

Molekulargenetische Charakterisierung von disseminierten Tumorzellen und Karzinomen

Dissertation

Zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

vorgelegt der

Naturwissenschaftlichen Fakultät I
der Martin – Luther – Universität Halle-Wittenberg

von

Dipl.-Biochem. Karen Blümke
Geboren am 05.08.1978 in Halle/Saale

Gutachter: 1. PD Dr. H. Taubert
2. PD Dr. E. Schwarz
3. Prof. Dr. W. A. Schulz

Abgabe der Arbeit: 28.08.2007

Verteidigung: 10.01.2008

urn:nbn:de:gbv:3-000013086

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=nbn%3Ade%3Agbv%3A3-000013086>]

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungen	VI
1. Einleitung	1
1.1. Tumorbilogie	1
1.1.1. Allgemeine Einführung	1
1.1.2. Metastasierung	2
1.1.3. Disseminierte Tumorzellen	4
1.2. Genetische und epigenetische Veränderungen	6
1.2.1. Mikrosatelliteninstabilität und Verlust der Heterozygotie	8
1.1.1. Methylierung	9
1.3. Das Mammakarzinom	10
1.3.1. Risikofaktoren und genetische Faktoren	10
1.3.2. Tumorverhalten	11
1.3.3. Therapiemöglichkeiten	12
1.4. Das Nierenzellkarzinom	13
1.4.1. Tumorverhalten und genetische Faktoren	13
1.4.2. Therapiemöglichkeiten	14
1.5. Das Prostatakarzinom	15
1.5.1. Risikofaktoren	15
1.5.2. Therapiemöglichkeiten	16
1.6. Aufgabenstellung	18
2. Material	19
2.1. Tumormaterial und Patientengut	19
2.1. Chemikalien und Reagenzien	20
2.2. Enzyme	21
2.3. „Kits“	21
2.4. Geräte und Verbrauchsmaterialien	22
2.5. Puffer und Lösungen	23
3. Methoden	24
3.1. Zellzucht	24
3.2. DNA-Präparationen	24
3.2.1. DNA-Isolation aus Zellkulturen	24
3.2.2. DNA-Isolation aus Gefriermaterial	25
3.2.3. DNA-Isolation aus Paraffinmaterial	26

3.2.4.	Quantifizierung der DNA mittels Photometrie	27
3.3.	MACS – Methodenprotokoll zum Nachweis disseminierter Tumorzellen in peripherem Blut	27
3.3.1.	MACS-Separation	28
3.3.2.	Immunhistochemische Färbung	29
3.4.	Isolation und Amplifizierung der DNA der disseminierten Tumorzellen	30
3.4.1.	DNA-Isolation aus wenigen Zellen	30
3.4.2.	I-PEP – PCR	30
3.5.	LOH- und Mikrosatellitenanalysen	31
3.5.1.	PCR-Reaktion	31
3.5.2.	Agarose-Gelelektrophorese	33
3.5.3.	Polyacrylamid-Gelelektrophorese	33
3.5.4.	Silberfärbung	34
3.6.	Methylierungsanalysen	34
3.6.1.	<i>in vitro</i> -DNA-Methylierung	35
3.6.2.	Bisulphit-Behandlung der DNA	36
3.6.3.	Methylierungsspezifische PCR (MSP)	36
3.7.	Protein-Präparationen	38
3.7.1.	Protein-Isolation aus Gefriergewebe	38
3.7.2.	ELISA für uPAR, uPA, PAI-1 und Survivin	38
3.8.	HLA-Typisierung	39
3.9.	Statistische Auswertungen	40
4.	Ergebnisse	41
4.1.	Charakterisierung der disseminierten Tumorzellen	41
4.2.	Das Mammakarzinom	43
4.2.1.	Analyse der Blutproben	43
4.2.2.	Molekulargenetische DNA-Analysen	48
4.2.2.1.	MSI- und LOH-Analysen	48
4.2.2.2.	Methylierungsanalysen	49
4.2.2.3.	Der SNP309-Polymorphismus	50
4.2.3.	Protein-Analysen	51
4.2.3.1.	Bestimmung von uPAR, uPA und PAI-1 beim Mammakarzinom	51
4.2.3.2.	Das „Cancer Antigen“ CA 15-3	52
4.2.4.	Überlebensanalysen	53
4.2.5.	Benigne Brusterkrankungen	56
4.3.	Das Nierenzellkarzinom	58

4.3.1.	Analyse der Blutproben	58
4.3.2.	Molekulargenetische DNA-Analysen	62
4.3.2.1.	MSI- und LOH-Analysen	62
4.3.2.2.	Methylierungsanalysen	64
4.3.2.3.	Der SNP309-Polymorphismus	65
4.3.3.	Protein-Analysen	66
4.3.4.	HLA-Typisierung	68
4.3.4.1.	Das HLA-System	68
4.3.4.2.	Ergebnisse der HLA-Typisierung beim Nierenzellkarzinom	70
4.4.	Das Prostatakarzinom	72
4.4.1.	Analyse der Blutproben	72
4.5.	Zusammenfassung der wichtigsten Ergebnisse	74
5.	Diskussion	76
5.1.	Charakterisierung der disseminierten Tumorzellen	77
5.2.	Die Detektion disseminierter Tumorzellen im peripheren Blut der Karzinompatienten	78
5.2.1.	Analyse der Blutproben bei den Mammakarzinom-Patientinnen	78
5.2.1.1.	Aufteten und Anreicherung von disseminierten Tumorzellen	78
5.2.1.2.	Nachweis disseminierter Tumorzellen – Beziehung zur Prognose	80
5.2.1.3.	Nachweis disseminierter Tumorzellen – Beziehung zum Tumorgrad und Tumorstadium	81
5.2.1.4.	Nachweis disseminierter Tumorzellen – Beziehung zur TumorgroÙe und Lymphknotenbefall	82
5.2.2.	Analyse der Blutproben bei Patientinnen mit benignen Brusterkrankungen	83
5.2.3.	Analyse der Blutproben bei den Nierenzellkarzinom-Patienten	84
5.2.3.1.	Nachweis disseminierter Tumorzellen – Beziehung zu klinischen Parametern	84
5.2.4.	Analyse der Blutproben bei den Prostatakarzinom-Patienten	85
5.2.5.	Zusammenfassung der DTZ-Detektion in den Blutproben der Karzinompatienten	86
5.3.	Molekulargenetische DNA-Analysen	86
5.3.1.	MSI- und LOH-Analysen	86
5.3.1.1.	MSI- und LOH-Analysen beim Mammakarzinom	87
5.3.1.2.	MSI- und LOH-Analysen beim Nierenzellkarzinom	89
5.3.2.	Methylierungsanalysen	92

5.3.2.1.	RASSF1A-Promotormethylierung	92
5.3.2.2.	p16-Methylierung	94
5.3.2.3.	rar- β -Methylierung	95
5.3.2.4.	FHIT-Methylierung	96
5.3.3.	Der SNP309-Polymorphismus	97
5.4.	Protein-Analysen	99
5.4.1.	uPA, uPAR, PAI-1 und Survivin	99
5.4.2.	Das „Cancer Antigen“ beim Mammakarzinom	102
5.5.	HLA-Typisierung	103
5.6.	Ausblick	106
6.	Zusammenfassung	108
7.	Literaturverzeichnis	111
8.	Anhang	126

Abkürzungen

Abb.	Abbildung
ADH	atypische Hyperplasie
AK	Antikörper
APAAP	Alkalische Phosphatase – Antialkalische Phosphatase
APS	Ammoniumpersulfat
bidest.	bidestilliert
Bl+	große blaue Zellen (tumorzellverdächtige Morphologie)
BP	Blutprobe(n)
bp	Basenpaar(e)
BSA	Rinderserumalbumin („bovines serum albumin“)
β_2 -MG	β_2 -Mikroglobulin
CK	Zytokeratin
CK+	Zytokeratin-positive Zellen
CK-	Präparate die keine Tumorzellen aufweisen
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindoldihydrochlorid
DCIS	duktales Carcinoma in situ
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure („desoxyribonucleic acid“)
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat(e)
DTT	Dithiothreitol
DTZ	Disseminierte Tumorzellen
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EMMPRIN	extrazellulärer Matrix-Metalloproteinase-Inducer
FHIT	„fragile histidine triad“
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
FKS	fetales Kälberserum
5-FU	5-Fluoruracil
h	Stunde(n)
HLA	„human leukocyte antigen“
IL	Interleukin
I-PEP	„improved-primer extension preamplification“
Kap.	Kapitel
kb	Kilobase(n)
LHRH	Lutenisierendes Hormon Releasing Hormon
LKM	Lymphknotenmetastasen
LOH	„Loss of heterozygosity“
MACS	„magnetic activated cell sorting“
MHC	„major histocompatibility complex“
min	Minute(n)
ml	Milliliter

MLCT	Mikrolymphozytotoxizitätstest
µm	Mikrometer
MMK	Mammakarzinom(e)
mm	Millimeter
mRNA	Boten – Ribonukleinsäure („messenger ribonucleic acid“)
MSI	Mikrosatelliteninstabilität
n	Anzahl der untersuchten Patienten
Na – citrat	Natriumcitrat
nm	Nanometer
NZK	Nierenzellkarzinom(e)
OD	optische Dichte
OFA	„One-Phor-All Buffer Plus“
OP	Operation
PAA	Polyacrylamid
PAI -1/2	„plasminogen activator – inhibitor“ 1/2
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung („phosphate buffered saline“)
PCA	Prostatakarzinom(e)
PCR	Polymerasekettenreaktion („polymerase chain reaction“)
PE	Polyethylen
PK	Proteinase K
PSA	Prostata-spezifisches Antigen
Rar – β	Retinsäure Rezeptor – β („retinoic acid receptor – β“)
RASSF1A	„ras association domain family 1A“
RNase	Ribonuklease
RT – PCR	reverse Transkriptase Polymerasekettenreaktion
SAM	S-Adenosylmethionin
SDS	Natriumdodecylsulfat
SSP	sequenz-spezifische Primer
TBE	Tris / Borsäure / EDTA
TdT	terminale Deoxynucleotidyl Transferase
TEMED	N, N, N, N, - Tetramethyldiamin
TGF-β	„transforming growth factor“ – β
Tris	Tris (hydroxymethyl) aminomethan
TSG	Tumorsuppressorgen(e)
U/min	Umdrehungen pro Minute
uPAR	„urokinase-type plasminogen activator – receptor“
uPA	„urokinase-type plasminogen activator“
VHL	von Hippel-Lindau

1. Einleitung

1.1. Tumorbiologie

1.1.1. Allgemeine Einführung

Das wesentliche Kriterium maligner Tumoren besteht in einem graduellen und irreversiblen Entgleiten somatischer Zellen aus dem komplexen Regelmechanismus ihres normalen Wachstums. Der Prozess der Tumorentstehung (Tumorinduktion) besteht aus zwei Phasen: der Initiation und der Promotion/Progression. Die Initiation umfasst die Umwandlung einer normalen in eine neoplastische Zelle. Während der Phase der Promotion und Progression entstehen Tumorzellklone und der manifeste Tumor aus der neoplastisch transformierten Zelle. Das Zeitintervall zwischen der Transformation einer Zelle in eine potentielle Tumorzelle und der Manifestation des Tumors kann mehrere Jahre dauern und wird als Latenzphase bezeichnet. Die zeitliche Länge der Phase ist von der Dosis und der Wirkdauer eines oder mehrere Karzinogene, sowie dem Effekt von wirksamen Promotoren abhängig. Promotoren beschleunigen die Tumorrealisation nach dem Abschluß der neoplastischen Transformation. Die Latenzphase endet mit der Manifestation des Tumors im Sinne einer klinischen Fassbarkeit. Das Auswachsen klinisch detektierbarer Läsionen ist mit einer Verschiebung der Balance zwischen Proliferation und Zelltod (Apoptose) verbunden.

