoblastoma gene mutations in primary human prostate cancer. *Prostate* 27: 314-320, 1995
127. Kujawski M, Rydzanicz M, Sarlomo-Rikala M, Szyfter K: Rearrangements involving the 13q chromosome arm committed to the progression of laryngeal squamous cell carcinoma. *Cancer Genet. Cytogenet.* 137 (1): 54-8, Aug. 2002
128. Kunimi K, Bergerheim US, Larsson IL, Ekman P, Collins VP: Allelotyping of human prostatic adenocarcinoma. *Genomics* 11: 530-536, 1991

129. Kurimoto F, Gemma A, Hosova Y, Seike M, Takenaka K, Uematsu K, Yoshimura A, Shibuya M, Kudoh S: Unchanging frequency of loss of heterozygosity and size of the deleted region 8p21-23 during metastasis of lung cancer. *Int. J. Mol. Med.* 8 (1): 89-93, Jul. 2001
130. Kuriyama M, Loo R, Wang MC, Lee C, Killian CS, Papsidero LD, Inaji H, Nishiura T, Slack NH, Murphy GP, Chu TM: Prostatic acid phosphatase and prostate-specific antigen in prostate cancer. *Int. Adv. Surg. Oncol.* 5: 29-49, 1982
131. Lacombe L, Orlow I, Reuter VE, Fair WR, Dalbagni G, Zhang ZF, Cordon-Cardo C: Microsatellite instability and detection analysis of chromosome 10 in human prostate cancer. *Int J Cancer* 69(2):110-3, Apr.1996
132. Latil A, Bieche I, Pesche S, Volant A, Fournier G, Cussenot O, Lidereau R: Loss of heterozygosity at chromosome arm 13q and RB1 status in human prostate cancer. *Hum Pathol.* 30 (7): 809-15, Jul.1999
133. Latil A, Cussenot O, Fournier G, Driouch K, Lidereau R: Loss of heterozygosity at chromosome 16q in prostate adenocarcinoma: Identification of three independent regions. *Cancer Res* 57: 1058-1062, 1997
134. Latil A, Fournier G, Cussenot O, Lidereau R: Differential chromosome allelic imbalance in the progression of human prostate cancer. *J Urol.* 156: 2079-2083, 1996
135. Latil A, Cussenot O, Fournier G, Baron JC, Lidereau R: Loss of heterozygosity at 7q31 is a frequent and early event in prostate cancer. *Clin Cancer Res.* 1(11):1385-9, Nov.1995
136. Latini JM, Rieger-Christ KM, Wang DS, Silverman ML, Libertino JA, Summerhayes IC: Loss of heterozygosity and microsatellite instability at chromosomal sites 1q and 10q in morphologically distinct regions of late state prostate cancer. *J Urol* 166:1931-1936, 2001
137. Lawton CA, Cox JD, Glisch C et al.: Is long-term survival possible with external beam irradiation for Stage D1 adenocarcinoma of the prostate? *Cancer* 69(11): 2761-2766, 1992

138. Leach FS: Microsatellite instability and prostate cancer: clinical and pathological interpretations. *Current Opinion In Urology* 12: 407-411, 2002
139. Leach RJ, O'Connell P: Genetic pattern of prostate cancer progression. *Int J Cancer* 81: 219-224, 1999
140. Lee H, Park DS, Razani B, Russell RG, Pestell RG, Lisanti MP: Caveolin-1 mutations (P132L and null) and the pathogenesis of breast cancer: caveolin-1 (P132L) behaves in a dominant-negative manner and caveolin-1 (-/-) null mice show mammary epithelial cell hyperplasia. *Am. J. Pathol.* 161 (4): 1359-69, Oct.2002
141. Leube B, Drechsler M, Muhlmann K, Schafer R, Schulz WA, Santourlidis S, Anastasiadis A, Ackermann A, Visakorpi T, Muller W, Royer-Prokora B: Refind mapping of allele loss at chromosome 10q23-26 in prostate cancer. *Prostate* 50(3):135-44, Feb.2002
142. Li C, Dong J, Guan W: CAG microsatellite polymorphisms of androgen receptor gene and the stage and grade of prostate cancer *Zhonghua Zhong Liu Za Zhi* 2001
143. Li C, Berx G, Larsson C, Auer G, Aspenblad U, Pan Y, Sundelin B, Ekman P, Nodenskjold M, van Roy F, Bergerheim USR: Distinct deleted regions on chromosome segment 16q23-24 associated with metastases in prostate cancer. *Genes Chromosomes Cancer* 24: 175-182, 1999
144. Li CD, Larsson C, Futreal A, Lancaster J, Phelan C, Aspenblad U, Sundelin B, Liu Y, Ekman P, Auer G, Bergerheim USR: Identification of two distinct deleted regions on chromosome 13 in prostate cancer. *Oncogene* 16: 481-487, 1998
145. Li D, Sun H: PTEN/MMAC1/TEP1 suppresses the tumorigenicity and induces G1 cell cycle arrest in human glioblastoma cells. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 95: 15406-15411, 1998
146. Li J, Yen C, Liaw D, Podsypanina K, Bose S, Wang SI, Puc J, Miliareis C, Rogers L, McCombie R, Bigner SH, Giovanella, 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* 275: 1943-1947, 1997

147. Lightner DJ, Lange PH, Reddy PK, Moore L: Prostate specific antigen and local recurrence after radical prostatectomy. *J Urol.* 144(4): 921-6, Oct.1990
148. Lin Q, Zhuang YZ, XU DP, Ye JX, Chen PQ: Expression of PTEN protein and its correlation with p27 (kip1) and cyclin D1 expression in primary breast cancer. *Zonghua Zhong Liu Za Zhi* 25 (3): 246-9, May2003
149. Liu Y, West SC: Distinct functions of BRCA1 and BRCA2 in double-strand break repair. *Breast Cancer Res.* 4(1): 9-13, Nov.2002
150. Logothetis CJ, Hoosein NM, Hsieh J-T: The clinical and biological study of androgen independent prostate cancer. *Semin. Oncol.* 21:620-629, 1994
151. Lutchman M, Pack S, Kim AC, Azim A, Emmert-Buck M, van Hulle C, Zhuang Z, Chishti AH: Loss of heterozygosity on 8p in prostate cancer implicates a role for dematin in tumor progression. *Cancer Genet Cytogenet* 115: 65-69, 1999
152. Lundgren R, Kristofferson U, Heim S, Mandahl N, Mitelman F: Multiple structural chromosome rearrangements, including del(7q) and del(10q), in an adenocarcinoma of the prostate. *Cancer Genet Cytogenet* 35: 103-108, 1988
153. Lundgren R, Mandahl N, Heim S, Limon J, Henrikson H, Mitelman F: Cytogenetic analysis of 57 primary prostatic adenocarcinomas. *Genes Chromosomes Cancer* 4: 16-24, 1992
154. Luo RX, Postigo AA, Dean DC: Rb interacts with histone deacetylase to repress transcription. *Cell* 92: 4463-473, 1998
155. Mahlke U, Ulman A, Kunz J: Prognostic significance of prostatic carcinoma grading according to Helpap. *Verh. Dtsch. Ges. Pathol.* 77: 82-5, 1993
156. MacGrogan D, Bookstein R: Tumor suppressor genes in prostate cancer. *Semin. Cancer Biol* 8:11-19, 1997
157. MacGrogan D, Levy A, Bostwick D, Wagner M, Wells D, Bookstein R: Loss of chromosome arm 8p loci in the prostate Cancer: Mapping by quantitative allelic imbalance. *Genes, Chromosomes and Cancer* 10: 151-159, 1994
158. Macoska JA, Trybus TM, Benson PD, Sakr WA, Grignon DJ, Wojno KD, Pietruk T, Powell IJ: Evidence of three tumor suppressor gene loci on

- chromosome 8p in human prostate cancer. *Cancer Research* 55: 5390-5395, 1995
159. Marmur J, Anderson WF, Matthews L, Berns K, Gajewska E, Lane D, Doty P: The effect of ultraviolet light on the biological and physical chemical properties of desoxyribonucleic acids. *J. Cell. Comp. Physiol.* 58(3): Pt2:33-55, Dec.1961
160. Mashimo T, Watanabe M, Hirota S, Hosobe S, Miura K, Tegtmeyer PJ, Rinker- Schaeffer CW, Watabe K: The expression of the KAI1 gene, a tumor metastasis suppressor, is directly activated by p53. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998
161. Massenkeil G, Oberhuber H, Hailemariam S, Sulser T, Diener PA, Bannwart F, Schafer R, Schwarte-Waldhoff I: P53 mutations and loss of heterozygosity on chromosome 8p, 16q, 17q, and 18q are confined to advanced prostate cancer. *Anticancer Res.* 14 (6b): 2785-90, Nov.-Dec.1994
162. Matsuyama H, Pan Y, Yoshihiro S, Kadren D, Naito K, Bergerheim US, Ekman P: Clinical significance of chromosome 8p, 10q, and 16q deletions in prostate cancer. *Prostate* 54 (2): 103-11, Feb. 2003
163. 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* 59: 4291-4296, 1999
164. McNeal JE, Redwine Ea, Freiha FS, Stamey TA: Zonal distribution of the prostatic adenocarcinoma. Correlation with histologic pattern and direction of spread. *Am. J. Surg. Pathol.* 12(12): 897-906, Dec.1988
165. Miyatake K, gamba K, Ueoka H, Nishii K, Kiura K, Tabata M, Shibayamy T, Takigawa N, Kawaraya M, Tanomoto M: Prognostic significance of mutant p53 protein, P-glycoprotein and glutathione S-transfrease-pi in patients with unresectable non-small cell lung cancer. *Anticancer Res.* 23 (3C): 2829-36, May-Jun.2003
166. Mostofi FK: Grading of the prostatic carcinoma. *Cancer Chemother. Rep.* 59(1): 111-7, Jan.-Feb.1975

167. Mostofi FK, Sesterhenn J, Sobin LH: Histologic typing of prostate tumours:No.22, WHO, Geneva, 1980
168. Mullis KB, Faloona F, Scharf F, Saiki R, Horn G, Erlich H: Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. Cold Spring Harbor Simp. Quant. Biol. 51: 263-273, 1986
169. Nesbitt JA, Drago JR, Badalament RA: Transrectal ultrasonography. Early experience with use as prostate cancer detection tool. Urology 34(3): 120-2, Sep.1989
170. Nupponen NN, Carpten JD: Prostate cancer susceptibility genes: Many studies, many results, no answers. Cancer and Metastasis Reviews 20: 155-164, 2001
171. Nupponen NN, Hyytinen ER, Kalloniemi AH, Visakorpi T: Genetic alterations in prostate cancer cell lines detected by comparative genomic hybridization. Cancer Genet Cytogenet 101: 53-57, 1998
172. Oba K, Matsuyama H, Yoshihiro S, Kishi F, Takahashi M, Tsukamoto M, Kinjo M, Sagiya K, Naito K: Two putative tumor suppressor genes on chromosome arm 8p may play different roles in prostate cancer. Cancer Genet Cytogenet 124: 20-26, 2001
173. Oefelein MG, Smith N, Carter M, Dalton D, Schaeffer A: The incidence of prostate cancer progression with undetectable serum prostate specific antigen in a series of 394 radical prostatectomies. J. Urol. 154: 2128-2131, 1995
174. Oesterling JE, Jacobson SJ, Chute CG et al: Serum prostate-specific antigen in a community-based population of healthy men: establishment of age-specific reference ranges. JAMA 270(7): 860-4, 1993
175. Oesterling JE, Suman VJ, Bostwick DG, Zincke H: PSA-detected (clinical stage T1c or B0) prostate cancer: pathologically significant tumors. Urol. Clin. N. Am. 20(4): 687-93, 1993
176. Offit K: Risk Counseling and Management. Clinical Cancer Genetics, Wiley-Liss, New York, 1998

177. Orikasa K, Fukushige S, Hoshi S, Orikasa S, Kondo K, Miyoshi Y, Kubota Y, Horii J: Infrequent genetic alterations of PTEN gene in Japanese patients with sporadic prostate cancer. *Hum Genet.* 43:228-230, 1998
178. Osman I, Scher H, Dalbagni G, Reuter V, Zhang Z, Cordon-Cardo C: Chromosome 16 in primary prostate cancer : A microsatellite analysis. *Int J Cancer* 71: 580-584,1997
179. Palken M, Cobb OE, Simons CE, Warren BH, Aldape HC: Prostate cancer: comparison of digital rectal examination and transrectal ultrasound for screening. *J Urol.* 145(1): 86-92, Jan.1991
180. Palken M, Cobb OE, Warren BH, Hoak DC: Prostate cancer: correlation of digital rectal examination, transrectal ultrasound and prostate specific antigen levels with tumor volumes in radical prostatectomy specimens. *J Urol.* 143(6): 1155-62, Jun.1990
181. Park M, Dean M, Kauk K, Braun MJ, Gonda MA, Vande Woude G: Sequence of MET protooncogene cDNA has features characteristic of the tyrosine kinase family of growth-factor receptors. *PNAS* 84 (18): 6379-6383, 1987
182. Parmar H, Edwards L, Phillips RH et al. Orchiectomy versus long-acting D-Trp-6-LHRH in advanced prostatic cancer. *Brit. J.Urol.* 59(3): 248-254, 1987
183. Partin AW, Yoo J, Carter HB et al.: The use of prostate specific antigen, clinical stage and Gleason score to predict pathological stage in men with localized prostate cancer. *J.Urol.* 150: 110-114, 1993
184. Partin AW, Borland RN, Epstein JI, Brendler CB, Olsson CA, Paulson DF, Catalona WJ: Influence of wide excision of the neurovascular bundle(s) on prognosis in men with clinically localized prostate cancer with established capsular penetration. *J. Urol.* 150(1): 142-6, 1993
185. Paulson DF, Lin GH, Hinshaw W et al.: Radical surgery versus radiotherapy for adenocarcinoma of the prostate. *J.Urol.* 128(3): 502-504, 1982
186. Peeling WB: Phase III studies to compare goserelin (Zoladex) with orchiectomy and with diethylstilbestrol in treatment of prostatic carcinoma. *Urology* 33(5, Suppl): 45-52, 1989

187. Pena Gonzales AJ, Morote Robles J, de Torres Ramirez IM, Martinez Cuenca E: Current status of p53 tumor suppressor gene as a possible molecular marker of cancer of the prostate. *Actas Urol Esp* 22:279-290, 1998
188. Perinchery G, Nojima D, Goharderakhshan 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* 16: 1203-1209, 2000
189. Perinchery G, Bukurov N, Nakajima K, Hooda M, Oh BR, Dahiya R: Loss of two new loci on chromosome 8 (8p23 and 8q12-13) in human prostate cancer. *Int J Oncol* 14: 495-500, 1999
190. Pilepich MV, Bagshaw MA, Asbell SO et al.: Definitive radiotherapy in resectable (stage A2 and B) carcinoma of the prostate: results of a nationwide overview. *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics* 13(5): 659-663, 1987
191. Pittman S, Russel PJ, Jelbart ME, Wass J, Raghavan D: Flow cytometric and karyotypic analysis of a primary small cell carcinoma of the prostate: A xenograft cell line. *Cancer Genet Cytogenet* 26: 165-169, 1987
192. Ploysongsang S, Aron BS, Shehata WM et al.: Comparison of whole pelvis versus small-field radiation therapy for carcinoma of prostate. *Urology* 27(1): 10-16, 1986
193. Pontes JE, Jabalameli P, Montie J, Foemmel R, Howard PD, Boyett J: Prognostic implications of disappearance rate of biologic markers following radical prostatectomy. *Urology* 36(5): 415-9, Nov.1990
194. Possinger K, Altwein JE: Prostatakarzinom. In Wilmanns W, Huhn D, Wilms K, Hrsg., *Internistische Onkologie*, 1 Aufl., pp 465-474, Georg Thieme Verlag Stuttgart, 1994
195. Qian J, Hirasawa K, Bostwick DG, Bergstralh EJ, Slezak JM, Anders KL, Borell TJ, Lieber MM, Jenkins RB: Loss of p53 and c-myc overrepresentation in stage T(2-3)N(1-3)M(0) prostate cancer are potential markers for cancer progression. *Mod Pathol* 15: 35-44, 2002

196. Rainwater LM, Morgan WR, Klee GG, Zincke H: Prostate-specific antigen testing in untreated prostatic adenocarcinomas. *Mayo Clin. Proc.* 65(8): 1118-26, Aug.1990
197. Robinson RG, Preston DF, Schiefelbein M et al.: Strontium 89 for the palliation of pain due to osseous metastases. *JAMA* 274: 420-424, 1995
198. Ritter MM, Höppner W: Multiple endokrine Neoplasien. *Internist* 40: 486-492, 1999
199. Robert Koch-Institut: Krebs in Deutschland. Broschüre 2002
200. Roche Lexikon Medizin: Karzinogenese. 4. Auflage, Urban & Fischer 1999
201. Romagnoli S, Roncalli M, Graziani D, Cassani B, Roz E, Bonavina L, Peracchia A, Bosari S, Coggi G: Molecular Alterations of Barrett's Esophagus on Microdissected Biopsies. *Lab. Invest.* 81: 241-247, 2001
202. Romagnolo, DF, Chirnomas RB, Ku J, Jeffy BD, Payne CM, Holubec H, Ramsey L, Bernstein H, Bernstein C, Kunke K, Bhattacharyya A, Warneke J, Garewal H: Deoxycholate, and Endogenous Tumor Promotor and DNA Damaging Agent, Modulates BRCA-1 Expression in Apoptosis-Sensitive Epithelial Cells: Loss of BRCA-1 Expression in Colonic Adenocarcinomas. *Nutr. Cancer* 46 (1): 82-92, 2003
203. Rubin MA, Gerstein A, Reid K, Bostwick DG, Cheng L, Parsons R, Papadopoulos N: 10q23.3 loss of heterozygosity is higher in lymph node-positive(pT2-3,N+) versus lymph node-negative(pT2-3, N-) prostate cancer. *Hum Pathol* 31: 504-508, 2000
204. Ruijter ETHG, Miller GJ, van de Kaa CA, van Bokhoven A, Bussemakers MJG, Debruyne MJ, Ruiters DJ, Schalken JA: Molecular analysis of multifocal prostate cancer lesions. *J. Pathol.* 188: 271-277, 1999
205. Rukstalis DB, Bales G, Gerber GS, Chodack GW: Radical perineal prostatectomy as monotherapy for localized prostatic cancer. *J.Urol.* 149(Suppl.):380A (abstract 670), 1993
206. Safford SD, Goyeau D, Freemerman AJ, Bentley R, Everett ML, Grundy PE, Skinner MA: Fine mapping of Wilms' tumors with 16q loss of heterozygosity localizes the putative tumor suppressor gene to a region of 6.7 megabases. *Ann. Surg. Oncol.* 10 (2): 136-43, Mar.2003

207. Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, et al.: Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239: 487-491, 1988
208. Sakr WA, Haas GP, Cassin BF, Pontes JE, Crissman JD: The Frequency of Carcinoma and Intraepithelial Neoplasia of the Prostate in Young Male Patients. *J.Urol.* 150: 379-385, 1993
209. Saric T, Brkanac Z, Troyer DA, Padalecki SS, Sarosdy M, Williams K, Abadesco L, Leach RJ, O'Connell P: Genetic Pattern of prostate cancer progression. *Int. J. Cancer* 81: 219-224, 1999
210. Scaletscky R, Koch MO, Eckstein CW, Smith JA Jr: Pathologic findings in prostate cancer detected because of PSA elevation. *J.Urol.* 149: 303A (abstract 361), 1993
211. Sheldon CA, Williams RD, Fraley EE: Incidental carcinoma of the prostate: A review of the literature and critical reappraisal of classification. *J. Urol.* 124(5): 626-31, 1980
212. Schellhammer PF, Jordan GH, El-Mahdi AM: Pelvic complications after interstitial and external beam irradiation of urologic and gynecologic malignancy. *World Journal of Surgery* 10(2): 259-268, 1986
213. Scher HI, Fossa S: Prostate cancer in the era of prostate-specific antigen. *Current Opinion in oncology* 7:281-291, 1995
214. Scher HI, Chung LW: Bone metastases: improving the therapeutic index. *Seminars in Oncology* 21(5): 630-656, 1994
215. Schmeller N, Busch M, Weiss M, Gerl A, Schalhorn A: "Prostatakarzinom" Tumorzentrum München Nov.1998, Empfehlung von Krebsinfo. de
216. Schmeller N, Lubos W: Early endocrine therapy versus radical prostatectomy combined with early endocrine therapy for stage D1 prostate cancer. *Brit. J. Urol.* 79: 226-234, 1997
217. Schmiedt E, Schmeller N, Mayer P: Komplikationen nach externer Strahlentherapie des Prostatakarzinoms. *Urologe A* 23: 149-152, 1984
218. Schröder FH: Therapeutic approaches to prostate cancer. Educational Book, European Society for Medical Oncology, 1994

219. Schröder FH, Blom JH, Hop WC, Mostofi FK: Grading of the prostatic cancer: II. The prognostic significance of the presence of multiple architectural patterns. *Prostate* 6(4): 403-15, 1985
220. Semjonow A, Hamm M, Rathert P: Half-life of prostate-specific antigen after radical prostatectomy: the decisive predictor of curative treatment? *Eur. Urol.* 21 (3): 200-5, 1992
221. Shattuck TM, Kim TS, Costa J, Yandell DW, Imanishi Y, Palanisamy N, Gaz RD, Shoback D, Clark OH, Monchik JM, Wierman ME, Hollenberg A, Tojo K, Chaganti RS, Arnold A: Mutational analyses of RB and BRCA2 as candidate tumor suppressor genes in para-hyroid carcinoma. *Clin. Endocrinol. (Oxf.)* 59 (2): 180-9, Aug.2003
222. Sheldon CA, Williams RD, Fraley EE: Incidental Carcinoma of the Prostate: A Review of the Literature and Critical Reappraisal of Classification. *J.Urol.* 124(5): 626-31, 1980
223. Shridhar V, Sun QC, Miller OJ, Kalemkerian GP, Petros J, Smith DI: Loss of heterozygosity on the long arm of human chromosome 7 in sporadic renal cell carcinomas. *Oncogene* 15 (22): 2727-33, Nov.1997
224. Sökeland J, Schulze H, Rubben H: *Urologie*. Thiemeverlag, 2002
225. Steinberg, GD, Epstein, JI, Pintadosi, S and Walsh, PC: Management of stage D1 adenocarcinoma of the prostate: The Johns Hopkins experience 1974 to 1987. *J.Urol.*, 144(6): 1425-32, 1990
226. Strup SE, Pozzatti RO, Florence CD, Emmert- Buck MR, Duray PH, Liotta LA, Bostwick DG, Linehan WM, Vocke CD: Chromosome 16 allelic loss analysis of a large set of microdissected prostate carcinomas. *J Urol* 162:590-594, 1999
227. Swalwell JI, Vocke CD, Yang Y, Walker JR, Grouse L, Myers SH, Gillespie JW, Bostwick DG, Duray PH, Linehan WM, Emmert-Buck MR: Determination of a Minimal Deletion Interval on Chromosome Band 8p21 in Sporadic Prostate Cancer. *Genes, Chromosomes and Cancer* 33: 201-205, 2002
228. Suzuki H, Komiya A, Emi M, Kuramochi H, Shiraishi T, Yatani R, Sshimazaki J: Three distinct commonly delated regions of chromosome arm

- 16q in human primary and metastatic prostate cancers. *Genes Chromosomes Cancer* 17: 225-233, 1996
229. Takahashi S, Shan AL, Ritland SR, Delacey KA, Bostwick KA, Bostwick DG, Lieber MM, Thibodeau SN, Jenkins RB: Frequent loss of heterozygosity at 7q31.1 in primary prostate cancer is associated with aggressiveness and progression. *Cancer Research* 55: 4114-4119, 1995
230. Takanishi DM Jr, Kim YS, Kelemen PR, Yaremko ML, Kim AH, Ramesar JE, Horrigan SK, Montag A, Michelassi F, Westbrook CA: Chromosomal 8 Losses in Colorectal Carcinoma: Localization and Correlation With Invasive Disease. *Mol. Diagn.* 2 (1): 3-10, Mar.1997
231. Tamboli P, Amin MB, Xu HJ, Linden MD: Immunohistochemical expression of retinoblastoma and p53 tumor suppressor genes in prostatic intraepithelial neoplasia: comparison with prostatic adenocarcinoma and benign prostate. *Mod Pathol.* 11:247-252, 1998
232. Tamura M, Gu J, Matsumoto K, Aota S, Parsons R, Yamada KM: Inhibition of cell migration, spreading, and focal adhesions by tumor suppressor PTEN. *Science* 280: 1614-1617, 1998
233. Tanaka M, Grossman HB: In vivo gene therapy of human bladder cancer with PTEN suppresses tumor growth, down regulates phosphorylated Akt, and increases sensitivity to doxorubicin. *Gene Ther.* 10 (19): 1636-42, Sep.2003
234. Theodorescu D, Broder SR, Boyd JC, Mills SE, Frierson HF Jr.: p53, bcl-2 and retinoblastoma proteins as long-term prognostic markers in localized carcinoma of the prostate. *J Urol* 158: 131-137, 1997
235. Tomlinson IPM, Lambros MBK, Roylance RR: Loss of Heterozygosity Analysis: Practically and Conceptually Flawed? *Genes Chromosomes Cancer* 34: 349-353, 2002
236. Trappman J, Sleddens HFBM, van der Weiden MM, Dinjens WNM, Konig JJ, Schroder FH, Faber PW, Bosman FT: Loss of heterozygosity of chromosome 8 microsatellite loci implicates a candidate tumor suppressor gene between loci D8S87 and D8S133 in human prostate cancer. *Cancer Research* 54: 6061-6064, 1994