Die Erscheinungsform der individuellen Tumorzelle wie auch eines soliden Zellverbandes (Tumorgewebe) kann sich in unterschiedlichem Ausmaß von den morphologischen Charakteristika des Muttergewebes unterscheiden (Entdifferenzierung). Die Einteilung des Ausmaßes der histologischen Differenzierung wird als Grading bezeichnet und in vier Graden (G1 bis G4) ausgedrückt (Blümcke 1995).

- G1 = gut differenziert
- G2 = mäßig differenziert
- G3 = wenig differenziert
- G4 = undifferenziert

Dies dient in Ergänzung zur histologischen Typisierung und TNM-Klassifikation der genaueren Charakterisierung des Tumors.

Neoplastische Erkrankungen entstehen durch kontinuierliche Selbstreplikation von genetisch oder epigenetisch veränderten Zellen, die meist genetisch instabil sind und einen Selektionsvorteil haben. Mit jedem Replikationszyklus werden neue modifizierte Deszendenten produziert. Die Akkumulation genetischer Veränderungen in den Tochterzellen erhöht den Umfang genetischer Instabilität. Während des Prozesses der Tumorentstehung koexistieren verschiedene Zellarten mit unterschiedlichen Phänotypen. Diese heterogenen Zelltypen verbinden essentielle Eigenschaften, wie die Expression von Angiogenese- oder immunsuppressiven Faktoren, von Onkogenen, die Unterdrückung der

Expression von Tumorsuppressorgenen und die Produktion proteolytischer Enzyme (notwendig für invasives Zellwachstum). Bei diesen Bedingungen sind die einzelnen Zelltypen voneinander abhängig. Sind alle Eigenschaften für lokales oder metastatisch neoplastisches Wachstum in einer Zelle vorhanden, so ist sie von benachbarten Zellklonen unabhängig. Tumoren mit einem hohen Grad an genetischer Instabilität sind in der Lage, mehr Zellvarianten in einer bestimmten Zeit zu produzieren. Dies ergibt ein größeres Reservoir neuer, besser angepasster Versionen, was zu einer schlechten Prognose von genetisch destabilisierten Krebsarten führt. Hintergründe dieser genetischen Veränderungen sind zufällige genetische Ereignisse in einem chaotischen System, sowie Selektion bestimmter Zelltypen durch das vorherrschende Tumor-Mikromillieu (von Knebel Doeberitz und Lacroix 1999, Ngugen und Massague 2007).

1.1.2. Metastasierung

Der Primärtumor führt nur bei einigen Karzinomen und relativ selten zum Tod der Tumorpatienten. Häufig sind Fernmetastasen für den progressiven Verlauf einer Tumorerkrankung verantwortlich. Ursache für die Entstehung von Fernmetastasen von soliden malignen Tumoren ist eine Disseminierung von Tumoreinzellen, die bereits prä- oder perioperativ erfolgen kann (Pantel et al. 1997). Die potentielle Fähigkeit zur Bildung von Metastasen ist eine Fähigkeit, die alle malignen Tumoren per Definition besitzen, auch wenn sie im Einzelfall in unterschiedlichem Ausmaß realisiert wird (Rath et al. 2002). Der Prozess der Metastasierung lässt sich in vier Stadien gliedern (Blümcke 1995):

- I. Invasionsphase: Die Zellen des Primärtumors verschaffen sich Zugang zu einem Gefäß. Das Wirtsgewebe wird mittels lytischer Enzyme zerstört. Von den Tumorzellen müssen Basalmembranstrukturen und Endothelzellen überwunden werden.
- II. Embolisationsphase: Intravasale Tumorzellen werden über die Gefäßbahn in andere Organe transportiert, embolisiert. Dabei überleben in der Regel nur wenige der Tumorzellen, die in die Gefäßbahn gelangen. Diese sind zur Entwicklung von Metastasen fähig. Im Rahmen der Interaktion von Tumorzellen mit Blutsustanzen werden Tumorzellen von Thrombozyten und Fibrin eingeschlossen. Hieraus kann gewissermaßen ein Schutz der Tumorzellen gegen lytische Enzyme des Blutes abgeleitet werden.
- III. Tumorimplantation: Die Tumorimplantation wird durch die Adhäsion von Tumorzellen im Bereich der Gefäßendothelien eingeleitet.
- IV. Gefäßpenetration: Voraussetzung für die Entwicklung einer Tumormetastase ist die Durchdringung von Endothel, Basalmembranstrukturen und äußeren Gefäßwandschichten.

Das Angehen und die Entwicklung von Metastasen sind abhängig von der Ausbildung neuer Blutgefäße (Neoangiogenese) und der allgemeinen Stoffwechselsituation im jeweiligen Organ.

In Abhängigkeit vom Sitz des Primärtumors lassen sich bedingt wiederkehrende, aber nicht gesetzmäßige Metastasierungswege bösartiger Tumoren unterscheiden (Abb. 1-1). Bei der lymphogenen Metastasierung (über die Lymphbahnen) stehen die toporegionalen Lymphknoten im Vordergrund. So sind zum Beispiel bei einem Mammakarzinom die Achsellymphknoten die erste Metastasierungsstation. Die hämatogene Metastasierung erfolgt über die Blutgefäße. Seltener ist die direkte Tumorausbreitung auf Nachbarorgane oder die intrakanalikuläre Verschleppung (in anatomisch vorgegebenen Räumen oder Gangsystemen) von Tumorzellen.

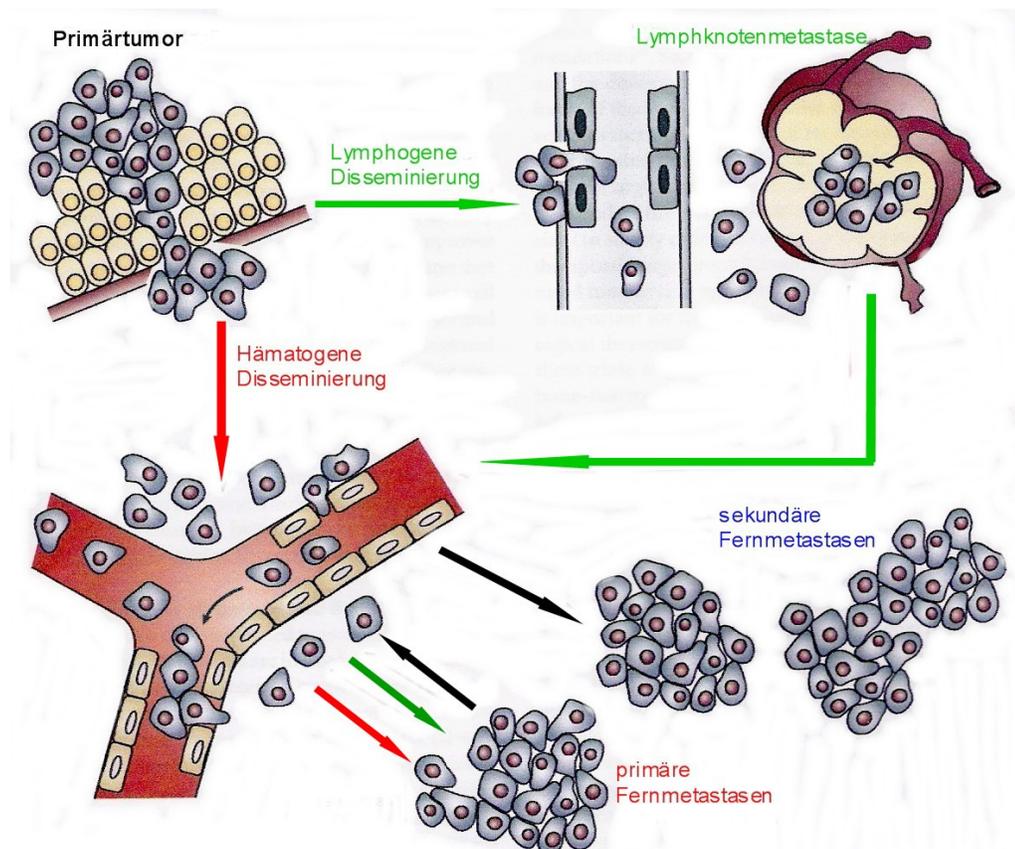


Abb. 1 – 1 Modelle der Metastasierungskaskade solider Tumoren (modifiziert nach Pantel et al. 2004). Krebszellen können sich über lymphogene Wege (grüne Pfeile) oder hämatogene Wege (rote Pfeile) vom Ursprungsort entfernen. Sekundäre hämatogene Disseminierung kann auch von Metastasen zu anderen entfernten Orten vorkommen (schwarze Pfeile). Im ersten Modell proliferieren disseminierte Tumorzellen in die Lymphknoten, um dort solide Metastasen zu bilden, während die Tumorzellen in entfernten Regionen sterben oder in einer Ruhephase verharren. In späteren Etappen disseminieren Tumorzellen aus den etablierten Lymphknotenmetastasen (LKM) in entferntere Bereiche, wo sie sekundäre Metastasen bilden. Eine hämatogene Disseminierung erfolgt ausgehend vom Primärtumor, von LKM oder Fernmetastasen. Im zweiten Modell erfolgt die hämatogene Disseminierung primär, um Fernmetastasen zu bilden. Dies passiert in Patienten, die Metastasen in anderen Organen entwickeln, wo die Lymphknoten aber tumorfrei bleiben (z.B. Brustkrebspatienten).

1.1.3 Disseminierte Tumorzellen

Die Disseminierung von Tumorzellen ist ein weitverbreitetes und relativ frühes Phänomen in der Tumorentwicklung. Es ist dabei nicht äquivalent zur Metastasierung. Nach der Invasion der Tumorzellen in die Blutbahn können sie im Blut disseminieren (Phase der Disseminierung). Während dieser Phase können isolierte Tumorzellen oder manchmal auch kleine Zellcluster im Blut gefunden werden. Tumor(einzel)zellen können als Vorstufen einer Mikrometastasierung angesehen werden. Die überwiegende Anzahl disseminierter Tumorzellen (DTZ) befindet sich im mitotisch nicht aktiven Zustand (G₀-Phase). Dies stellt eine Ursache für das Versagen adjuvanter Chemotherapien dar, da die meisten verwendeten chemischen Mittel nur auf sich teilende Zellen eine Wirkung erzielen. Es ist bisher unklar, welche Faktoren die zum Teil ausgeprägte Latenzzeit der Tumorzellen (Tumorzell dormanz) bestimmen. Während dieser Zeit scheinen die Zellen vom Zeitpunkt der Disseminierung bis zum Auftreten klinisch manifester Metastasen zu verharren (Pantel et al. 1997). Holmgren und Mitarbeiter (1995) haben einen Hinweis für die Existenz mikrometastatischer Vorstufen erbracht, in welchen die Zellen sich aktiv teilen, aber die Teilungsrate in Balance zur Apoptose steht. Ein Ausbilden von Gefäßen in den Mikrometastasen wird dadurch verhindert. Erreichen aber diese kleinen Metastasen die Fähigkeit Gefäße zu bilden, könnte die Phase der Latenz überwunden werden, und ein erneutes Tumorwachstum beginnt.

Die Komplexität der Metastasenbildung, vor allem die Implantationsphase erklärt, warum weniger als 0,01% der DTZ überleben und Metastasen bilden können. In einem Mausmodell von Mayhem und Graves (Übersicht bei Hardingham et al. 1995) waren 1000 Zellen notwendig, um eine pulmonale Metastase eines aggressiven Lewis-Lungenkarzinoms zu bilden.