237. Tuna B, Yorukoglu K, Tuzel E, Gurray M, Mungan U, Kirkali Z: Expression of p53 and mdm2 and their significance in recurrence of superficial bladder cancer. *Pathol. Res. Pract.* 199 (5): 323-8, 2003
238. Ueda T, Emi M, Suzuki H, Komiya A, Akakura K, Ichikawa T, Watanabe M, Shiraishi T, Masai M, Igarashi T, Ito H: Identification of a I-cM region of common deletion on 13q14 associated with human prostate cancer. *Cancer* 24: 183-190, 1999
239. Unnisa AI, Schriml LM, Dean M: Mutational spectra of PTEN/MMAC1 G: a tumor suppressor gene with lipid phosphatase activity. *Journal of the National Cancer Institute* 91 (22): 1922-1932, 1999
240. van Dekken H, Vissers CJ, Tilanus HW, Tanke HJ, Rosenberg C: Clonal analysis of a case of multifocal oesophageal (Barrett's) adenocarcinoma by comparative genomic hybridization. *J. Pathol.* 188 (3): 263-6, Jul.1999
241. Vanherpe H, Eichenauer RH: *Klinikleitfaden Urologie*. Jungjohann Verlagsgesellschaft Neckarsulm, Stuttgart, 1992
242. Verhage BA, van Houwelingen K, Ruijter TE, Kiemeny LA, Schalke JA: Allelic imbalance in hereditary and sporadic prostate cancer. *Prostate* 54(1): 50-7, Jan.2003
243. Verma RS, Manikal M, Conte RA, Godec CJ: Chromosomal basis of adenocarcinoma of the prostate. *Cancer Invest* 17: 441-447, 1999
244. Vilkki S, Launonen V, Karhu A, Sistonen P, Vastrik I, Aaltonen LA: Screening for microsatellite instability target genes in colorectal cancers. *J Med. Genet.* 39 (11): 785-9, Nov.2002 Rb1 BRCA1
245. Vliestra RJ, van Alewijk DC, Hermans KG, van Steenbrugge GJ, Trapman J: Frequent inactivation of PTEN in prostate cancer cell lines and xenografts. *Cancer Res* 58: 2720-2723, 1998
246. Vocke CD, Pozzatti RO, Bostwick DG, Florence CD, Jennings SB, Strup SE, Duray PH, Liotta LA, Emmert-Buck MR, Linehan WM: Analysis of 99 microdissected prostate carcinomas reveals a high frequency of allelic loss on chromosome 8p12-21. *Cancer Res* 56: 2411-2416, 1996

247. Vogelzang NJ, Chodak GW, Soloway MS et al.: Goserelin versus orchiectomy in the treatment of advanced prostate cancer: final results of a randomized trial. *Urology* 46(2): 220-226, 1995
248. Voss, W: Taschenbuch der Statistik. Fachbuchverlag Leibzig Carl Hanser Verlag : 565-581, 2000
249. Walker RA, Jones JL, Chappell S, Walsh T, Shaw JA: Molecular pathology of breast cancer and its application to clinical management. *Cancer Metastasis Rev.* 16: 5-27, 1997
250. Walsh PC: Radical prostatectomy In: Walsh PC, Gittes RF, Perlmutter AD et al., Eds.: *Campbell's Urology*. Philadelphia: W.B. Saunders, 5th ed., 1986, pp 2754-2775
251. Wang YE, Wu X, Suzuki H, Reiter RE, Tran C, Vessella RL, Said JW, Isaacs WB, Sawyers CL: Inactivation of the tumor suppressor PTEN/MMAC1 in advanced human prostate cancer through loss of expression. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 5246-5250, 1998
252. Warburg O, Christian W: Isolierung und Kristallisation des Gärungsferments Enolase. *Biochem. Z.* 310: 384-421, 1941
253. Washburn JG, Wojno KJ, Dey J, Powell IJ, Macoska JA: 8pter-p23 deletion is associated with racial differences in prostate cancer outcome. *Clinical Cancer Research* 6: 4647-4652, Dec.2000
254. Watanabe M, Shiraishi T, Muneyuki T, Nagai M, Fukutome K, Murata M, Kawamura J Yatani,R: Allelic loss and microsatellite instability in prostate cancer in Japan. *Oncology* 55: 569-574, 1998
255. Weinberg RA: The retinoma protein and cell cycle control. *Cell* 81: 323-330, 1995
256. Wirth MP, Frohmuller HG: Prostatic-specific antigen and prostatic phosphatase in the detection of early prostate cancer and in the prediction of regional lymph node metastases. *Eur. Urol.* 21(4): 263-8, 1992
257. Wolf JS, Jr., Narayan P, Shinohara K, Stoller ML, Kerlikowske KM, Carroll PR: Selection of patients for laparoscopic pelvic lymphadenectomy prior to radical prostatectomy: a decision analysis. *Urology* 42: 680-688, 1993

258. Wong MP, Fung LF, Wang E, Chow WS, Chiu SW, Lam WK, Ho KK, Ma ES; Wan TS Chung LP: Chromosomal aberrations of primary lung carcinomas in nonsmokers. *Cancer* 97 (5): 1263-70, Mar.2003
259. Woolf SH: Screening for prostate cancer with prostate-specific antigen: An examination of the evidence. *New England Journal of Medicine* 333(21): 1401-1405, 1995
260. Wrba F: Tumorsuppressorgene und Onkogene-Grundlagen der Tumorgenese. *Facultas Bücher, Medizin* 9, 1997
261. Yagoda A, Petrylak D: Cytotoxic chemotherapy for advanced hormone-resistant prostate cancer. *Cancer* 71: 1098-1109, 1993
262. Yaremko ML, Kutza C, Lyzak J, Mick R, Recant WM, Wsetbrook CA: Loss of heterozygosity from the short arm of chromosome 8 is associated with invasive behaviour in breast cancer. *Genes Chromosomes Cancer* 16 (3): 189-95, Jul.1996
263. Yin Z, Spitz MR, Babaian RJ, Strom SS, Troncoso P, Kagan J: Limiting the location of a putative human prostate cancer tumor suppressor gene at chromosome 13q14.3. *Oncogene* 18(58): 7576-83,1999
264. Zenklusen JC, Thompson JC, Troncoso P, Kagan J, Conti CJ: Loss of heterozygosity in human primary prostate carcinomas: A possible tumor suppressor gene at 7q31.1. *Cancer Research* 54: 6370-6373, 1994
265. Zhang HS, Postigo AA, Dean DC: Active transcriptional repression by the Rb-E2F complex mediates G1 arrest triggered by p16(INK4a), TGF-beta, and contact inhibition. *Cell* 97: 53-61, 1999
266. Zhang JS, Nelson M, McIver B, Hay ID, Goellner JR, Grant CS, Eberhardt NL, Smith DI: Differential loss of heterozygosity at 7q31.2 in follicular and papillary thyroid tumors. *Oncogene* 17(6): 789-93, Aug.1998
267. Zheng HC, Li YL, Sun JM, Yang XF, Li XH, Jiang WG, Zhang YC, Xin Y: Growth, invasion, metastasis, differentiation, angiogenesis and apoptosis of gastric cancer regulated by expression of PTEN encoding products. *World J Gastroenterol.* 9 (8): 1662-6, Aug.2003
268. Zhou XP, Hoang JM, Li YJ, Seruca R, Carneiro F, Sobrinho-Simoes M, Lothe RA, Gleeson CM, Russell SE, Muzeau F, Flejou FJ, Hoang-Xuan K,

- Lidereau R, Thomas G, Hamelin R: Determination of the replication error phenotype in human tumors without the requirement for matching normal DNA by analysis of mononucleide repeat microsatellites. *Genes Chromosomes Cancer* 21, Feb.1998
269. Zinke H, Bergstrahl EJ, Blute ML et al.: Radical prostatectomy for clinically localized prostate cancer: long-term results of 1,143 patients from a single institution. *Journal of Clinical Oncology* 12(11): 2254-2263, 1994
270. Zundel W, Schindler C, Haas-Kogan D, Koong A, Kaper F, Chen E, Gottschalk AR, Ryan HE, Johnson RS, Jefferson AB, Stoke D, Giaccia AJ: Loss of PTEN facilitates HIF-1-mediated gene expression. *Genes Dev.* 14: 391-396, 2000

6. Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ABI	Applied Biosystems
AI	Allelische Imbalanz
AR	Androgenrezeptor
bp	<i>base pairs</i>
BPH	benigne Prostatahyperplasie
bzw.	Beziehungsweise
ca.	circa
CGH	<i>comparative genomic hybridization</i>
cT	kinisches Tumorstadium
CT	Computertomographie
dc	kritische Distanz
DNA	Desoxyribonuclein acid/Desoxyribonucleinsäure
DRU	digitale rektale Untersuchung
dNTP	Desoxynukleosid-5'-triphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
<i>et al.</i>	und andere (lat.: <i>et alii</i>)
Fa.	Firma
FISH	<i>fluorescence in situ hybridization</i>
f-PSA	freies, nicht komplexiertes PSA
g	Gramm
h	Stunden
HNPCC	<i>hereditary non-polyposis colon cancer</i>
HWZ	Halbwertszeit
HZG	Heterozygotiegrad
k. A.	keine Angaben
λ	Wellenlänge
Lfd.	Laufende
LOH	<i>Loss Of Heterozygosity</i>
MACS-Versuche	<i>Magnetic Cell Separation</i>
min.	Minuten
ml	Mililiter
MRT	Magnetresonanztomographie
ng	Nanogramm
Nr.	Nummer
OD	optische Dichte
PCa	Prostatakarzinom
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PSA	Prostata-spezifisches Antigen
PIN	prostatistische intraepitheliale Neoplasie
rpm	<i>rotations per minute</i>
SD	Standartabweichung
SNP	<i>Single Nucleotide Polymorphism</i>
s.	siehe
s. o.	siehe oben
sog.	sogenannt

Tab.	Tabelle
Temp.	Temperatur
t-PSA	<i>total-PSA</i> /Gesamt-PSA: freies und komplexiertes PSA
TRUS	Transrektaler Ultraschall der Prostata
u.	und
u. a.	unter anderem
UICC	Unio Internationalis Contra Cancerum
u.U.	unter Umständen
z.B.	zum Beispiel
z.T.	zum Teil
Σ	Summe
v. a.	vor allem

7. Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. rer. nat. Burkhard Brandt für die Überlassung des Themas dieser Dissertation. Er begleitete diese Arbeit stets mit größtem Interesse. Die zahlreichen anregenden Diskussionen und die Beantwortung meiner vielen Fragen trugen sehr zum Gelingen dieser Arbeit bei. Dafür meinen herzlichen Dank.

Zusätzlich möchte mich bei Herrn PD Dr. med. Axel Semjonow für die Bereitstellung der umfassenden Datensammlung bedanken. Diese, sowie sein ausgewiesenes Fachwissen und seine freundliche und hilfsbereite Unterstützung waren mir eine große Hilfe bei der Bearbeitung dieses Dissertationsthemas.

An dieser Stelle möchte ich mich auch ganz besonders bei Herrn Dr. rer. nat. Hartmut Schmidt bedanken, der mich durch fachliche Gespräche und Informationen zu labortechnischen Verfahren, die wesentlich zum Verständnis beigetragen haben, sehr unterstützt hat. Seine unermüdliche Hilfsbereitschaft und sein Zuspruch haben dieses Promotionsvorhaben überhaupt möglich gemacht.

Auch Herrn Dipl.-Biol. Konstantin Agelopoulos, Herrn Dipl.-Biol. Dirk Kemming und Herrn Dipl.-Biol. Mike Helms, ganz herzlichen Dank für ihren fachlichen Rat, und die stete Bereitschaft zu ideenreichen Diskussionen. Sie standen mir während der ganzen Zeit freundschaftlich zur Seite und haben mich wirklich sehr unterstützt.

Nicht zuletzt möchte ich mich bei den Patienten und den mir unbekanntem Mitarbeitern der Klinik für ihren Beitrag zur Realisation dieser Arbeit bedanken.

Zusätzlich möchte ich allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe Brandt, den Mitarbeitern des Zentrallabors und hier ganz besonders Frau Dr. rer. nat. Nicola Tidow und Frau Katrin Blaschei sowie Frau Dr. med. Elke Elze und Herrn Dr. med. Olaf Bettendorf von der Pathologie für ihre Hilfe bei der Bearbeitung der Proben herzlich danken.

Auch Herrn Dr. rer. nat. Reinhard Voß und Herrn Dr. rer. nat. Eberhard Korsching danke ich ganz herzlich für die versierte Unterstützung in statistischen Fragen.

Meine Dankbarkeit gilt meiner Familie und hier besonders meiner Mutter, die mit liebevollem Verständnis, großer Geduld und ihrem Glauben an mich das Studium und diese Arbeit ermöglicht hat.

8. Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name: Iris Gockel
Adresse: Walmanger 34
45355 Essen
Geburtsdatum/-Ort: 14.04.1967 in Arnsberg
Staatsangehörigkeit: deutsch
Konfession: römisch-katholisch
Familienstand: geschieden
Eltern: Franz Anton und Maria-Theresia Gockel

Schulbildung:

1973-1977 Kath. Grundschule St. Josef, Arnsberg
1977-1986 St. Ursula-Gymnasium, Arnsberg
Abschluß: Hochschulreife

Beruflicher Werdegang:

1986-1989 Ausbildung zur Krankenschwester am
Ev. Bethesda-Krankenhaus, Essen
1998-1990 Tätigkeit als examinierte Kranken-
schwester am Ev. Bethesda-Krankenhaus,
Essen
1990-1997 Tätigkeit als examinierte Kranken-
schwester im Zentral-OP des Karolinen-
hospitals, Arnsberg

Studium:

SS97-SS03 Studium der Humanmedizin an der WWU
Münster
04/2002-05/2003 PJ am Stadtkrankenhaus Soest
12.05.2003 Dritter Abschnitt der ärztlichen Prüfung und Erlangung
der Teilapprobation zur Ärztin im Praktikum
01.10.2004 Erlangung der Vollapprobation

Berufliche Tätigkeiten:

01.12.2003-30.03.2004 AIP in der Abteilung für Gynäkologie und Geburtshilfe
am Ev. Bethesda-Krankenhauses / Essen
01.04.2004-30.09.2004 AIP in der Abteilung für Frauenheilkunde und
Geburtshilfe am Alfred-Krupp-Krankenhaus in Essen
ab 01.10.2004 Weiterbildungsassistentin in der Abteilung für
Gynäkologie und Geburtshilfe am Alfred-Krupp-
Krankenhaus / Essen

9. Anhang

9.1. Weitere klinische und histopathologische Parameter

9.1.1. Patientengewicht in Kilogramm

Zur besseren Darstellung wurden die Körpergewichte der Patienten in Gewichtsklassen eingeteilt, die eine Spanne von jeweils 10 kg umfassen.

Die Mehrzahl der Patienten war zum Zeitpunkt der stationären Aufnahme zwischen 70 kg und 100 kg schwer. Für 32 Patienten existierten bezüglich dieses Parameters keine klinischen Angaben.

Tab.24: Körpergewicht aller Patienten der 3 Kollektive (k. A. = keine Angaben)

Kg	50-59	60-69	70-79	80-89	90-99	100-109	110-119	120-129	k. A.
Gesamtkollektiv (n=92)	1	3	18	21	8	5	3	1	32
monofokale Tumoren (n = 76)	1	3	14	16	6	5	3	1	27
multifokale Tumoren (n = 16)	0	0	4	4	3	0	0	0	5

9.1.2. Postoperativer Nodalstatus

Tabelle 25 veranschaulicht die postoperative Lymphknotensituation bei allen untersuchten Patienten. Für 13 Patienten standen bezüglich des Nodalstatus keine Angaben zur Verfügung.

Die Daten ergaben bei deutlich mehr als 60% der Patienten postoperativ einen negativen, also lymphknotenfreien Befund.

Tab.25: Nodalstatus aller Patienten der 3 Kollektive (k. A. = keine Angaben)

Nodalstatus	negativ	positiv	k. A.
Gesamtkollektiv (n=92)	67	12	13
monofokale Tumoren (n = 76)	58	10	8
multifokale Tumoren (n = 16)	9	2	5

9.1.3. Fernmetastasen (M)

Während des über 2 Jahre reichenden "Follow-up" wurden bei 2 Patienten aus dem Kollektiv mit monofokalen Tumoren Fernmetastasen festgestellt. Alle anderen

Patienten waren bis zur Beendigung der Studie M-negativ. Bei 2 Patienten wurden schon während der Diagnostik Knochenmetastasen festgestellt. Obwohl sie sich bereits zum Zeitpunkt der Operation in einem fortgeschrittenen Tumorstadium ($> pT3a$) befanden, waren PSA-Wiederanstiege nicht nachweisbar.

Bei Beendigung der Studie lebten beide Patienten noch.

9.1.4. Postoperativ ermitteltes Prostatagewicht

Es wurde eine Einteilung in verschiedene Gewichtsklassen in 10 g-Abständen vorgenommen. Deutlich war ein Überwiegen der Gewichtsklassen unter 60 g zu erkennen, wobei für 8 Patienten keine Angaben vorlagen.

Tab.26: Verteilung aller Patienten der 3 Kollektive in die Klassen für das Prostatagewicht (k. A. = keine Angaben)

Prostatagewicht in g	20 – 29	30 – 39	40 – 39	50 – 59	60 – 69	70 – 79	80 – 89	163	k. A.
Gesamtkollektiv (n =92)	11	22	20	16	8	4	2	1	8
monofokale Tumoren (n = 76)	9	18	17	12	8	4	2	0	6
multifokale Tumoren (n = 16)	2	4	3	4	0	0	0	1	2

9.1.5. Prostatavolumen

Für 39 Patienten wurden keine Daten übermittelt.

Zur besseren Darstellung wurde auch für die Beschreibung der Prostatavolumina ein Einteilung in vorgenommen, bei der die Grenzen in 10 ml-Abständen gewählt wurden.

Eine deutliche Mehrverteilung in den Bereichen von 10 ml- 50 ml Prostatavolumen war auffällig. Volumina unter 10 ml kamen gar nicht vor, große Volumina über 50 ml waren eher selten.

Tab.27: Prostatavolumina aller Patienten der 3 Kollektive (k. A. = keine Angaben)

Volumen in ml	10–19	20–29	30–39	40–49	50–49	60–69	70–79	135	k. A.
Gesamtkollektiv (n =92)	7	14	17	7	3	3	1	1	39
monofokale Tumoren (n = 76)	6	11	15	5	2	3	0	1	33
multifokale Tumoren (n = 16)	1	3	2	2	1	0	1	0	6

9.1.6. Histologischer Kapselbefund

Tabelle 28 zeigt die Ergebnisse der histologischen Untersuchungen hinsichtlich der Tumorausbreitung in Bezug auf die Prostatakapsel.

Bei der histologischen Aufarbeitung wurde bei nur 3 Präparaten eine tumorfreie Prostatakapsel festgestellt, bei 35 Proben war die Kapsel tumorös infiltriert und 50 Resektate zeigten eine Penetration der Organkapsel durch das Tumorgewebe. Ohne Angabe bezüglich der Kapselbeschaffenheit waren 4 Proben.

Tab.28: Kapselbefund aller Patienten der 3 Kollektive

Kapsel	frei	infiltriert	penetriert	keine Angaben
Gesamtkollektiv (n =92)	3	35	50	4
monofokale Tumoren (n = 76)	3	27	42	4
multifokale Tumoren (n = 16)	1	8	8	0

9.1.7. Beurteilung des Resektionsrandes

Bei der histologischen Begutachtung der Schnittländer der einzelnen Präparate, wurden in 51 Fällen tumorfreie Schnittländer ermittelt; bei 38 Präparaten fanden sich nichttumorfreie Resektionsländer. Für 3 Patienten lag bezüglich des Schnittlandes keine Angabe vor.

Tab.29: Resektionrand der Tumoren aller Patienten

Schnittland	negativ = tumorfrei	positiv = nicht frei	keine Angaben
Gesamtkollektiv (n =92)	51	38	3
monofokale Tumoren (n = 76)	41	32	3
multifokale Tumoren (n = 16)	10	6	0

9.1.8. Tumolvolumen

Zur besseren Darstellung wurden die Tumolvolumina in verschiedene ml-Klassen eingeteilt, die jeweils in 5-er Schritten ansteigen. Insgesamt lagen die Tumolvolumina zwischen 2 und 59 ml. Die deutliche Mehrzahl der Tumoren zeigte ein Volumen unter 10 ml. Für 10 Patienten lag bezüglich des Tumolvolumens keine Angabe vor.

Tab.30: Tumolvolumina (in ml) aller Patienten. (k. A. = keine Angaben)

Tumolvolumen in ml	1-5	6-10	11-15	16-20	21-25	26-30	31-35	36-40	41-45	45-50	51-55	56-60	k. A.
Gesamtkollektiv (n=92)	29	24	9	9	2	4	2	0	2	0	0	1	10
monofokale Tumoren (n = 76)	21	19	7	8	2	4	2	0	2	0	0	1	10
multifokale Tumoren (n = 16)	8	5	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0

9.1.9. Todesfälle

Während des Untersuchungszeitraums ist 1 Patient an seiner Prostatakreberkrankung verstorben. Postoperativ wurde bei ihm ein Tumorstadium pT4 ermittelt. Der t-PSA-Wert fiel niemals auf nicht meßbare Werte ab.

9.2. Allelische Imbalanz der Marker im Kollektiv der 76 Patienten mit monofokalen Tumoren in Korrelation zu klinischen und histopathologischen Parametern

9.2.1. Häufigkeit eines LOH der informativen Fälle in Relation zum Körpergewicht der Patienten

Nach Ermittlung des Medians 83 kg ergab die Aufteilung des Patientenkollektivs mit monofokalen Tumoren für die Gruppe mit Körpergewicht unter 83 kg 24 Patienten; 25 Patienten wogen exakt 83 kg oder waren schwerer. Für 27 Patienten lagen keine Angaben vor.

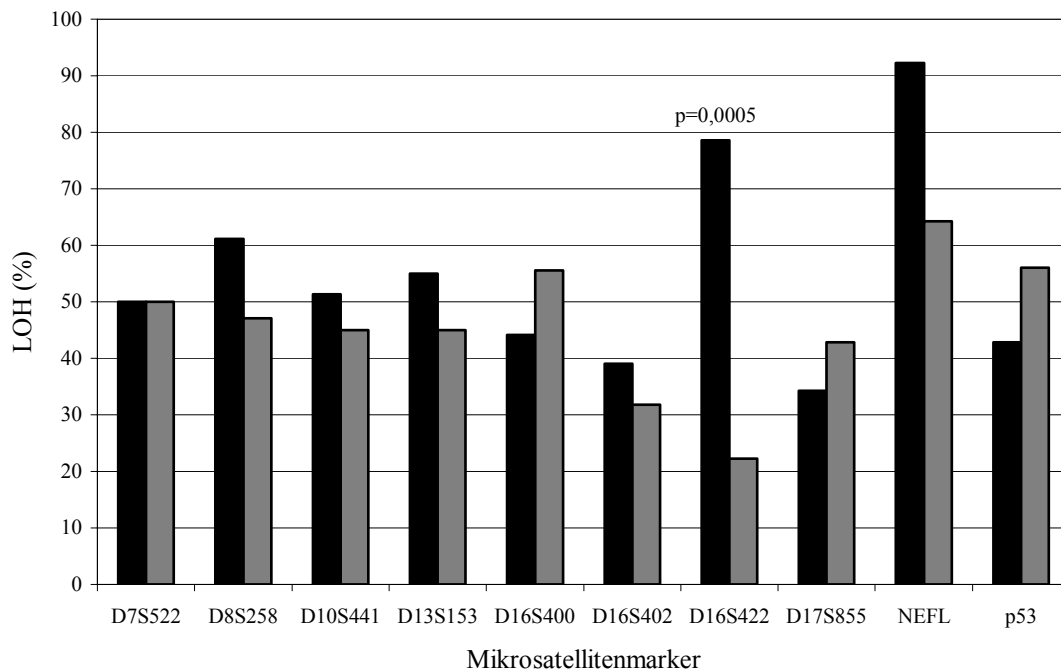


Abb.29: Prozentualer Anteil an LOH der Mikrosatellitenmarker in Relation zum Körpergewicht. Gesamtverteilung; n = 76; Median = 83 kg; n mit Körpergewicht > 83 kg = 24; n mit Körpergewicht \geq 83 kg = 25; n ohne Körpergewichtsangabe = 27 (■ = LOH bei Körpergewicht > 83 kg; ▒ = LOH bei Körpergewicht \geq 83 kg)

Unter den heterozygoten Merkmalsträgern zeigen sich zwischen den beiden Gruppen für die meisten Marker keine großen Unterschiede. Als einiger Marker mit statistisch signifikantem Unterschied stellt sich der Marker D16S422 dar, bei dem 79% der Patienten unter 83 kg Körpergewicht ein LOH zeigen. Nur 22% der Fälle \geq 83 kg weisen in diesem Marker LOH auf ($p= 0,0005$). Der gleichen Tendenz, jedoch deutlich weniger ausgeprägt folgt der Marker NEFL.

9.2.2. Häufigkeit eines LOH der informativen Fälle in Relation zum Nodalstatus

Die Einteilung bezüglich des Nodalstatus erfolgte in die Gruppen: Lymphknoten (LK) negativ und Lymphknoten positiv. Die Aufteilung der 76 Patienten ergab demzufolge 59 LK-negative und 9 LK-positive Patienten. Für 8 Patienten lagen keine Angaben vor.

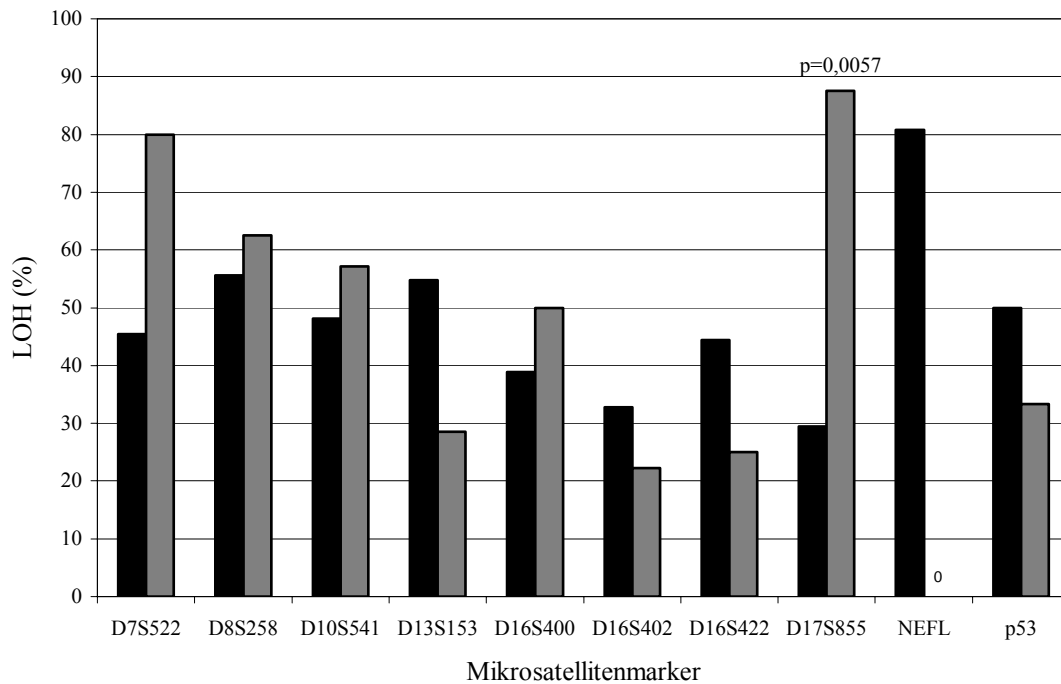


Abb.30: Prozentualer Anteil an LOH der Mikrosatellitenmarker in Relation zum Nodalstatus. Gesamtverteilung: n = 76; n mit LK negativ = 59; n mit LK positiv = 9; n ohne Nodalstatus-Angabe = 8 (■ = LOH bei; LK negativ ■ = LOH bei LK positiv)

Die Marker D7S522 (80% zu 45%) und D16S400 (50% zu 39%) zeigen deutliche Unterschiede, Marker D17S855 (88% zu 29%) einen statistisch signifikanten Unterschied ($p=0,0057$) mit einem höherem LOH-Anteil in der Gruppe der nodalpositiven Patienten. Andere, wie die Marker D13S153, D16S422, p53 und besonders NEFL, für den in der Klasse nodalpositiv kein Patient ermittelt werden konnte, zeigen deutlich häufiger einen LOH in der Gruppe der nodalnegativen Patienten. Die Marker D8S258 und D16S402 weisen keine deutlichen Unterschiede bezüglich des LOH-Anteils zwischen beiden Gruppen auf.

9.2.3. Häufigkeit eines LOH der informativen Fälle in Relation zum Prostatagewicht

Um für diesen Parameter zwei aussagekräftige Klassen bilden zu können, wurde postoperativ für das Gewicht des Prostataresektates der Median ermittelt. Dieser lag bei

53 g. Die Klasse < 53 g umfasste 50 Patienten, die Klasse ≥ 53 g umfasste 21 Patienten. Für 5 Patienten lagen bezüglich des Prostatagewichtes keine Angaben vor.

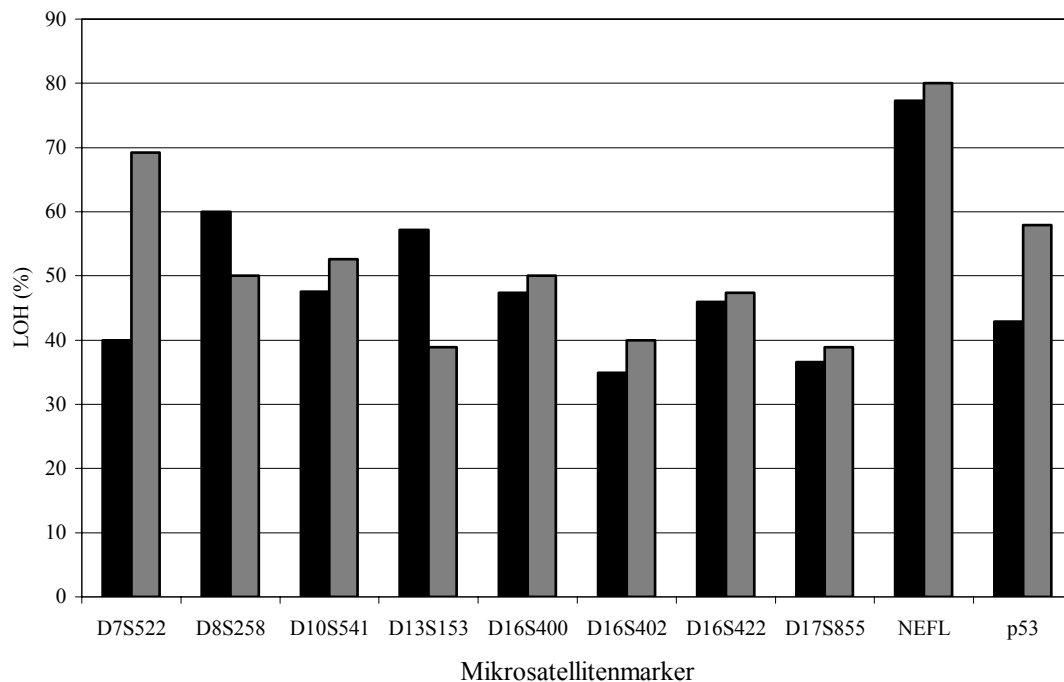


Abb.31: Prozentualer Anteil an LOH der Mikrosatellitenmarker in Relation zum Prostatagewicht. Gesamtverteilung: $n = 76$; Median = 53g; n mit Prostatagewicht < 53 g = 50; n mit Prostatagewicht ≥ 53 g: 21; n ohne Prostatagewichts-Angabe = 5 (■ = LOH bei ; Prostatagewicht < 53 g ■ = LOH bei Prostatagewicht ≥ 53 g)

Auf Marker D7S522 und Marker p53 zeigen sich klare, jedoch statistisch nicht relevante Unterschiede mit Überwiegen von LOH in der Klasse ≥ 53 g. Tendenzen mit Überwiegen von LOH in der Klasse < 53 g sind für die Marker D8S258 und D13S153 zu beobachten, für alle übrigen Marker sind keine wesentlichen Unterschiede bezüglich des LOH-Anteils festzustellen.

9.2.4. Häufigkeit eines LOH der informativen Fälle in Relation zum Prostatavolumen

Da für diesen Parameter der Median 34 ml ermittelt wurde, wurde das Kollektiv der 76 Patienten in eine Klasse mit Prostatavolumen weniger als 34 ml mit 31 Patienten, und in eine Klasse mit Prostatavolumen gleich oder mehr als 34 ml mit 42 Patienten eingeteilt. Für 3 Patienten lag für das Prostatavolumen keine Angabe vor.

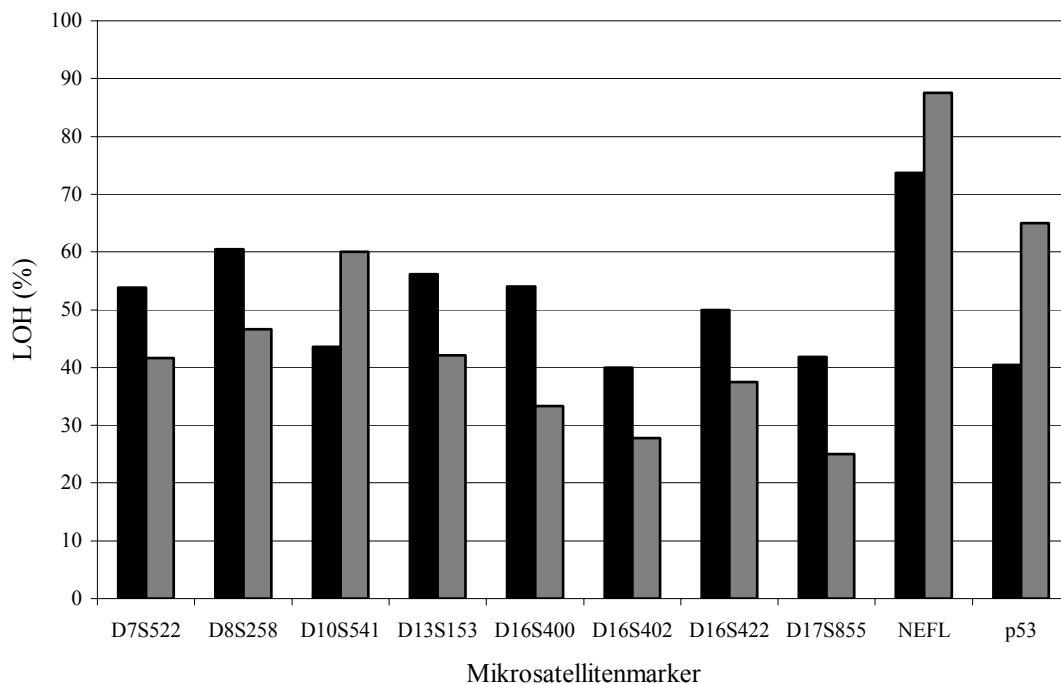


Abb.32: Prozentualer Anteil an LOH der Mikrosatellitenmarker in Relation zum Prostatavolumen. Gesamtverteilung: n = 76; Median = 34 ml; n mit Prostatavolumen < 34 ml: 31, n mit Prostatavolumen ≥ 34 ml = 42; n ohne Prostatavolumen-Angabe = 3 (■ = LOH bei Prostatavolumen < 34 ml; ▒ = LOH bei Prostatavolumen ≥ 34 ml)

Die Marker D10S541, NEFL und p53 zeigen einen deutlichen Unterschied mit häufigerem LOH in der Klasse der Volumina ≥ 34 ml. Alle anderen Marker stellen sich mit einem höheren LOH-Anteil in der Gruppe der Patienten mit den kleineren Prostatavolumina dar. Statistisch signifikante Unterschiede sind nicht zu beobachten.

9.2.5. Häufigkeit eines LOH der informativen Fälle in Relation zur Prostatakapsel

Um die Verteilung der Befunde bezüglich der Prostatakapsel dem genetischen Verhalten auf den 10 ausgewählten Markern zuordnen zu können, wurde eine Aufteilung in die Klassen 1. tumorfreie Kapsel und 2. vom Tumor infiltrierte oder penetrierte Kapsel vorgenommen. Dabei ergab sich bei der Aufteilung des Kollektivs der Patienten mit monofokalen Tumoren eine Gruppe von 2 Patienten deren Kapsel tumorfrei war; bei 70 Patienten war die Prostatakapsel entweder infiltrierte oder penetriert. Für 4 Patienten lagen bezüglich des Befundes der Prostatakapsel keine Befunde vor.