Mittels *In vivo*-Videomikroskopie und quantitativer Zellüberlebensanalysen konnte gezeigt werden, dass sowohl die Lunge als auch die Leber sehr effizient die Passage von Tumorzellen unterdrücken, und dass die Mehrzahl der zirkulierenden Tumorzellen, bedingt durch ihre Größe, zurückgehalten werden (Chambers et al. 2001). Die Kapillaren sind mit 3 – 8 µm im Durchmesser für die Passage der Erythrozyten (7 µm Durchmesser, formbar) angepasst. Viele Tumorzellen dagegen sind mit 20 µm oder mehr im Durchmesser zu groß, um diese Kapillaren zu passieren. Der tatsächliche Anteil zurück gehaltener Tumorzellen wird durch physikalische Faktoren bestimmt. Dies können z.B. relative Größe der Zellen und Kapillaren, der Blutdruck in den Organen und die Verformbarkeit der Zelle sein. Der Hauptteil der Tumorzellen, die die Blutbahn erreichen, wird schnell von natürlichen Killerzellen und Makrophagen eliminiert. Auch die Sezernierung reaktiver Stickstoffoxid-Radikale (NO•) durch aktivierte Makrophagen und endotheliale Zellen ist für die Zerstörung von Tumorzellen, die durch die Kapillarwand dringen, durch Zytostase und Inhibierung der mitochondrialen Atmung verantwortlich (Stuehr et al 1989). Zusätzlich werden metastatische Zellen durch Apoptosemechanismen eliminiert (Fournier et al. 1999).

Demgegenüber können Fibrinablagerungen, Blutplättchenaggregationen sowie Adhäsion um Tumoremboli zirkulierende Zellen vor mechanischen Traumata schützen und ihren Verbleib im Kapillarbett erleichtern. Die Tumorzellen werden dadurch vor der Zerstörung durch das Immunsystem geschützt (Fournier et al. 1999).

Während zahlreicher Untersuchungen konnten bereits einige Eigenschaften von DTZ charakterisiert werden (Übersicht bei Pantel et al. 1991, 2004). So wurde z.B. eine Verringerung der MHC Klasse I Antigene in kolorektalen und gastrischen Karzinomen gefunden (Pantel et al. 1991). MHC Klasse I Moleküle sind die restriktiven Elemente der T-Lymphozyten-vermittelten Tumorzellerkennung. Der Verlust dieser Moleküle ist hilfreich bei der Erklärung, warum Tumorzellen der Wirtsimmunität entgehen können. Weiterhin konnte die Expression des Urokinase-Plasminogenaktivator Rezeptors (uPAR) nachgewiesen werden. In Verbindung mit seinem Liganden dem Urokinase-Plasminogenaktivator (uPA) beschleunigt uPAR die plasminabhängige Proteolyse. Dies führt zu einer sehr effizienten Degradation extrazellulärer Komponenten, wie Fibrin und Kollagen IV. Damit ist uPAR an diversen zellulären Prozessen beteiligt, wie Invasion, Intravasation, Migration und Metastasierung. Der Nachweis von uPAR auf DTZ korrelierte mit einem signifikant schlechteren krankheitsfreien Überleben bei Patienten mit Magenkarzinomen (Heiss et al. 2002). Die Expression von Wachstumsfaktoren stellt ebenfalls ein wichtiges Kriterium von DTZ dar. Das humane *erbB2*-Protoonkogen kodiert für einen Transmembran-Glykoproteinrezeptor (p185^{erbB2}), der Sequenzhomologien zum epidermalen Wachstumsfaktorrezeptor zeigt. Die Amplifizierung von *erbB2* und die Überexpression von p185^{erbB2} kommen in 15 – 30% der primären Mammakarzinome vor. Braun et al. (2001) berichtete von einer erhöhten p185^{erbB2}-Expression in disseminierten Tumorzellen im Vergleich zu den Primärtumoren. Dies weist auf eine bevorzugte Selektion dieser Zellen während der Tumorprogression hin. Die Daten zeigten auch, dass p185^{erbB2}-positive Zellen mögliche potentielle Vorläufer von entfernten Metastasen sein könnten. Klein et al. (2002) beschreiben die Expression eines extrazellulären Matrix-Metalloproteinase-Inducer (EMMPRIN). Die Expression konnte dabei auf über 60 % der untersuchten DTZ durch Array-Analysen detektiert werden. EMMPRIN zeigt zudem eine der höchsten Expressionsraten von Proteinen auf DTZ. EMMPRIN stimuliert die Expression von Matrix-Metalloproteinasen in Primärtumorzellen. Matrix-Metalloproteinasen umfassen eine Gruppe sezernierter oder membranständiger Enzyme, die Bestandteile des interstitiellen Bindegewebes und der Basalmembran abbauen können. Unter physiologischen Bedingungen sind die Enzyme an der Remodellierung des Bindegewebes z.B. im Verlauf der Embryogenese sowie von Wachstum und Involution (Rückbildung) hormonabhängiger Organe beteiligt (Wagener 1999). In normalen Brust- und Lungengewebe konnte die mRNA für EMMPRIN nicht detektiert werden. Es wird nun vermutet, dass epitheliale Tumoreinzellen EMMPRIN benutzen, um durch Invasion ins mesenchymale Stroma zu gelangen (Klein et al. 2002).

1.2. Genetische und epigenetische Veränderungen

Tumorzellen sind durch eine Vielzahl komplexer morphologischer und physiologischer Veränderungen gekennzeichnet. Sie können auf der DNA-, der RNA- und/oder der Proteinebene auftreten und ineinander greifen. Grundlegend und charakteristisch für Tumorprozesse sind genetische Veränderungen auf der DNA-Ebene. Sie können erworben (somatische Mutation) oder ererbt (Keimbahnmutation) sein und das gesamte Genom, einzelne Chromosomen oder Gene betreffen (Hagemann 1984). Die genetischen Veränderungen während einer neoplastischen Transformation betreffen im Wesentlichen zwei Gengruppen: Proto-Onkogene und Tumorsuppressorgene (TSG). Dem Auftreten von mehreren kritischen Mutationen in Onkogenen und TSG scheint dabei eine gleichwertige Bedeutung für die Herausbildung von malignen Tumoren zuzukommen.

Onkogene entstehen aus Proto-Onkogenen durch Mutation, Vermehrung oder Deregulation infolge chemischer Aktivierung, physikalischer Einwirkung oder Infektion durch RNA-Viren. Für die Proto-Onkogenaktivierung durch Mutationen sind verschiedene Mechanismen bekannt (Blümcke 1995):

- Vermehrung der Genkopien in einem Chromosom (Genamplifikation)
- Translokation; eine Positionsverschiebung der DNA-Sequenz führt zu veränderter bzw. enthemmter Transkription
- Austausch eines Nukleotids (Punktmutation)
- Verlust von DNA-Sequenzen (Deletionen)

Als Onkogenprodukte werden Proteine bezeichnet, die Bestandteile der Signalwege von Wachstumsfaktoren sind. Sie umfassen vor allem Wachstumsfaktoren, -rezeptoren, Proteinkinasen und Transkriptionsfaktoren (Taubert 2002). Onkogene liegen in Tumoren häufig amplifiziert oder mutiert vor, was in beiden Fällen zu einer Überfunktion des Onkogens führt. Die vermehrte Produktion von Wachstumsfaktoren oder ihrer (kern- bzw. membranständigen) Rezeptoren führt zu einer proliferativen Autostimulation der transformierten Zelle. Zu den Onkogenen zählen z.B. die Gene der *ras*-Genfamilie. Sie umfasst beim Menschen die Gene *K-ras-2*, *N-ras* und *H-ras-1* sowie die Pseudogene *K-ras-1* und *H-ras-2*. Die RAS-Proteine stellen ein wesentliches Glied der Signalübertragungskette von der Zelloberfläche zum Zellkern dar (Taubert 2002). Es wird geschätzt, dass etwa 30% aller Tumoren durch *ras*-Mutationen charakterisiert sind (Johnson et al. 1997). Mutationen in einzelnen *ras*-Genen sind offensichtlich charakteristisch für bestimmte Tumore. So werden *K-ras*-Mutationen bei Pankreas-, Kolon- und Bronchialkarzinomen, *N-ras*-Mutationen bei akuter myeloblastischer Leukämie und bei Lymphomen und *H-ras*-Mutationen bei Karzinomen des Urogenitaltrakts beobachtet (Lowry und Willumsen 1993, Taubert 1999). Ein weiteres Onkogen ist *c-myc*, ein wesentlicher Regulator der Zellproliferation. Eine Überproduktion des Genproduktes kann ruhende Zellen dazu bringen in den Zellzyklus

einzutreten, was wiederum eine Unterdrückung von Zelldifferenzierungsvorgängen zur Folge hat (Taubert 2002). *Myc* führt in Zellkultur auch ohne Anwesenheit von Wachstumsfaktoren zur Proliferation von Fibroblasten. Aufgrund seiner Struktur wird das *myc*-Genprodukt den Transkriptionsfaktoren zugerechnet (Trent 1994).

TSG-Produkte besitzen wachstumshemmende und differenzierungsinduzierende Funktionen. TSG liegen in Tumoren häufig deletiert oder mutiert vor, was zu einem teilweisen oder vollständigen Verlust ihrer Funktion führt (Taubert 2002). Die Ausschaltung beider TSG-Allele und damit der Wegfall der physiologischen Wachstumshemmung ist ein weiterer Mechanismus bei der neoplastischen Transformation der Zelle. Zu den TSG zählen unter anderem *p53* und *Rb* (Retinoblastom-Gen). Das P53-Protein ist ein Phosphoprotein, das im Zellkern an die DNA bindet und als Transkriptionsfaktor wirkt. P53 ist in der Lage, nach einer Schädigung der DNA, z.B. durch chemische Mutagene oder ionisierende Strahlung, den Zellzyklus anzuhalten, indem es phosphatgruppenübertragende Enzyme hemmt (ein Inhibitor für zyklinabhängige Kinasen $p21^{WAF-1/CIP1}$ wird aktiviert) und einen programmierten Zelltod induziert. Weiterhin werden Gene in verschiedenen Apoptosewegen (*bax*, *fas*) aktiviert (Taubert 2002). Insgesamt sind *p53*-Genprodukte an verschiedenen zellulären Prozessen beteiligt, wie z.B. Gentranskription, DNA-Reparatur, Regulation des Zellzyklus, Seneszenz und Apoptose (Altieri 2006, Offner et al. 1999). Mutationen, die *p53* betreffen, bilden mit über 50% die häufigsten molekularen Veränderungen in bösartigen Tumoren (Hollstein et al. 1991). Die dabei am häufigsten auftretenden Mutationen sind nicht zufällig über das Gen verteilt, sondern befinden sich meist innerhalb der DNA-bindenden Kerndomäne. Dabei ragen einzelne Orte mit einer besonders hohen Mutationshäufigkeit („hot spots“) heraus (Taubert 2002). Für *p53* konnte erstmals die direkte Wechselwirkung zwischen einem krebserregenden Stoff (Karzinogen) und der von einer Mutation betroffenen Gensequenz für Bronchialkarzinome gezeigt werden. So können sich Benzo(a)pyrene (z.B. im Zigarettenrauch) an Guaninbausteine des *p53*-Gens anlagern, Mutationen induzieren und dadurch den *p53*-Tumorsuppressor inaktivieren (Denissenko et al. 1996). Je nach Tumorart können Mutationen des *p53*-Gens bereits in frühen oder erst in späteren Tumorstadien auftreten. In Mamma-, Bronchial-, Magen- und Cervixkarzinomen sind *p53*-Mutationen mit frühen Tumorstadien assoziiert (Wagener 1999). Das *rb*-Gen stellt das zuerst identifizierte und molekular charakterisierte TSG dar. Es spielt eine wesentliche Rolle bei der zellzyklusspezifischen Regulation von Genen. Im nichtphosphorylierten Zustand des Genproduktes werden Transkriptionsfaktoren der E2F-Familie fest gebunden. Sie sind für die Aktivierung von zahlreichen Genen (z.B. *c-fos* und *c-myc*) verantwortlich, deren Genprodukte in der DNA-Synthesephase (S-Phase) benötigt werden. Wird das *rb*-Genprodukt durch Zyklin-abhängige Kinasen phosphoryliert, werden Transkriptionsfaktoren der E2F-Familie freigesetzt und der Zellzyklus kann voranschreiten (Weinberg 1995). Im *rb*-Gen treten am häufigsten Verluste von Genabschnitten oder des gesamten Gens auf. Wesentlich seltener sind Punktmutationen (Taubert 2002). Insgesamt sind etwa 30% aller

bösartigen Tumoren von *rb*-Genveränderungen betroffen (McLeod und Jacks 1997). So können genetische Veränderungen häufig bei Retinoblastomen von Kindern, bei Blasen-, Prostata-, Mammakarzinomen und Sarkomen nachgewiesen werden. Ein weiteres TSG ist *p16*, welches ebenfalls in mehr als 15 Tumorarten verändert vorliegt. Dabei treten vor allem hemi- und homozygote Deletionen, intragenische Mutationen und Promotorhypermethylierungen auf. Sie gelten als wesentliche Schritte der Tumorgenese von Karzinomen (Taubert 2002).