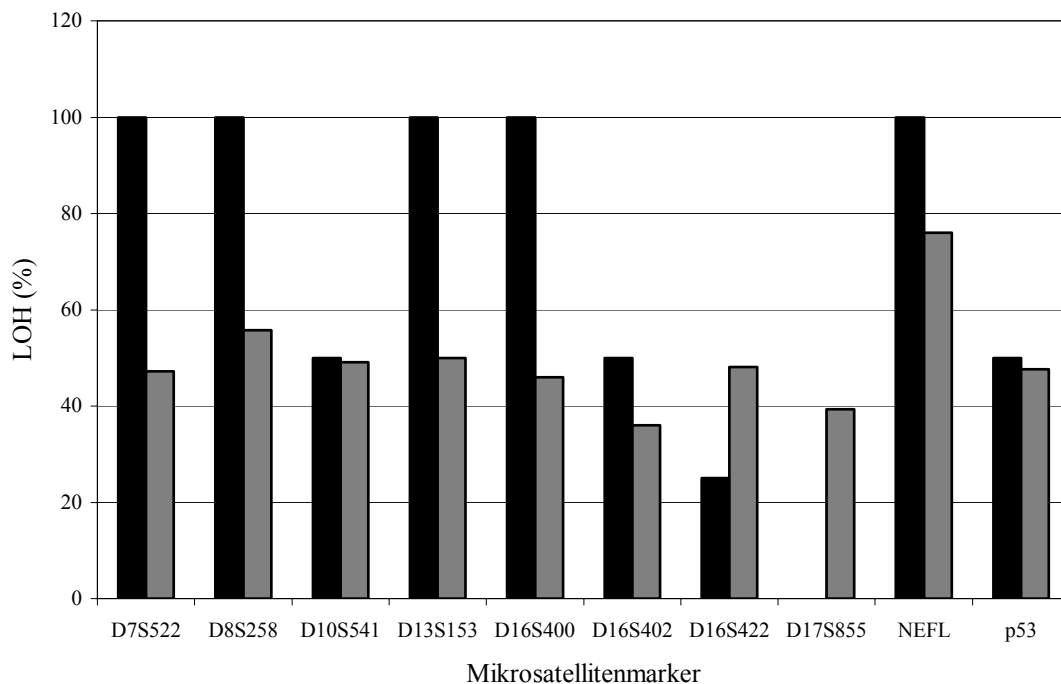


Abb.33: Prozentualer Anteil an LOH der Mikrosatellitenmarker in Relation zum Kapselbefund. Gesamtverteilung: n = 76; n mit Kapsel tumorfrei = 2; n mit Kapsel infiltriert oder penetriert = 70; n ohne Kapselbefund-Angabe = 4 (■ = LOH bei Kapsel tumorfrei; ■ = LOH bei Kapsel infiltriert oder penetriert)

Die Gruppe der Patienten mit tumorfreier Kapsel ist mit n = 2 sehr klein, und so zeigt sich für Marker D17S855 hier keinen LOH, für fünf Marker jedoch zeigen beide Patienten (100%) einen LOH. Durch die kleine Zahl der der tumorfreien Kapselbefunde kann dieser Parameter nicht als ein aussagekräftiger Beurteilungsmaßstab gewertet werden.

9.2.6. Häufigkeit eines LOH der informativen Fälle in Relation zum Schnitttrand

Bei der histologischen Untersuchung der 76 Präparate wurden bei 41 Resektaten tumorfreie Schnitttränder festgestellt, 32 Präparate zeigten einen nicht tumorfreien Schnitttrand. Ohne Angabe bezüglich des Schnitttrandes waren 3 Patienten.

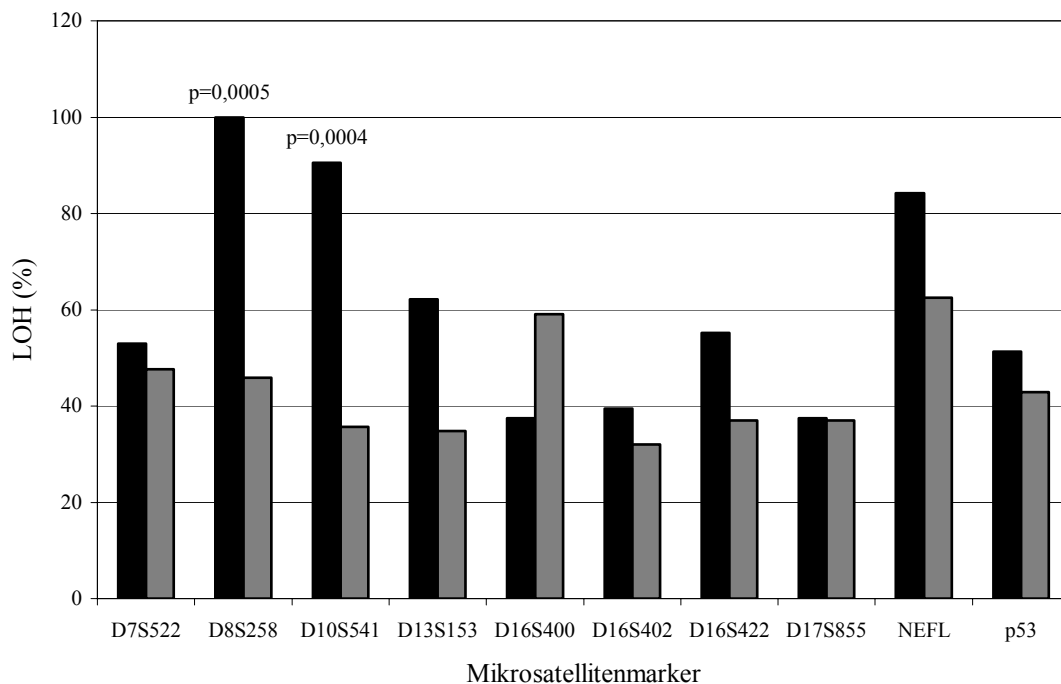


Abb.34: Prozentualer Anteil an LOH der Mikrosatellitenmarker in Relation zum Befund des Schnitttrandes. Gesamtverteilung: n = 76; n mit Schnitttrand tumorfrei = 41; n mit Schnitttrand nicht tumorfrei = 32; n ohne Schnitttrandbefunds-Angabe = 3 (■ = LOH bei Schnitttrand tumorfrei ; ■ = LOH bei Schnitttrand nicht tumorfrei)

Einen höheren Anteil an LOH in der Gruppe der Patienten mit tumorfreien Schnittträndern läßt sich für die Marker D8S258 (100% zu 46%), D10S541(90% zu 36%) und D13S153 (63% zu 35%) feststellen. Für die beiden zuerst genannten Marker sogar mit statistischer Signifikanz. Tendenziell ähnlich verhalten sich in dieser Gruppe die Marker D16S422 und NEFL. Ein Überwiegen des LOH-Anteils in der Gruppe der Patienten mit nicht tumorfreien Schnittträndern stellt sich allein für den Marker D16S400 dar. Die anderen Marker zeigen keine deutlichen Unterschiede.

9.2.7. Häufigkeit eines LOH der informativen Fälle in Relation zum Tumorvolumen

Die Bestimmung des Tumorvolumens in den Resektaten ergab im Kollektiv der 76 Patienten mit monofokalen Tumoren nach Bestimmung des Medians 6 ml für die Klasse Tumorvolumen < 6 ml 21 Patienten, für die Klasse Tumorvolumen ≥ 6 ml 45 Patienten. Für 10 Patienten lagen bezüglich des Tumorvolumens keine Angaben vor.

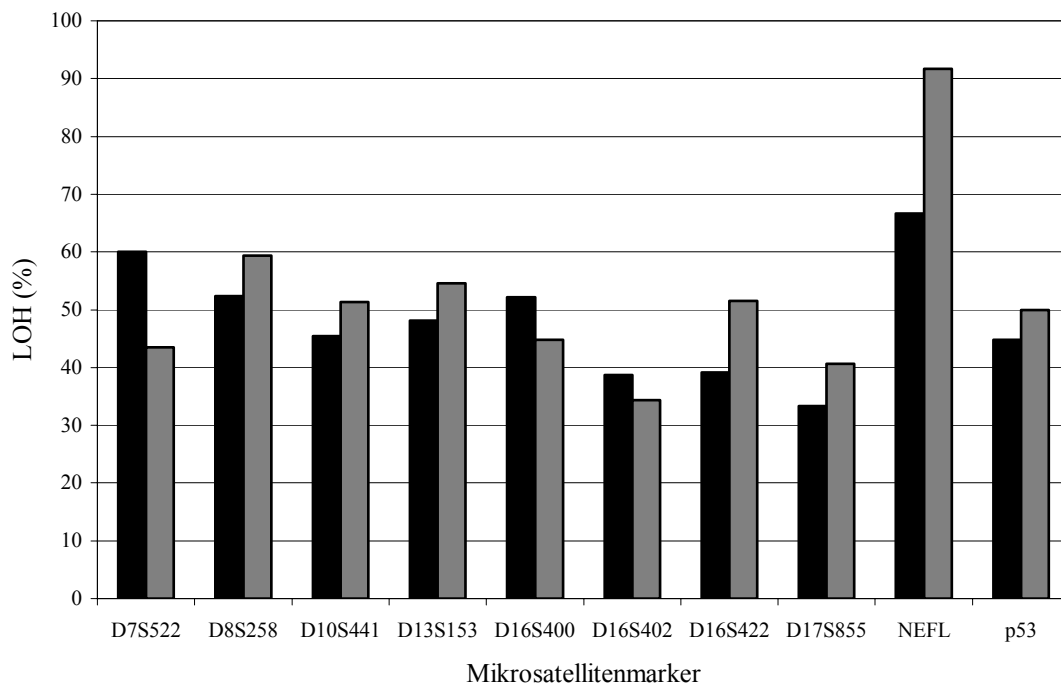


Abb.35: Prozentualer Anteil an LOH der Mikrosatellitenmarker in Relation zum Tumorvolumen. Gesamtverteilung: n = 76; Median: = 6 ml; n mit Tumorvolumen < 6 ml = 21; n mit Tumorvolumen ≥ 6ml = 45; n ohne Tumorvolumen-Angabe = 10 (■ = LOH bei Tumorvolumen < 6 ml; ▒ = LOH bei Tumorvolumen ≥ 6ml)

Für diesen Parameter ist mit Ausnahme von Marker NEFL, für den ein Überwiegen von LOH in der Klasse mit Tumorvolumen ≥ 6 ml beobachtet werden kann, ist für keinen Marker ein deutlicher Unterschied bezüglich der LOH-Häufigkeit zwischen den beiden Klassen festzustellen.

9.3. Allelische Imbalanz der Marker im Kollektiv der 16 Patienten mit multifokalen Tumoren in Korrelation zu klinischen und histopathologischen Parametern

9.3.1. Häufigkeit eines LOH der informativen Fälle in Relation zum Körpergewicht der Patienten

Der für das Körpergewicht der Patienten ermittelte Median von 83 kg teilte das Kollektiv der 16 Patienten mit multifokalen Tumoren in eine Klasse Gewicht < 83 kg mit 6 Patienten und in eine Klasse Gewicht ≥ 83 kg mit 5 Patienten. Für 5 Patienten lagen bezüglich des Körpergewichts keine Angaben vor.

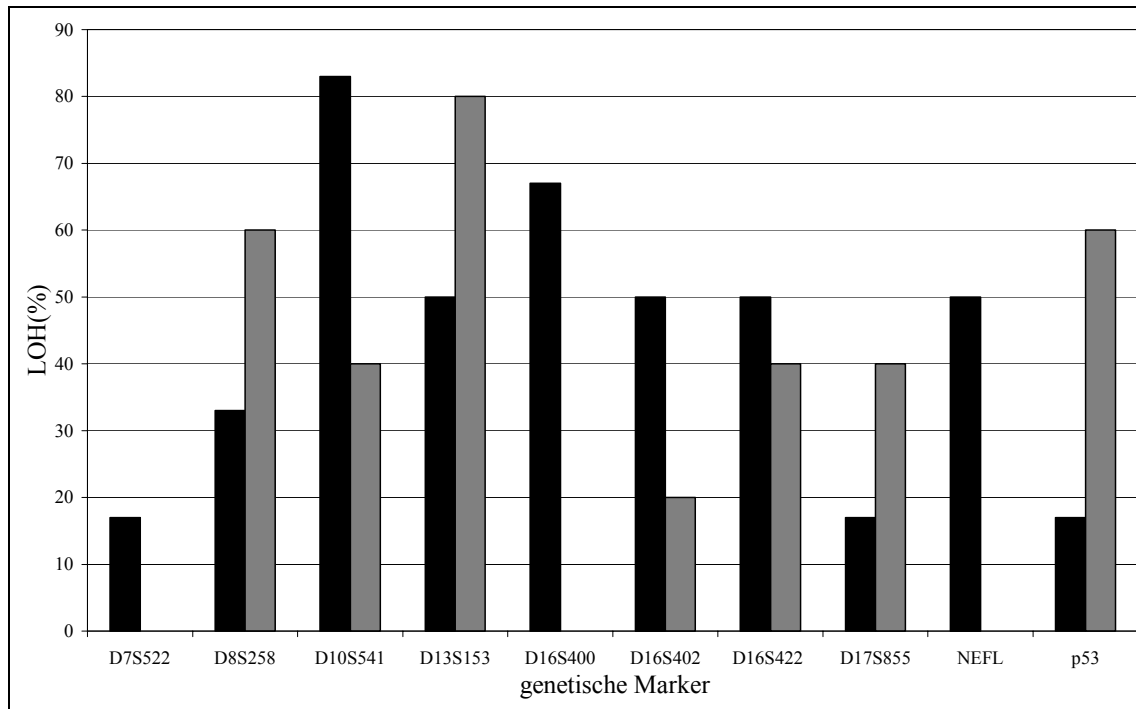


Abb.36: Prozentualer Anteil an LOH der genetischen Marker bezogen auf die beiden Klassen für das Körpergewicht. Gesamtverteilung; n = 16; Median = 83 kg; n mit Körpergewicht > 83 kg = 6; n mit Körpergewicht ≥ 83 kg = 5; n ohne Körpergewichtsangabe = 5 (■ = LOH bei Körpergewicht > 83 kg; ■ = LOH bei Körpergewicht ≥ 83 kg)

Während für die Marker D7S522, D10S451, 16S400, D16S402 und NEFL häufiger LOH in der Klasse der Patienten < 83 kg (bei 3 der genannten Markern findet sich in der Klasse der ≥ 83 kg schweren Patienten gar keinen LOH) zu beobachten war, verhalten sich die Marker D13S153 und p53 genau entgegengesetzt. Hier zeigt sich deutlich häufiger LOH in der Gruppe der schwereren Patienten (D13S153 mit 100%). Die gleiche Tendenz ist für Marker D8S258 und Marker D17S855 zu erkennen. Marker D16S422 zeigt keine wesentlichen Unterschiede zwischen den zwei Gewichtsklassen.

9.3.2. Häufigkeit eines LOH der informativen Fälle in Relation zum Nodalstatus

Der Klasse der nodalnegativen Patienten konnten aus dem Kollektiv der 16 Patienten mit multifokalen Tumoren 9 Patienten zugeordnet werden. Zwei Patienten waren nodalpositiv und für 5 Patienten lagen bezüglich des Lymphknotenstatus (LK) keine Angaben vor.

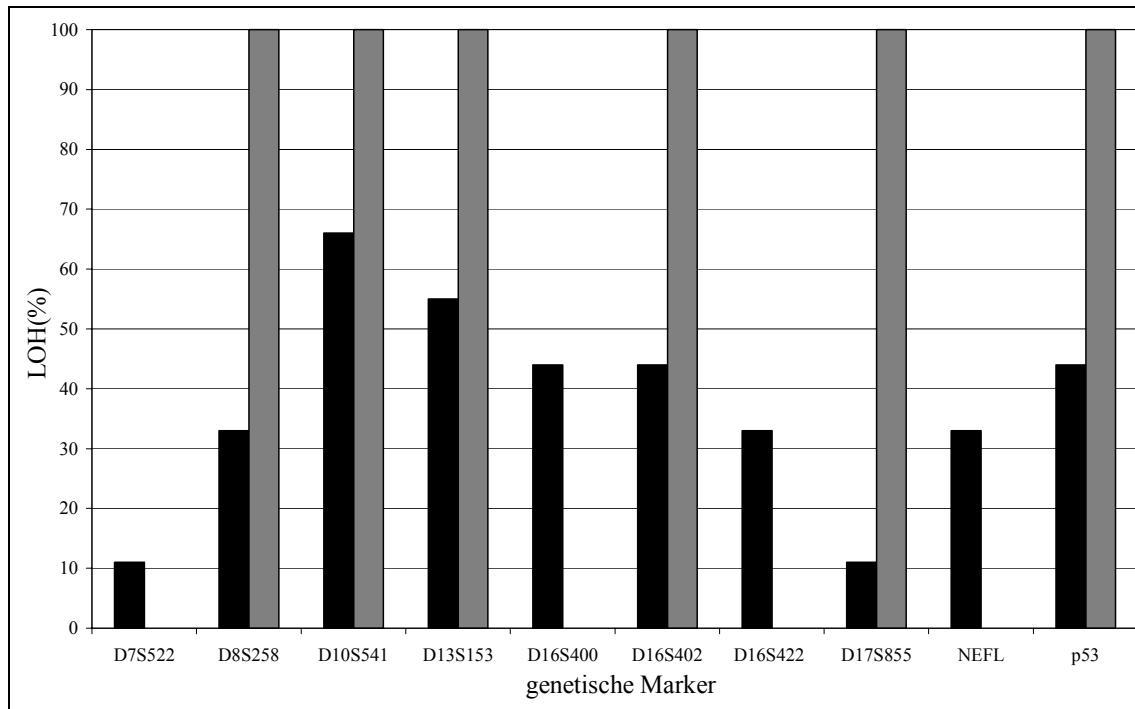


Abb.37: Prozentualer Anteil an LOH der untersuchten Marker bezogen auf die beiden Klassen für den Nodalstatus. Gesamtverteilung: n = 16; n mit LK negativ = 9; n mit LK positiv = 2; n ohne Nodalstatus-Angabe = 5 (■ = LOH bei LK negativ ■ = LOH bei LK positiv)

Obwohl die Klasse der nodalpositiven Patienten mit 2 Patienten nicht repräsentativ ist, zeigt sich, daß diese Patienten auf 6 von 10 Markern von LOH betroffen sind.

Lediglich bei den Markern, die keinen LOH aufweisen, findet sich daher häufiger LOH in der Gruppe der nodalnegativen Patienten. Trotzdem ist jedoch auch ein LOH von über 60% für Marker D10D541 in der Klasse der nodalnegativen Patienten ein auffälliges Ergebnis.

9.3.3. Häufigkeit eines LOH der informativen Fälle in Relation zum Prostatagewicht

Dem für das Gesamtkollektiv berechneten Median von 53 g Prostatagewicht folgend, zählten aus dem Kollektiv der 15 multifokalen Patienten zu der Klasse Prostatagewicht < 53 g 9 Patienten, 4 Patienten konnten der Klasse Prostatagewicht \geq 53 g zugeordnet werden. Für 3 Patienten lag bezüglich des Prostatagewichtes keine Angabe vor.

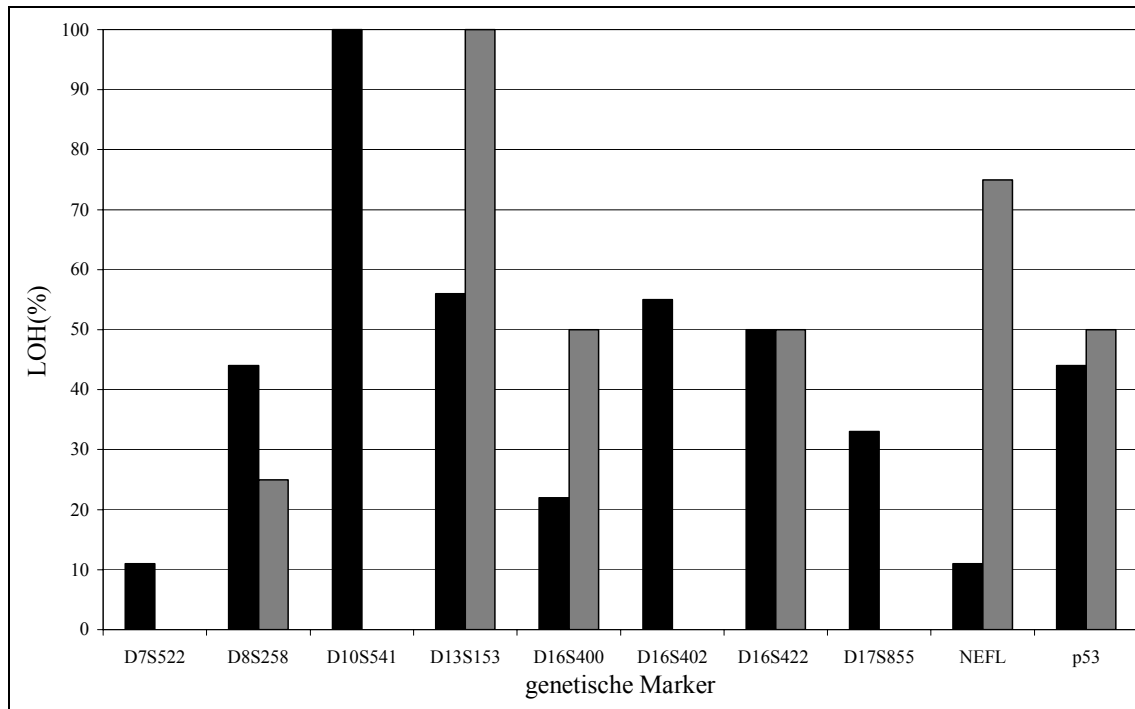


Abb.38: Prozentualer Anteil an LOH der genetischen Marker bezogen auf beiden Klassen für das Prostatagewicht. Gesamtverteilung: n = 16; Median = 53g; n mit Prostatagewicht < 53g = 9; n mit Prostatagewicht ≥ 53 g: 4; n ohne Prostatagewichts-Angabe = 3 (■ = LOH bei ; Prostatagewicht < 53g ■ = LOH bei Prostatagewicht ≥ 53 g)

Marker D10S541 und Marker D16S402 zeigen mit 100 % bzw. über 50 % einen hohen LOH-Anteil in der Klasse der Patienten mit dem kleineren Prostatagewicht. Zudem ist in der ihnen gegenübergestellten Gewichtsklasse für diese Marker kein LOH festzustellen. Auch Marker D17S855 zeigt die gleiche Tendenz. Marker D13S153 bietet mit einem 100%-igen LOH-Anteil in der Klasse der Patienten mit dem höheren Prostatagewicht ein genau entgegengesetztes Bild. Auch Marker NEFL zeigt deutlich häufiger einen LOH in der Klasse Prostatagewicht ≥ 53 g, Marker D16S400 zeigt, zumindest tendenziell, die gleiche Unterscheidung. Für die übrigen Marker stellen sich keine wesentlichen Unterschiede dar.

9.3.4. Häufigkeit eines LOH der informativen Fälle in Relation zum Prostatavolumen

Auch für das Prostatavolumen wurde gemäß dem für das Gesamtkollektiv ermittelten Median von 34 ml eine Aufteilung des Kollektivs mit multifokalen Tumoren vorgenommen. Der Klasse Prostatavolumen < 34 ml konnten 10 Patienten zugeordnet werden, der Klasse Prostatavolumen ≥ 34 ml 6 Patienten.

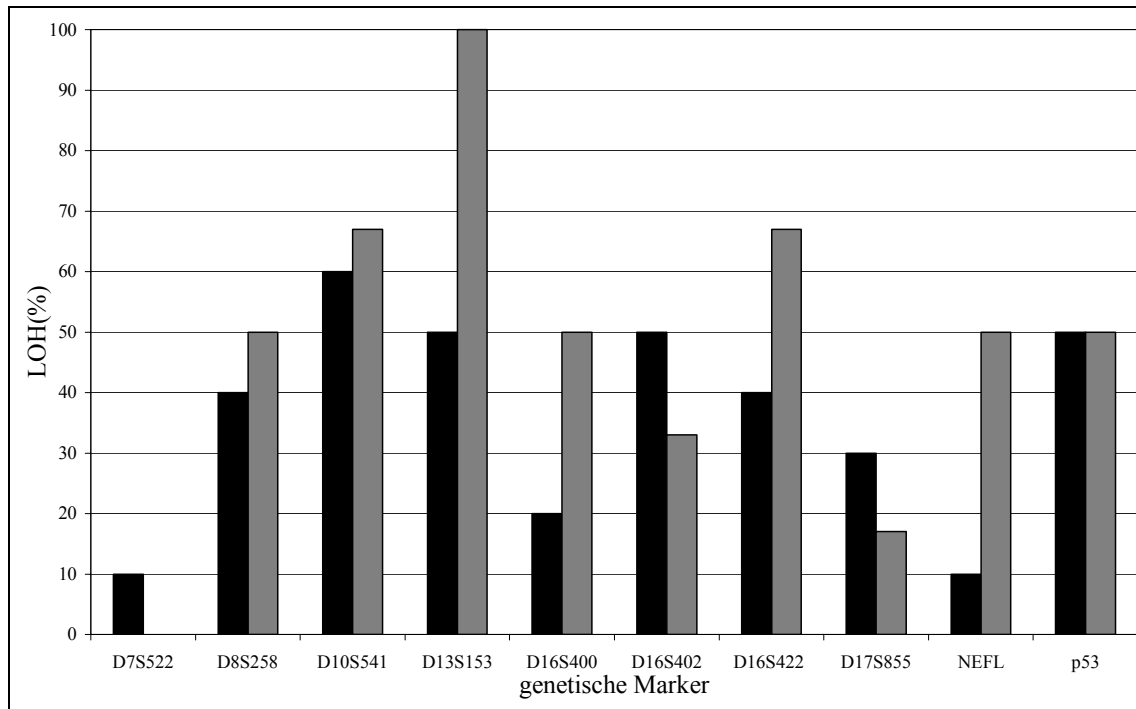


Abb.39 Prozentualer Anteil an LOH der genetischen Marker bezogen auf beide Klassen für das Prostata-Volumen. Gesamtverteilung: n = 16; Median = 34 ml; n mit Prostata-Volumen < 34 ml: 10, n mit Prostata-Volumen ≥ 34 ml = 6; n ohne Prostata-Volumen-Angabe = 0 (■ = LOH bei Prostata-Volumen < 34 ml; ■ = LOH bei Prostata-Volumen ≥ 34 ml)

In der Klasse der Volumina ≥ 34 ml stellt sich Marker D13S153 mit 100 % LOH dar. Auch die Marker D16S400, D16S422 und NEFL zeigten häufiger LOH bei den Patienten mit den größeren Prostata-Volumina. Die Marker D16S402 und D17S855 zeigen eine Tendenz zur Klasse der Patienten mit Prostata-Volumina < 34 ml. Marker D7S522 zeigt in der Klasse der Patienten mit kleinen Prostata-Volumina einen LOH-Anteil von 10 %, in der Klasse der Volumina ≥ 34 ml findet sich für Marker kein LOH. Die übrigen 4 Marker zeigen keine deutlichen Unterschiede.