1.2.1. Mikrosatelliteninstabilität und Verlust der Heterozygotie

Mikrosatelliten sind Regionen mit tandemartigen repetitiven Sequenzwiederholungen von ein bis sechs Nukleotideinheiten. Sie kommen primär in nichtkodierenden, aber auch in kodierenden Bereichen der DNA vor. Die Anzahl der Mikrosatelliten-Wiederholungseinheiten an einem bestimmten Locus sind genetisch determiniert. Diese hochrepetitiven Regionen der DNA sind für die DNA-Polymerase während der DNA-Synthese schwierig zu replizieren. Im Verlauf der Replikation ist es möglich, dass sich der neusynthetisierte gegen den abgelesenen DNA-Strang im Bereich von DNA-Wiederholungseinheiten verschiebt (Wagener 1999). Im Ergebnis entstehen Insertionen oder Deletionen dieser Sequenzen, und es kommt zu einer Änderung der Größe der Mikrosatelliten (Mikrosatelliteninstabilität) (Siah et al. 2000). Insertionen oder Deletionen in kodierenden repetitiven DNA-Sequenzen können zu „Frameshift“-Mutationen führen (Wagener 1999). Ein vollständiger Verlust des betroffenen Mikrosatelliten ist oftmals der Ausdruck dafür, dass ein gesamtes Genallel und/oder ein Chromosomenabschnitt verloren gegangen ist (Verlust der Heterozygotie – LOH).

Mikrosatelliteninstabilitäten (MSI) werden sehr häufig in Tumoren von Patienten mit hereditärem nicht-polypösem kolorektalem Karzinom (HNPCC) gefunden (Peltomäki und de la Chapelle 1997). Beim HNPCC beruht die Instabilität von Mikrosatelliten auf Defekten im DNA-„Mismatch“-Reparatursystem (Wagener 1999). Neben HNPCC weisen auch spontane Tumoren gelegentlich einen Mikrosatelliteninstabilitäts-Phänotyp (MSI-Phänotyp) auf. Zur Entstehung von Instabilitäten im Tumorprozess werden zwei Hypothesen diskutiert. Zum einen wird angenommen, dass es sich um eine generelle genomische Instabilität handelt, welche auch zufällig Gene betrifft, die in der Tumorgenese eine Rolle spielen; zum anderen wird von einer spezifischen Instabilität einzelner chromosomaler Abschnitte ausgegangen (Meye und Taubert 2002). Das Auftreten von MSI in Tumoren, ist mit einem erhöhten Risiko der Bildung eines sekundären Tumors in einem anderen Organ verbunden. Hinzu kommt eine signifikante Korrelation zwischen dem Auftreten von genomischen Instabilitäten und der familiären Häufung von Tumoren im Kolon, dem Ovar und der Mamma (Sood und Buller 1996).

1.2.2. Methylierung

Ein Hauptmechanismus der Tumorprogression ist die Inaktivierung von TSG. Dies kann zum einen durch chromosomale Deletion oder Mutationen in der codierenden Region der Gene bedingt sein. Es ist aber auch eine epigenetische Veränderung in Form von Methylierung der Promotorregion möglich. Epigenetische Mechanismen regulieren die DNA-Zugänglichkeit während des gesamten Lebens einer Person. Unmittelbar nach der Befruchtung wird die DNA des väterlichen Genoms demethyliert und Histone modifiziert. Das mütterliche Genom wird allmählich demethyliert und eine neue Welle embryonaler Methylierung initiiert, die den Entwurf für das Gewebe des sich entwickelnden Embryos darstellt. Als Ergebnis hat damit jede Zelle ihr eigenes epigenetisches Muster, das aufrechterhalten werden muss, um die Genexpression zu regulieren. Störungen in diesem Methylierungsmuster und der Histonmodifizierung kann zu angeborenen Funktionsstörungen führen oder diese Personen neigen zu Erkrankungen wie sporadische Krebserkrankungen und neurodegenerativen Störungen (Rodenhiser und Mann 2006). Krebs ist ein vielschichtiger Prozess in welchem genetische und epigenetische Fehler akkumulieren und normale Zellen in invasive oder metastatische Tumorzellen transformieren. DNA-Hypermethylierung aktiviert Onkogene und initiiert Chromosomeninstabilität (Naryan et al. 1998, Kazazian 2004). Inaktivierung von TSG durch aberrante Methylierung wurde zuerst für das Retinoblastom-Gen (*Rb1*) beschrieben (Sakai et al. 1991). Hypermethylierung im *Rb1*-Promotor resultiert in einer Reduktion der *Rb1*-Expression. Gleichzeitige *Rb1*-Mutationen und Methylierung in Tumoren schließen sich aus, was für ähnliche funktionelle Auswirkungen spricht (Ohtani-Fujita et al. 1993). Die DNA von Eukaryonten kann nur an Cytosinen methyliert werden, die 5´ vor einem Guanosin liegen, in einer sogenannten CpG-Insel. CpG-Inseln sind Cluster von CpG Dinukleotiden mit einer durchschnittlichen Länge von 1kb. Ungefähr 60% der humanen Gene besitzen CpG-Inseln in der Nähe der 5´-Enden. Der Großteil der CpG-Inseln ist normalerweise unmethyliert. Eine Cytosinmethylierung innerhalb Promotorassoziierter CpG-Inseln ist mit einer allelspezifischen Inaktivierung bestimmter Gene verbunden. Dies kommt z.B. bei „Imprinting“-Genen und Genen auf dem inaktiven X-Chromosom bei Frauen vor. Die Cytosinmethylierung erfolgt durch die Familie der DNA-Methyltransferase-Enzyme (DNMT1-3; Toyota et al. 1999). Eine aberrante Methylierung wird bei der Krebsentwicklung beobachtet und könnte eine wichtige pathophysiologische Rolle im Prozess der Tumorentwicklung einnehmen. Veränderungen im Methylierungsmuster bei Tumoren umfassen sowohl eine Hypomethylierung der gesamten genomischen DNA, als auch regionale Hypermethylierungen von CpG-Inseln. Während globale Hypomethylierung zu genomischer Instabilität führt und die Mutationsraten erhöht, resultiert die Hypermethylierung von CpG-Inseln in der 5´-Region von Genen meist in einer transkriptionellen Inaktivierung des Genes. Methylierte Cytosine sind auch „Hotspots“ für Mutationen, wie dies für das *p53*-Gen gezeigt worden ist (Zingg et al. 1997). Die Inzidenz von Hypermethylierungen in sporadischen Tumoren variiert in Abhängigkeit von den Genen, die beteiligt sind und dem Tumortyp, in welchem das Ereignis stattgefunden hat. Die *p16*-

Promotorhypermethylierung kommt z.B. in mehr als 15 Tumorarten mit einer Inzidenzrate von 9 – 49% vor. Die *BRCA1*-Hypermethylierung dagegen tritt primär bei 10 – 20% der sporadischen Mamma- und Ovarialkarzinome auf (Esteller et al. 2001). Epigenetische Therapien sind bisher wenig bekannt. Jedoch können Nukleosid-Analoga wie Azacitidin und sein Deoxyderivat Decitabin in replizierende DNA eingebunden werden und damit Methylierung inhibieren und vorher stillgelegte Gene reaktivieren (Rodenhiser und Mann 2006). Eine Azacytidin-Behandlung von myelodysplastischen Syndromen und Leukämien, die durch Genhypermethylierung charakterisiert sind, ist sehr effektiv. So sprechen 54% der Leukämiepatienten mit einer hämatogenen Komplett- bzw. Teilantwort auf die Behandlung an, 46% zeigen eine zytogene Antwort auf die Gabe von 5-aza-2'-deoxycytidin (Rodenhiser und Mann 2006). Sowohl verstärkte, als auch verringerte DNA-Methylierung kann mit dem Alterungsprozess assoziiert sein. Es gibt immer mehr Hinweise, dass altersabhängige Methylierungsveränderungen bei der Entwicklung von neurologischen Erkrankungen, Autoimmunerkrankungen und der Tumorentwicklung bei älteren Menschen beteiligt sind (Richardson 2003). In einigen Geweben ist die Anzahl an methylierten Cytosinen in alternden Zellen verringert. Diese Demethylierung könnte chromosomale Instabilität fördern, was das Risiko von Neoplasien erhöht. In anderen Geweben, wie z.B. dem Intestinalgewebe kann eine global erhöhte Hypermethylierung das initiierende Ereignis sein, welches für ein erhöhtes Risiko von Kolonkrebs im fortgeschrittenen Alter verantwortlich ist (Rodenhiser und Mann 2006).

1.3. Das Mammakarzinom

1.3.1. Risikofaktoren und genetische Faktoren

Das Mammakarzinom (MMK) ist der häufigste bösartige Organkrebs der Frau. Die jährliche Neuerkrankungsrate beträgt in Deutschland gegenwärtig 100 auf 100.000 Frauen, die Mortalitätsrate 50 auf 100.000 Frauen (Blümcke 1995). Statistisch besteht für jedes 16. neugeborene Mädchen das Risiko, im Laufe seines Lebens an einem MMK zu erkranken. Die Wahrscheinlichkeit dafür steigt nach dem 40. Lebensjahr exponentiell mit dem Lebensalter an. Die häufigsten Risikofaktoren für die Entstehung eines MMK sind das Lebensalter, eine familiäre Mammakarzinombelastung, Abweichungen im Östrogenprofil, gestörte Immunüberwachung und Überernährung. Aber auch gynäkologische Faktoren, wie eine frühe Menarche (<12 Jahren), ein hohes Alter bei der Erstgeburt, kurze Laktationsdauer und eine späte Menopause werden mit der Entwicklung von Brusttumoren in Verbindung gebracht (Kelsey et al. 1993). Auch Faktoren, wie die richtige Ernährung oder Alkoholmissbrauch beeinflussen das Risiko. So kann ein Mangel an Folsäure oder seiner Kofaktoren, wie Vitamin B6 und B12 in Verbindung mit übermäßigem Alkoholgenuß zu einer abnormen DNA-Synthese, Reparatur und aberranter DNA-Methylierung führen und damit an der Brustkarzinogenese beteiligt sein (Mason et al. 1996). Eine Schwangerschaft hat einen

zum Teil sehr komplexen Einfluss auf das Brustkrebsrisiko. Für die ersten zehn Jahre nach der Schwangerschaft besteht ein erhöhtes Risiko. Dies ist möglicherweise durch Hormonstimulation der Brustepithelzellen bedingt. Dagegen ist das Risiko über die Zeit reduziert, da das Brustgewebe gegen somatische Mutationen unempfindlicher wird (Lambe et al. 1994).