9.3.5. Häufigkeit eines LOH der informativen Fälle in Relation zum Befund der Prostatakapsel

Für die Verteilung in die Klasse Prostatakapsel frei konnte aus dem Kollektiv der 16 Patienten 1 Patient ermittelt werden. Bei 15 Patienten war die Prostatakapsel durch den Tumor infiltriert oder penetriert. Sie bildeten zum Vergleich des prozentualen LOH-Anteils in diesem Kollektiv die zweite Klasse.

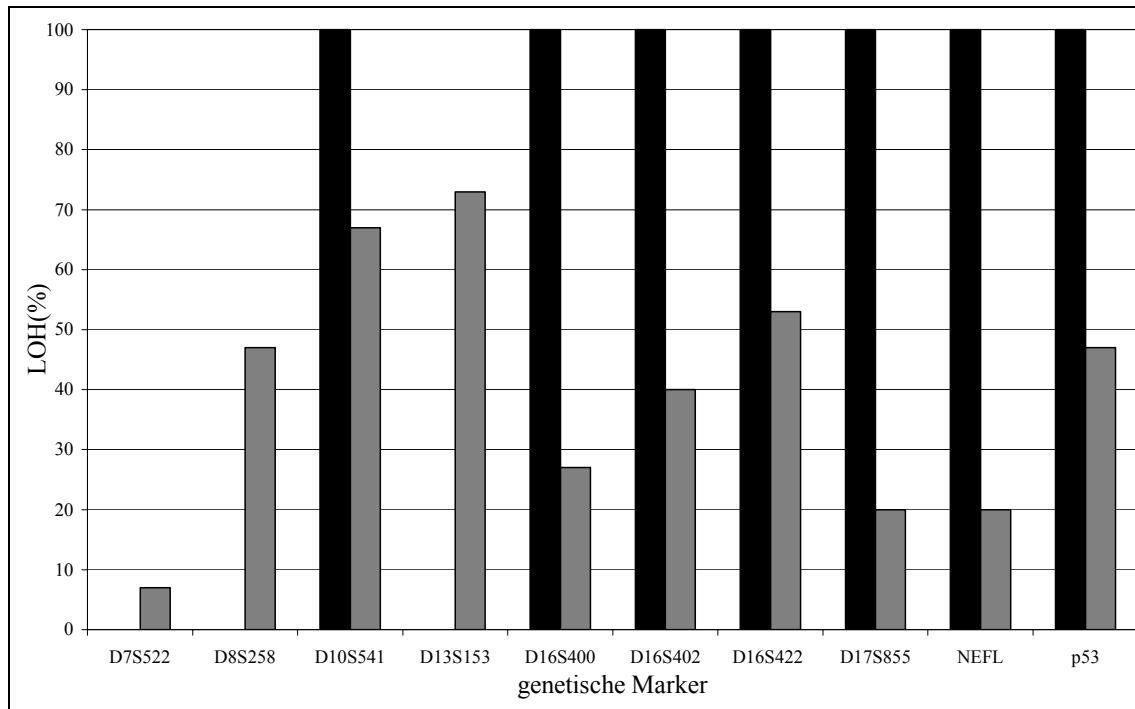


Abb.40 Prozentualer Anteil an LOH der genetischen Marker bezogen auf beide Klassen für den Kapselbefund. Gesamtverteilung: n = 16; n mit Kapsel tumorfrei = 1; n mit Kapsel infiltriert oder penetriert = 15; n ohne Kapselbefund-Angabe = 0 (■ = LOH bei Kapsel tumorfrei; ■ = LOH bei Kapsel infiltriert oder penetriert)

Der Patient mit dem Befund tumorfreie Prostatkapsel zeigt bei 7 Markern LOH. Einzig für Marker D13S153 läßt sich, bei Fehlen eines LOH in der Klasse der Patienten mit tumorfreier Kapsel, ein starker LOH-Anteil mit knapp 80 % in der Gruppe der Patienten mit infiltrierter oder penetrierter Kapsel feststellen. Die gleiche Tendenz kann für die Marker D7S522 und D8S258 beobachtet werden. Auch die anderen Marker zeigen prozentual gesehen häufiger einen LOH in der Gruppe der Patienten mit tumorös durchsetzter Kapsel.

9.3.6. Häufigkeit eines LOH der informativen Fälle in Relation zum Schnitttrand

Die Einteilung in die Klassen bezüglich des Schnitttrandes folgte der, die schon für das Kollektiv der 76 Patienten vorgenommen wurde. Nach histologischer Begutachtung des Schnitttrandes des Resektates wurden 10 Patienten der Klasse Schnitttrand tumorfrei und der Klasse Schnitttrand nicht tumorfrei 6 Patienten zugeordnet.

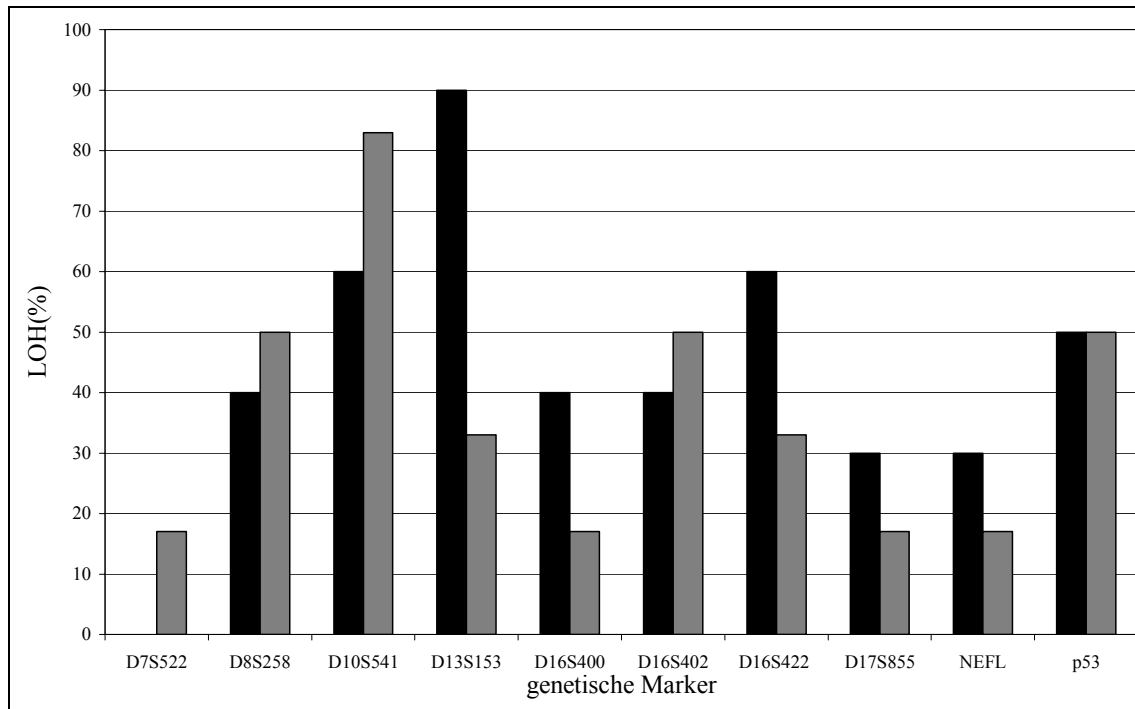


Abb.41 Prozentualer Anteil an LOH der genetischen Marker bezogen auf beide Klassen für den Befund des Schnitttrandes. Gesamtverteilung: n = 16; n mit Schnitttrand tumorfrei = 10; n mit Schnitttrand nicht tumorfrei = 6; n ohne Schnitttrandbefunds-Angabe = 0 (■ = LOH bei Schnitttrand tumorfrei ; ■ = LOH bei Schnitttrand nicht tumorfrei)

Deutlich häufiger stellt sich ein LOH in der Gruppe der Patienten mit freiem Schnitttrand für Marker D13S153 und Marker D16S422 dar. Der gleichen Tendenz folgen Marker D16S400 und Marker NEFL. Einen Trend in der umgekehrten Richtung, mit häufigerem LOH in der Gruppe der Patienten mit nicht tumorfreiem Schnitttrand, zeigen die Marker D10S541 und D7S522. Beim zuletzt genannten Marker stellt sich die Gruppe der Patienten mit nicht tumorfreiem Schnitttrand ohne einen LOH dar. Die Marker D8S258, D16S402 und p53 zeigen keine bzw. geringe Unterschiede bezüglich des LOH zwischen den beiden Patientengruppen.

9.3.7. Häufigkeit eines LOH der informativen Fälle in Relation zum Tumorvolumen

Die histologische Bestimmung des Tumorvolumens ergab im Kollektiv der 16 Patienten mit multifokalen Tumoren nach Festlegung des Median bei 6 ml die Einordnung von 8 Patienten in die Klasse Tumorvolumen < 6ml, die übrigen 8 Patienten konnten der Klasse Tumorvolumen \geq 6 ml zugeordnet werden.

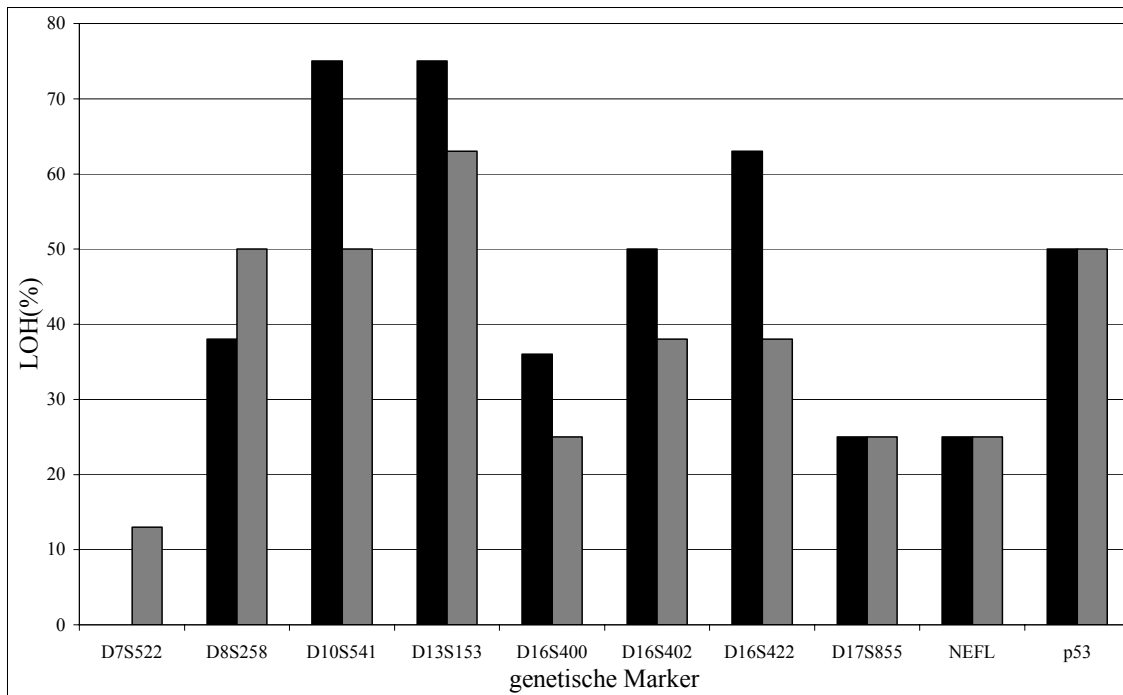


Abb.42 Prozentualer Anteil an LOH der genetischen Marker bezogen auf die beiden Klassen für das Tumorzellen. Gesamtverteilung: n = 16; Median: = 6 ml; n mit Tumorzellen < 6 ml = 8; n mit Tumorzellen ≥ 6ml = 8; n ohne Tumorzellen-Angabe = 10 (■ = LOH bei Tumorzellen < 6 ml; ■ = LOH bei Tumorzellen ≥ 6ml)

In der Klasse Tumorzellen < 6ml zeigen die Marker D10S541 und D16S422 mit mehr als 25% deutlich häufiger einen LOH. Die gleiche Tendenz ist für die Marker D13S153, D16S400 und D16S402 zu beobachten. Der Marker D8S258 und auch der Marker D7S522, bei dem jedoch in der Klasse Tumorzellen < 6ml keinen LOH festgestellt werden kann, zeigen als einzige häufiger einen LOH in der Klasse Tumorzellen ≥ 6ml. Alle anderen Marker zeigen keine Unterschiede in der LOH-Häufigkeit.