Untersuchungen zum MMK zeigen, dass zahlreiche genetische Veränderungen in diesen Tumoren auftreten. Diese Veränderungen betreffen sowohl Onkogene als auch TSG. Für familiäre Tumore der Brust sind Mutationen in den TSG *BRCA1* und *-2* häufig verantwortlich. Bei sporadischen Tumoren sind Amplifikationen der Onkogene *myc*, *ERBB2* und *INT2* mit einem aggressiven Tumorverhalten assoziiert. So zeigen Patienten mit der Amplifikation dieser Gene häufiger LKM (Berns et al. 1992).

1.3.2. Tumorverhalten

Das invasive duktales Karzinom ist mit etwa 80% aller Karzinomfälle der häufigste Tumortyp der Mamma (Blümcke 1995). Diese Karzinome leiten sich vom Epithel der terminalen Milchgänge ab. Das invasive lobuläre Karzinom leitet sich vom Azinusepithel der Drüsenläppchen ab und kommt bei 10 – 15% der MMK vor (Blümcke 1995). Erneutes Tumorwachstum wird im Bereich der Operationsnarbe, in Haut und Unterhaut des Operationsfeldes sowie in der Axilla beobachtet. Rezidive treten am häufigsten in den ersten drei Jahren nach der Operation auf, kommen aber auch viele Jahre danach als Spätrezidive vor (Karrison et al. 1999). Brustkrebs metastasiert häufig in Knochen, Leber, Gehirn und Lungen (Abb. 1-2). Der Großteil der Tumorzellen, die in die Blutzirkulation eintreten, gelangt über das Herz in die Kapillaren der Lunge. Dort verbleibt die Mehrzahl der Zellen. Der Rest dringt in die systemische arterielle Zirkulation ein und wird so in das Kapillarnetz aller Organe des Körpers verteilt. Alternativ invadieren einige Tumorzellen in die Lymphbahnen und werden zum sogenannten Sentinellymphknoten transportiert, wo sie möglicherweise auswachsen. Da es keinen direkten lymphatischen Weg zu Organen gibt, in denen Brustkrebsmetastasen häufig vorkommen (z.B. Leber, Gehirn), müssen diese Zellen wahrscheinlich in die Blutzirkulation gelangen, um zu diesen Organen zu kommen. Dies kann indirekt über ableitende (efferente) Lymphgefäße, die eventuell in Venen einfließen oder direkt über neu gebildete Blutgefäße geschehen, die die LKM versorgen. Obwohl der Nachweis von LKM als negativer Prognosefaktor gilt, ist bisher unbekannt, ob Metastasen in anderen Organen durch lymphatische Streuung von Tumorzellen oder durch hämatogene Verteilung entstanden sind.

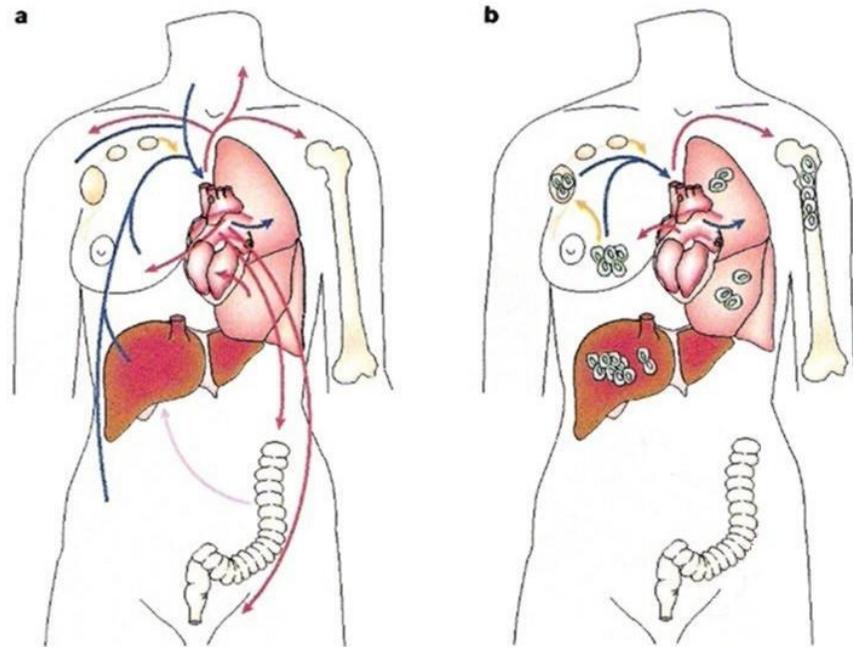


Abb 1 – 2 Vaskularflußmuster und die korrespondierende Bewegung von Krebszellen, die in verschiedenen Organen auftreten (modifiziert nach Chambers et al. 2002).

a) Das Blut der meisten Organe wird durch das venöse System direkt zum Herz befördert und passiert die Lungen (blau). Es fließt dann zum Herz zurück und zirkuliert durch alle Organe des Körpers über das arterielle System (rot). Das Blut der Eingeweide, z.B. Darm durchfließt zuerst die Leber (lila) und gelangt dann in das venöse System. Überall im Körper gelangt der Überschuss an extravaskulärer Flüssigkeit in die Lymphgefäße (gelb), durchläuft die Lymphknoten und gelangt ins venöse System zurück. **b)** Brustkrebszellen, die den Primärtumor über die Blutgefäße verlassen, werden mit dem Blutfluß zuerst zum Herz befördert und anschließend zur Lunge. Einige Tumorzellen könnten über die Lunge in das arterielle System gelangen, wodurch sie zu entfernteren Organen kommen, wie z.B. die Knochen. Im Gegensatz zu Kolonkarzinomen gibt es bei MMK keinen direkten Weg vom Lymphsystem zu anderen Organen. Diese Zellen müssen das venöse System erreichen, um zu entfernteren Organen transportiert zu werden.

1.3.3. Therapiemöglichkeiten

Die Entscheidung über adjuvante (nach der Operation) Therapieformen ist vom Alter, Tumorgroße, Lymphknotenbefall und dem Hormonstatus abhängig. Die Strahlentherapie zerstört mit Hilfe hoch energetisierter Röntgenstrahlen Tumorzellen bei möglichst geringer Wirkung auf die gesunden Zellen. Bei größeren Tumoren erfolgt die Strahlentherapie auch vor der Operation (neoadjuvant), um eine brusterhaltende Therapie zu ermöglichen. Sind die Tumoren hormonempfindlich, so ist der Einsatz von Aromatasehemmern möglich. Das normale Brustdrüsenepithel enthält Östrogen- und Progesteronrezeptoren, welche die endokrine Stimulation der Mamma vermitteln und die biochemisch oder immunhistologisch auch in einem Teil der MMK gefunden werden. Danach sind jeweils östrogenrezeptor- oder progesteronrezeptorpositive bzw. –negative MMK mit entsprechenden prognostischen und therapeutischen Unterschieden möglich. Östrogen stimuliert das Wachstum hormonempfindlicher Tumore, indem es an die Östrogenrezeptoren der Tumorzellen bindet und diese aktiviert. Die Rezeptoren verändern die Form und lagern sich zu Dimeren

zusammen. Die Dimere aktivieren die Zellteilung der Tumorzelle. Die Bindung von Östrogen an seinen Rezeptor ist bei hormonempfindlichen Tumoren ein wesentlicher Auslöser des Tumorwachstums. Östrogen wird mit Hilfe des Enzyms Aromatase aus Hormonvorstufen hauptsächlich in der Nebenniere gebildet. Aromatasehemmer verhindern diesen Umwandlungsprozess, indem das Enzym Aromatase blockiert wird. Der Östrogenspiegel wird im Körper reduziert. Diese Medikamente sind nur für Frauen geeignet, die kein Östrogen mehr in den Eierstöcken bilden (nach den Wechseljahren), da sie dort die Synthese nicht unterbinden können. Therapien mit Antiöstrogenen blockieren die Bindungsstellen an den Östrogenrezeptoren. Es kommt so nur noch selten zur Zusammenlagerung von zwei Rezeptoren (Dimeren). Die Rezeptoren bleiben inaktiv und werden schneller wieder abgebaut. Das Wachstum der Tumorzellen wird dadurch stark gebremst. LHRH (Luteinisierendes Hormon Releasing Hormon)-Analoga eignen sich zur Behandlung von hormonsensitivem Brustkrebs bei Frauen, die noch keine Wechseljahre hatten. Die Östrogenproduktion der Eierstöcke wird durch LHRH-Analoga unterbunden, indem diese die Ausschüttung des Follikelstimulierenden Hormons (FSH) und des Luteinisierenden Hormons (LH) aus der Hirnanhangdrüse (Hypophyse) verhindern. Diese Hormone verursachen die Follikelreifung und die damit verbundene Östrogenproduktion in den Eierstöcken. Die Tumorzellen werden nicht mehr mit Östrogen versorgt und deshalb in ihrem Wachstum gebremst.

In Tabelle 8-1 (im Anhang) ist die Klassifizierung der MMK nach der postoperativen histopathologischen Klassifikation (pTNM – System) der Union Internationale Contre Le Cancer (UICC) dargestellt (6th edition 2002).

1.4. Das Nierenzellkarzinom

1.4.1. Tumorverhalten und genetische Faktoren

Das Nierenzellkarzinom macht 3% aller bösartigen Tumore des Erwachsenen aus. Es steht in seiner Häufigkeit an dritter Stelle unter den urologischen Malignitäten, führt aber am häufigsten zum Tod (Lam et al. 2005). Innerhalb eines Jahres wird bei etwa 30.000 Europäern die Diagnose Nierenzellkarzinom (NZK) gestellt. NZK sind der häufigste Tumortyp der adulten Niere mit einer Inzidenz von ca. 85% aller renalen Neoplasien. Ausgangsgewebe der epithelialen Tumoren sind die Tubuli des Nephron- und des Sammelrohrsystems. Die Tumoren entwickeln sich überwiegend langsam und sind vorwiegend in der Nierenrinde lokalisiert. Eine Klassifizierung der NZK in Untergruppen erfolgt anhand der Histologie. Der klarzellige Typ des NZK ist am häufigsten und macht 70 – 80% aller Nierenzellkarzinomfälle aus. Andere histologische Typen sind papilläre (10 – 15%), chromophobe (4 – 5%) und Sammelrohrkarzinome (1%) (Stadler 2005).

Molekulargenetische Studien zeigen Veränderungen auf dem Chromosom 3 bei NZK. Am häufigsten tritt der Verlust terminaler Regionen auf dem kurzen Arm (3p) auf, die oft auch mit einer Translokation in der Nähe des „breakpoints“ 3p13 assoziiert sind. Das Von Hippel-Lindau (VHL) Syndrom, eine familiäre Form des NZK, tritt in jungen Jahren auf und ist durch vielseitige Veränderungen der Nieren gekennzeichnet, wie z.B. Nierenzellkarzinom in Kombination mit Nierenzysten. Die nähere Charakterisierung dieser familiären Erkrankung führte zur Identifizierung einer Keimbahnmutation des VHL-Gens auf dem kurzen Arm des Chromosoms 3 (3p25; Hamano et al. 2002). Kommt es entsprechend dem 2-Schritt-Mechanismus von Knudson (1971) wie bei klassischen TSG zu einer Mutation oder Deletion auf dem zweiten Allel in für Mutationen anfälligen Organen, so kann ein Tumor entstehen. Das *VHL*-Gen kann auch bei sporadischen NZK beteiligt sein, indem beide Kopien des Gens mutiert oder inaktiviert sind. In 40 – 60% der sporadischen NZK kommt es zu solch einer Inaktivierung beider *VHL*-Allele durch Mutation, Methylierung oder Deletion (Hamano et al. 2002, Hemminki et al. 2002). Weitere TSG-Gene auf 3p sind z.B. *RASSF1A* (3p21.3), *FHIT* (3p14.2) und *rar-β* (3p24).

1.4.2. Therapiemöglichkeiten

20 – 40% der Patienten weisen bereits zum Zeitpunkt der Diagnosestellung erfassbare Metastasen auf und 50% der Patienten mit diagnostiziertem metastasefreiem NZK erleiden nach der Nephrektomie einen Progress (Übersicht: Staehler und Pomer 1997). Die Voraussage des tumorbiologischen und des klinischen Verlaufs ist nach wie vor schwierig. Bisher gibt es für das NZK keine einheitliche systemische Therapie, die in der Mehrzahl der Patienten mit metastasierendem NZK erfolgreich ist. NZK zeigen eine ausgeprägte Resistenz gegenüber Chemo- und Strahlentherapie, deren Ursachen mit der hohen Expression von „multiple drug resistance“ (MDR) – Genprodukten assoziiert wird, die bei 80% der NZK-Fälle nachgewiesen werden können. Klassische zytotoxische Agenzien wie Vinblastin zeigen eine sehr geringe Antitumor-Aktivität in NZK. Samuels und Kollegen (1997) konnten nur bei einem von 80 Patienten ein objektives Ansprechen auf eine Behandlung mit Vinblastin nachweisen. Auch 5-Fluoruracil (5-FU) und ähnliche Verbindungen bewirken in nur 5% der Fälle eine Verkleinerung der Tumorlast (Kish et al. 1994). Eine Kombination von Gemcitabin und 5-FU ist wirksamer, aber die Ansprechrates liegt immer noch unter 20% und es konnte keine Komplettremission (kein Tumor mehr nachweisbar) oder ein Überlebensvorteil beobachtet werden (Rini et al. 2000). Eine Immuntherapie mit Interferon Alpha (IFN- α) oder Interleukin-2 (IL-2) bzw. eine Kombination von beidem war bisher Standardtherapie in der Behandlung von NZK. Das Therapieansprechen bei IFN- α liegt bei 10 – 15% und es kann nur eine Lebensverlängerung von im Durchschnitt drei bis sieben Monaten erreicht werden (Fossa 2000). Der Hauptvorteil einer IL-2 Therapie ist das Auftreten einer Komplettremission in 3 – 8% der Fälle. Die benötigten hohen Dosen führen jedoch zu schweren Komplikationen, wie Lungenödeme, Herzrhythmusstörungen bis hin

zum Tod. Die Daten zeigen, dass die Prognose für Patienten mit einem fortgeschrittenen NZK sehr schlecht ist. Das mittlere Überleben beträgt zehn Monate und die 5-Jahresüberlebensrate liegt bei weniger als 10% (Chow et al. 1999). Das Risiko einer Lymphknotenmetastasierung macht 20% aus und variiert in Abhängigkeit von der Größe des Primärtumors und der Infiltration renaler Venen. Die 5-Jahresüberlebensrate der Patienten mit LKM beträgt 11 – 35%. Aktuelle Therapiestrategien mit den Tyrosinkinaseinhibitoren Sorafenib und Sunitinib versprechen für die Zukunft eine wirksame Behandlung von fortgeschrittenem klarzelligen NZK. Die sogenannten „kleinen Moleküle“ Sorafenib und Sunitinib greifen gezielt in den Stoffwechsel der Tumorzellen ein und hemmen neben der Tumorpheriferation zugleich auch die Tumorangiogenese und damit auch die Tumorpheression (Motzer et al. 2006 und 2007, Gore 2007).

In Tabelle 8-2 (im Anhang) ist die Klassifizierung der NZK nach der postoperativen histopathologischen Klassifikation (pTNM – System) der Union Internationale Contre Le Cancer (UICC) dargestellt (6th edition 2002).

1.5. Das Prostatakarzinom

1.5.1. Risikofaktoren

In Deutschland erkranken derzeit jährlich ca. 50.000 Männer an einem Prostatakarzinom (PCA). Damit ist das PCA der häufigste diagnostizierte bösartige Tumor des Mannes. Der Häufigkeitsspitzen liegt um das 72. Lebensjahr. Eine Erkrankung an PCA ist bei Männern afrikanischen Ursprungs häufiger als bei Weißen oder Asiaten. Darüber hinaus tragen etwa drei von zehn Männern über 50 Jahren ein so genanntes stummes (latentes) Karzinom in ihrer Prostata, kleine Krebszellanhäufungen, die zu Lebzeiten keinerlei Beschwerden verursachen und auch nicht gesundheitsgefährdend sind. Nur bei einem Teil der Männer beginnt diese „schlafende“ Form des Krebses irgendwann schneller zu wachsen und führt zur bedrohlichen Erkrankung. Die Ursachen von PCA sind bisher noch weitgehend unbekannt. Es werden aber mehrere Risikofaktoren für ein gehäuftes Auftreten verantwortlich gemacht. Als gesichert gilt ein familiäres Risiko. Eine Veränderung des Erbgutes begünstigt hierbei die Krankheitsentstehung. Wenn der Vater oder der Bruder an einem PCA erkrankt sind, ist das Risiko selbst zu erkranken etwa zwei bis dreifach erhöht. Sind Vater und Bruder betroffen, steigt das Risiko auf das fünffache an. Es besteht auch eine höhere Wahrscheinlichkeit PCA in einem frühen Lebensalter zu bekommen. Der Anteil der genetisch bedingten Prostataerkrankungen wird auf 5 – 10% geschätzt (www.krebsgesellschaft.de). Das Alter spielt bei der Erkrankung an PCA ebenfalls eine wesentliche Rolle. Über 80% der Männer, bei denen ein PCA diagnostiziert wird, sind älter als 60 Jahre. Die Wahrscheinlichkeit, an PCA zu erkranken, steigt zwischen dem 50. und 85. Lebensjahr bis auf das 40fache an. Hormone (Androgene) sind ein wesentlicher Faktor bei

der Entstehung der Krankheit. Ein PCA kann nicht ohne das männliche Geschlechtshormon Testosteron entstehen. So können z.B. Männer, die in jungen Jahren einen beidseitigen Hodenverlust erlitten haben, später nicht an Prostatakrebs erkranken. Gut untersucht ist auch der Zusammenhang von PCA und Ernährung: fettreiche, faserarme Kost mit viel rotem Fleisch fördert das Krebsrisiko (www.onmeda.de). Einige Studien zeigen, dass Landwirte sowie Arbeiter, die während des Schweißens, Galvanisierens oder der Herstellung von Batterien metallischem Kadmium ausgesetzt waren, einer Risikogruppe angehören und mit einer erhöhten Wahrscheinlichkeit an einem PCA erkranken. Ebenso scheint das Arbeiten in der Gummi- (Kautschuk-) Industrie das Erkrankungsrisiko zu steigern (www.krebsgesellschaft.de).

1.5.2. Therapiemöglichkeiten

Ein wesentlicher Faktor für den frühzeitigen Nachweis und die Kontrolle der Therapieeffektivität ist das PSA-Niveau. Das PSA (prostataspezifisches Antigen) ist ein Protein, das nur von der Prostata gebildet wird und bei PCA vermehrt in die Blutbahn gelangt. Bei einem PSA-Wert unter 10 ng/ml ist der Tumor noch nicht über die Prostata hinaus gewachsen bzw. ist eine Abgrenzung von einer gutartigen Erkrankung nicht möglich; bei PSA-Werten darüber sind zunehmend Metastasen in Knochen, Lymphknoten oder der Lunge wahrscheinlich. Die Operation mit kompletter Entfernung der Prostata (radikale Prostatektomie) ist eine wirksame und in > 90% der Fälle kurative Behandlung. Wenn der Tumor noch nicht über die Prostata hinaus gewachsen ist und keine Metastasen in anderen Organen gebildet hat, kann die Erkrankung damit geheilt werden. Alternativ zur Operation kann eine subkutane Strahlentherapie erfolgen (mit allerdings schlechteren Langzeitüberlebensraten). In der Regel erfolgt die Bestrahlung der Tumorregion – und unter Umständen auch der Lymphknoten im Beckenraum – von außen (externe Bestrahlung). Möglich ist auch eine direkte Bestrahlung des Tumors mittels „Seed“-Implantation (Brachytherapie). Dabei werden kleine radioaktive Strahler („Seeds“) direkt in die Prostata implantiert und geben dort über Monate ihre Strahlendosis an die Umgebung ab. Bei 35% der Patienten hat bereits eine Streuung des Tumors stattgefunden, wenn ein PCA erstmals diagnostiziert wird. Eine Heilung ist in diesem Stadium nicht mehr möglich, aber dennoch stehen wirksame Behandlungsmöglichkeiten zur Verfügung. Im Vordergrund der Therapie steht dann, das Tumorstadium zu bremsen und die Beschwerden zu lindern (palliative Therapie). Durch Unterdrückung der Produktion des Testosterons kann bei 80% der Tumoren eine zeitlich begrenzte Wachstumshemmung erzielt werden. Der Erfolg der Therapie wird durch regelmäßige Serum-PSA-Kontrollen überprüft. Die Möglichkeiten der Hormontherapie sind zum einen die Unterdrückung der Bildung von Testosteron durch Kastration; möglich sind die chirurgische Entfernung des Hodengewebes unter Belassung der Hodenkapsel sowie eine „medikamentöse Kastration“ mit LHRH-Agonisten. Ebenso ist eine Blockade der Wirkung körpereigenen Testosterons an den Tumorzellen durch Gabe von

Antiandrogenen möglich. Wenn der Tumor nicht (mehr) für Hormone sensibel ist und die Blockade von Testosteron daher keine Wirkung hat, kann bei 30 – 50% dieser Fälle durch die Einnahme eines Zytostatikums (Chemotherapie) Besserung erzielt werden. Knochenmetastasen werden medikamentös mit Bisphosphonaten und mit einer Strahlentherapie behandelt.

Das PCA ist wie andere Tumorarten ein Ergebnis der Akkumulation von genetischen und epigenetischen Alterationen, die das normale glanduläre Epithel in neoplastische Läsionen und später in invasive Karzinome umwandelt. Charakteristische genetische Veränderungen und Sequenzveränderungen in der Entwicklung und Progression der Erkrankung konnten noch nicht identifiziert werden. Dies ist zum Teil auch auf die extreme Heterogenität und die multifokale Natur dieser Tumore zurückzuführen. Morphologisch besitzen PCA oft nicht nur eine Heterogenität im histologischen Grad innerhalb des Tumors, sondern auch eine multifokale Histogenese innerhalb der Prostata. In einigen Fällen könnte diese Heterogenität ein Resultat einer multifokalen Tumorgenese mit multifokalen Tumoren verschiedener Wachstumsgrade sein. Ob diese Heterogenität einen multizentrischen Ursprung hat, bleibt jedoch eine offene Frage. Zytogenetische Studien, wie Fluoreszenz in situ Hybridisierung (FISH) und comparative genomische Hybridisierung (CGH) zeigen chromosomale Abnormalitäten, die auch wichtige Gene betreffen, von denen bekannt ist, dass sie bei der Tumorentwicklung und Progression involviert sind. Chromosomale Verluste kommen dabei häufiger als Zugewinne vor. Häufige Ereignisse in PCA sind Verluste auf den Chromosomenarmen 6q, 7q, 8p, 10q, 16q und 17 (Konishi et al. 2005). Aberrante epigenetische Veränderungen wie DNA-Hypermethylierung, DNA-Hypomethylierung und Histonacetylierung konnte ebenfalls in Prostatatumoren nachgewiesen werden. Die häufigste epigenetische Veränderung ist dabei die Hypermethylierung von GST-P (Glutathion-S-Transferase P), einem Hauptenzym, das vor Schäden durch reaktiven Sauerstoff schützt (Lee et al 1994). Während die meisten PCA sporadisch auftreten, sind ca. 9% der Tumore familiär bedingt (Konishi et al 2005). Bisher konnte kein Hauptgen bestimmt werden, das für diese Form verantwortlich ist. Jedoch besitzen Patienten mit einem betroffenen Bruder ein höheres Risiko im Vergleich wenn der Vater betroffen ist. Dies impliziert eine mögliche X-Chromosomen abhängige rezessive Vererbung (Konishi et al 2005).

In Tabelle 8-3 (im Anhang) ist die Klassifizierung der PCA nach der postoperativen histopathologischen Klassifikation (pTNM – System) der Union Internationale Contre Le Cancer (UICC) zusammengefasst (6th edition 2002).

1.6. Aufgabenstellung

Ziel dieser Arbeit ist es, die Bedeutung des Nachweises von disseminierten Tumorzellen (DTZ) für drei Gruppen von Karzinompatienten – Nierenzell-, Mamma- und Prostatakarzinome – zu ermitteln. Als Kollektive werden dafür Patienten aus der Universitäts- und Poliklinik für Gynäkologie und der Universitäts- und Poliklinik für Urologie rekrutiert. Die retrospektiven Analysen erfolgen an Gewebeproben aus Tumorbanken des Institutes für Pathologie und der Universitäts- und Poliklinik für Gynäkologie. Die Untersuchungen werden mit schriftlichem Einverständnis der Patienten durchgeführt.

Es sollen molekulare Veränderungen auf DNA-Ebene (LOH/MSI, Methylierungsstatus, SNP309) und Proteinebene (Expression von Survivin, uPA, uPAR und PAI) in den disseminierten Tumorzellen und in Karzinomgeweben bestimmt werden. Die Untersuchungsergebnisse werden anschließend mit wesentlichen klinischen Parametern, wie Tumorgröße, -grad, -stadium, Lymphknotenbefall, Metastasierung und dem Gesamtüberleben korreliert. Für die Untersuchungen werden die folgenden Arbeitsschritte durchgeführt:

1. Präparation der Patientenproben und Anreicherung der disseminierten Tumorzellen aus dem peripheren Blut sowie Auswertung und Beurteilung der Cytospinpräparate
2. Nachweis und Isolierung der disseminierten Tumorzellen, Amplifizierung des gesamten Genoms der isolierten DTZ
3. Isolierung von DNA und Protein aus den Tumorgeweben, Normalgeweben und Metastasen
4. Verwendung der DNA in verschiedenen Analysen z.B. MSI/LOH-Analysen, Untersuchung der Promotormethylierung verschiedener Gene, Bestimmung der SNP309-Sequenz
5. Statistische Analysen: Beziehung Auftreten von DTZ und klinischen Parametern

Es sollen im Besonderen folgende Fragen beantwortet werden:

- Gibt es Korrelationen zwischen dem Auftreten der disseminierten Tumorzellen im Blut und klinischen Parametern?
- Kann der Nachweis disseminierter Tumorzellen als Prognosefaktor bei Mammakarzinomen, Nierenzellkarzinomen und Prostatakarzinomen angesehen werden?
- Ist der Nachweis von disseminierten Tumorzellen für ein Therapiemonitoring geeignet?
- Sind molekulare Veränderungen auf DNA-Ebene bzw. in der Proteinexpression für Karzinome mit dem Auftreten von disseminierten Tumorzellen bzw. klinischen Parametern assoziiert?

2. Material

2.1. Tumormaterial und Patientengut

Die verwendeten Zelllinien wurden in der Abteilung Zell- und Gewebezüchtung des Institutes für Pathologie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg nach Standardprotokollen kultiviert. Tabelle 2-1 führt die Zelllinien entsprechend ihrer Bezeichnung im ATCC – Verzeichnis („American Tissue and cell culture“, www.atcc.org) auf. Die Zelllinie PancTu-1 stammt von der AG Kalthoff (Christian-Albrechts-Universität Kiel).

Bezeichnung	Ursprungsgewebe	Referenzen	ATCC-Nummer
Caki – 1	Nierenzellkarzinom	Fogh and Trempe (1975)	HTB46
LN – CaP	Prostatakarzinom	Murphy (1980)	CRL1740
PancTu – 1	Pankreaskarzinom	Kalthoff et al. (1993)	----
MCF-7	Mammakarzinom	Surgman BJ et al. (1985)	HTB-22
RD (13/95)	embryonales Rhabdomyosarkom	American Public Health Association (1992)	CCL-136

Tab. 2 – 1 *Übersicht über die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Karzinomzelllinien.*

In dieser Arbeit wurden von 154 NZK-, 175 PCA-Patienten und 333 Patientinnen der Gynäkologie (Mamma-, Ovarial-, Cervixkarzinome) Blutproben auf mögliche disseminierte Tumorzellen hin untersucht. Die angefertigten Zytospinpräparate begutachtete der erfahrene Pathologe OA Dr. U. Bilkenroth histologisch. Die Verschlüsselung der Proben und die Anonymisierung der klinischen Daten erfolgte entsprechend ihres chronologischen Eingangs.

Zusätzlich wurde Tumorgewebe von 27 NZK-Patienten und 17 MMK-Patientinnen Gefriergewebe untersucht. Die verwendeten Tumorgewebe der NZK-Patienten einschließlich der Normalgewebeproben stammen aus dem Institut für Pathologie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg. Das Probenmaterial der MMK-Patientinnen stellte die Universitäts- und Poliklinik für Gynäkologie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg bereit. Sowohl das Tumor- als auch das korrespondierende Normalgewebe wurden intraoperativ gewonnen und in flüssigem Stickstoff schockgefroren.

Weiterhin wurde von 71 NZK-Patienten Tumor- und Normalgewebe (eingebettetes Material) analysiert. Das Tumor- und Normalgewebe dieser Patienten stammt ebenfalls aus dem Institut für Pathologie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.

2.2. Chemikalien und Reagenzien

100 bp DNA Molekulargewichtsstandard	Invitrogen™, Karlsruhe
AB – Serum	Biotest AG, Dreieich
Acrylamid – Bisacrylamid Lösung (29:1) 30 %	Serva, Heidelberg
Agarose	Serva, Heidelberg
Ammoniumpersulfat (APS)	Roth, Karlsruhe
APAAP – Kit	Dako, Hamburg
Biocoll Separating Solution	Biochrom KG, Berlin
BlueSlick	Serva, Heidelberg
Borsäure	Roth, Karlsruhe
Bromphenolblau	Serva, Heidelberg
Brücken – AK	Dako, Hamburg
CD45-Microbeads	Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach
Chloroform	Roth, Karlsruhe
Cytokeratin 8/18	Novocastra, Newcastle, UK
D – Glucose	Serva, Heidelberg
Desoxynukleotidtriphosphate (dNTP)	Promega, Heidelberg
Dextransulfat	Sigma, Steinheim
DMSO	Serva, Heidelberg
DTT	Invitrogen™, Karlsruhe
Essigsäure	Merck, Darmstadt
Ethanol (96% reinst)	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid	Serva, Heidelberg
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Roth, Karlsruhe
FACS Clean	Becton Dickinson, Irland
FACS Flow™	Becton Dickinson, Irland
FACS Rinse	Becton Dickinson, Irland
Ficoll 400	Pharmacia Biotech, Freiburg
First Strand Buffer (5x)	Invitrogen™, Karlsruhe
FKS	Bio Whittaker, Verviers, Belgien
Formaldehyd (37%)	Merck, Darmstadt
Formamid	Merck, Darmstadt
Harnstoff	Roth, Karlsruhe
Hydrochinon	Sigma, Steinheim
Igepal	Sigma, Steinheim
Isoamylalkohol	Roth, Karlsruhe
Isopropanol	Roth, Karlsruhe
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt
KH ₂ PO ₄	Merck, Darmstadt

N, N, N, N, - Tetramethylendiamin (TEMED)	Sigma, Steinheim
Na ₂ HPO ₄ *2H ₂ O	Serva, Heidelberg
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO ₃)	Merck, Darmstadt
Natriumacetat	Serva, Heidelberg
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Serva, Heidelberg
Natriumhydroxid	Roth, Karlsruhe
Natrium-Pyruvat	Bio Whittaker, Verviers, Belgien
NH ₄ -Puffer	Invitek (IBL Martin, Wien)
OFA	Pharmacia Biotech, Freiburg
Penicillin	Serva, Heidelberg
Phenol	Roth, Karlsruhe
Rinderserumalbumin (BSA)	Promega, Heidelberg
RPMI-1640 – Pulver	Bio Whittaker, Verviers, Belgien
Saccharose	Serva, Heidelberg
SAM	New England Biolabs, Frankfurt a. Main
Salpetersäure (32%)	Merck, Darmstadt
Silbernitrat	Promega, Heidelberg
Sodium-Bisulphit	Sigma, Steinheim
Streptomycin	Serva, Heidelberg
Tris (hydroxymethyl) aminomethan	Roth, Karlsruhe
Tris (hydroxymethyl) aminomethan–HCl	Serva, Heidelberg
Trypsin	Serva, Heidelberg
Tween [®] 20	Serva, Heidelberg
Xylencyanol	Serva, Heidelberg
Xylol	Merck, Darmstadt
Zellkulturmedium RPMI-1640 (mit 25 mM Hapes, L – Glutamin)	Bio Whittaker, Verviers, Belgien
Zitronensäure	Serva, Heidelberg

2.3. Enzyme

Proteinase K	Serva, Heidelberg
CpG-Methylase (4U/μl)	New England Biolabs, Frankfurt a. Main
Expand High Fidelity PCR-System	Roche, Mannheim
HotStarTaq [®] DNA Polymerase	Qiagen, Hilden
Taq DNA Polymerase	Promega, Heidelberg
TdT	Amersham, Freiburg

2.4. „Kits“

Human Total Survivin ELISA	R&D Systems, Wiesbaden-Nordenstadt
IMUBIND® Tissue PAI-1 ELISA Kit	american diagnostica inc., Stamford (CT)
IMUBIND® uPA ELISA Kit	american diagnostica inc., Stamford (CT)
IMUBIND® uPAR ELISA Kit	american diagnostica inc., Stamford (CT)
New Fuchsin – Kit	Dako, Hamburg
Wizard® DNA Clean-Up System	Promega, Heidelberg
HLA-Typisierungssset (Italia-ABC 144)	Biotest AG, Dreieich
HLA Klasse II-Primerkits (HLA-DRB/-DQB1)	BAG, Lich
HLA Klasse II-Primerkits (HLA-DRB1, -DRB3, -DRB4, -DRB5, -DQB1)	Dynal Biotech, Hamburg

2.5. Geräte und Verbrauchsmaterialien

10ml / 50ml Röhrchen	Greiner, Nürtingen
autoMACS – Gerät	Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach
BioDocAnalyzer	Biometra, Göttingen
Dynal MPC®-9600	Dynal Biotech, Hamburg
Eppendorf Concentrator 5301	Eppendorf, Hamburg
Hybridisierungsöfen	Biometra, Göttingen
Laminarbox	Flow Laboratories, Meckenheim
Mikroskop (Axiophot)	Zeiss, Jena
Mikrotom	Leica, Nussloch
Peltier ThermalCycler PT200	MJ Reasearch (Biozym, Hess. Oldendorf)
Pipettenspitzen 10 µl / 100 µl / 1000 µl	Greiner, Nürtingen
Reaktionsgefäße 0,2ml / 0,5ml / 1,5ml / 2,0ml	Eppendorf, Hamburg
Roller RM5	Schütt Labortechnik, Göttingen
Sequi – Gen Gelkammer System	BioRad, München
Starfrost-Objektträger	Medite Medizintechnik, Burgdorf
Thermomixer 5436	Eppendorf, Hamburg
Trioblock™ - Thermozykler mit Heizdeckel	Biometra, Göttingen
Ultrospec III®	Pharmacia Biotech, Freiburg
Universalzentrifuge 30 RF	Hettich, Tuttingen
Zellkulturflaschen	Greiner, Nürtingen

2.6. Puffer und Lösungen

DNA – Auftragspuffer:

Ficoll 400	1,8 g
Bromphenolblau	25 mg
Xylencyanol	25 mg
→ mit Aqua bidest. auf 10 ml auffüllen	

PBS:

NaCl	8,0 g
KCl	0,2 g
Na ₂ HPO ₄ *2H ₂ O	1,15 g
KH ₂ PO ₄	0,2 g
→ mit Aqua bidest. auf 1 l auffüllen	

PBS zur Zellzucht:

NaCl	8,0 g
KCl	0,4 g
NaHCO ₃	0,35 g
D – Glucose	1,0 g
→ mit Aqua bidest. auf 1 l auffüllen	

RPMI

RPMI-1640 – Pulver	16,4 g
FKS	8 - 10 %
→ mit Aqua bidest. auf 1 l auffüllen	

Trypsin – Lösung:

EDTA	0,2 g
Trypsin	0,5 g
→ in 1 l PBS zur Zellzucht lösen	

Zellkulturmedium:

RPMI-1640 – Medium	500 ml
Antibiotikum (Penicillin, Streptomycin)	10 ml
FKS	80 ml
Na – Pyruvat	5 ml

3. Methoden

3.1. Zellzucht

Die Anzucht aller Karzinom-Zelllinien erfolgte in Zellkulturmedium mit Antibiotikum (Kap. 2.6.) bei 37°C, 5% (v/v) CO₂ und maximaler Luftfeuchtigkeit in sterilen 25 ml Zellkulturflaschen.

Die Passagierung konfluenter Zellen erfolgte im Verhältnis 1:2. Dafür wurde das Medium abgesaugt und mit 3 ml PBS (Kap. 2.6.) gespült. Durch Zugabe von 3 ml Trypsin (Kap.2.6.) und einer Inkubation für 5 min bei 37°C lösten sich die Zellen. Diese wurden in 4 ml RPMI aufgenommen und zentrifugiert (5 min, 1.000 U/min). Nach dem Absaugen des Überstandes erfolgte die Resuspension in Kulturmedium.

Zur Kryokonservierung wurden die Zellen nach Trypsinierung in 1,8 ml Einfriermedium aufgenommen (Zellkulturmedium mit 20% DMSO) und in 2 ml Gefrier Röhrchen überführt. Die Lagerung erfolgte für 24 h bei –20°C, 24 h bei –80°C und anschließend bis zur weiteren Verwendung in flüssigen Stickstoff.

Zum Auftauen der Zellen wurde der Inhalt eines Gefrier Röhrchens rasch bei 37°C aufgetaut und in ein Zentrifugen Röhrchen mit 20 ml RPMI überführt. Das nach Zentrifugation (1000 U/min; 5 min) erhaltene Zellpellet wurde in RPMI aufgenommen und erneut zentrifugiert, um das DMSO so weit wie möglich zu entfernen. Das Pellet wurde in 3 ml Kulturmedium resuspendiert und in eine Zellkulturflasche überführt.

3.2. DNA – Präparationen

3.2.1. DNA – Isolation aus Zellkulturen

Die Isolierung von DNA aus Zellkulturen erfolgte durch ein modifiziertes Protokoll nach Wright and Manos (1990). Die Zelllinien wurden in 25 ml Kulturflaschen für ca. 2-3 Tage angezüchtet (abhängig von der Wachstumsgeschwindigkeit der jeweiligen Zelllinie). Die Wachstumskontrolle erfolgte regelmäßig unter einem Mikroskop. War der Boden der Kulturflaschen durchgehend von Zellen bedeckt so konnte die DNA-Isolation nach folgenden Schritten durchgeführt werden:

- Zellen mit PBS waschen, 3 ml Trypsin zugeben und 5 min bei 37°C inkubieren
- Lösung mit 4 ml RPMI abstoppen und 5 min bei 1000U/min zentrifugieren
- Überstand verwerfen und Pellet nochmals mit PBS waschen, wieder zentrifugieren
- Pellet in 360 µl Verdau puffer (Wright / Manos) resuspendieren,
- 40 µl Proteinase K (2 mg/ml) zugeben, Verdau bei 37 °C über Nacht

- in einem Zentrifugenröhrchen 1 ml Aqua bidest., 4 ml Phenol und das Verdauprodukt vereinen, gut mischen und 10 min bei 4000 U/min zentrifugieren
- Oberphase vorsichtig abnehmen und in ein neues Zentrifugenröhrchen geben, den Phenolschritt eventuell wiederholen
- zur Oberphase 2 ml Phenol und 2 ml Chloroform – Isoamylalkohol (49 : 1) geben
- gut schwenken und 10 min bei 4000 U/min zentrifugieren
- Oberphase vorsichtig abnehmen, den Schritt eventuell wiederholen
- nun zur Oberphase 4 ml Chloroform – Isoamylalkohol geben
- gut schwenken und 10 min bei 4000 U/min zentrifugieren
- Oberphase vorsichtig abnehmen, den Schritt eventuell wiederholen
- zur Oberphase 50 µl 6M NaCl und 1 Volumen Isopropanol geben, auf 1,5 ml Reaktionsgefäße aufteilen und die DNA über Nacht bei –20°C fällen
- 15 min bei 12.000 U/min / 4°C zentrifugieren, Überstand abgießen
- Pellet mit 1 ml Ethanol (70%) waschen, Pellet schwimmt
- 10 min bei 7.500 U/min / 4°C zentrifugieren, Waschschrift wiederholen
- Pellet 15 min unter Vakuum trocknen
- Pellet in 50 µl Aqua bidest. lösen

Verdaupuffer (Wright / Manos):	Tris pH 8,5	50 mM
	EDTA	1 mM
	Tween® 20	0,5 %

3.2.2. DNA – Isolation aus Gefriermaterial

Die Isolation von DNA aus Gefriermaterial wurde anhand des folgenden Methodenprotokolls durchgeführt:

- Aufbringen der Gefrierproben auf Korkplättchen
- mit dem Kryostat 10 – 20 Schnitte (je nach Schnittfläche) á 50 µm anfertigen
- die Schnitte direkt in 1 ml Extraktionspuffer geben und 30 min bei 65°C inkubieren
- nach Abkühlung auf 37°C, 8 µl RNase (10µg/ml, DNase frei) zugeben und 30 min bei 37°C inkubieren
- 40 µl Proteinase K (2 mg/ml) und 400 µl Proteinase K-Puffer zugeben, über Nacht bei 37°C verdauen
- Lösung mit 2 ml Chloroform und 2 ml Phenol ausschütteln, 10 min bei 7000 U/min zentrifugieren
- Oberphase vorsichtig abnehmen, den Schritt eventuell wiederholen
- den Überstand dreimal mit 2 ml Chloroform ausschütteln und jeweils 5 min bei 10.000 U/min zentrifugieren

- zum Überstand 1/10 Volumen 3M NaCl und 2,5 Volumen Ethanol (96%, -20°C) geben, schwenken und bei 11.000 U/min / 4°C 10 min zentrifugieren
- Pellet zweimal mit 1 ml 70%igen Ethanol (-20°C) waschen, bei 11.000 U/min / 4°C 10 min zentrifugieren
- Pellet unter Vakuum trocknen und in 50 µl Aqua bidest. aufnehmen

Extraktionspuffer:	Saccharose	200 mM
	Tris (pH 9,2)	100 mM
	NaCl	100 mM
	EDTA (pH 8,0)	50 mM
	SDS-Lösung	0,5 %

Proteinase K – Puffer:	Tris – HCl (pH 7,6)	100 mM
	EDTA (pH 8,0)	50 mM
	SDS –Lösung	5 %

3.2.3 DNA – Isolation aus Paraffinmaterial

Das Protokoll kombiniert die Verfahren der Entparaffinierung von Gewebeschnitten, Proteinase-Verdau der Proteine und Isopropanol-Präzipitation genomischer DNA-Fragmente.

Entparaffinierung

- mit dem Mikrotom 4 Schnitte à 25 µm, oder 20 Schnitte à 5 µm anfertigen
- 1 ml Xylol zu den Schnitten geben und 10 min bei Raumtemperatur inkubieren, 5 min bei 13.000 U/min zentrifugieren, den Schritt wiederholen
- 1 ml 96%igen Ethanol zugeben, 10 min bei Raumtemperatur inkubieren, 5 min bei 13.000 U/min zentrifugieren, den Schritt wiederholen
- Pellet bei 60°C im Eppendorf-Concentrator trocknen

Proteinase K-Verdau

- 1 ml Extraktionspuffer und 30 µl Proteinase K (10 mg/ml) auf das Pellet geben, bei 55°C über Nacht inkubieren
- am nächsten Tag nochmalige Zugabe von 20 µl Proteinase K, über Nacht bei 55°C inkubieren, diesen Schritt am 3. Tag wiederholen.
- Am 4. Tag den Verdauansatz auf 2 Reaktionsgefäße verteilen

DNA-Extraktion

- Lösung mit 250 µl Phenol und 250 µl Chloroform – Isoamylalkohol ausschütteln, 10 min bei Raumtemperatur inkubieren und für 5 min bei 13.000 U/min zentrifugieren
- Den Überstand mit 500 µl Chloroform – Isoamylalkohol ausschütteln, 10 min bei Raumtemperatur inkubieren und für 5 min bei 13.000 U/min zentrifugieren
- Zum Überstand 1 Volumen 96%igen Ethanol und 50 µl 6M NaCl geben, DNA bei -20°C über Nacht fällen
- Bei 12.000 U/min / 4°C 10 min zentrifugieren
- Pellet mit 1 ml 70%igen Ethanol waschen, bei 7.500 U/min 5 min zentrifugieren
- Pellet im Eppendorf-Concentrator trocknen und in 50 µl Aqua bidest. aufnehmen

DNA – Extraktionspuffer:	NaCl	100 mM
	EDTA (pH 8,0)	25 mM
	Tris – HCl (pH 8,0)	10 mM
	SDS	0,5 %

3.2.4 Quantifizierung der DNA mittels Photometrie

Die DNA-Konzentration wurde photometrisch bestimmt. Dazu wurden die DNA-Proben mit Aqua bidest. verdünnt (1:50). Durch Messung der Absorption bei 260 nm und Multiplikation des Absorptionswertes mit einem zugeordneten Richtwert konnte die Konzentration errechnet werden. Es wurde folgender Richtwert zugrunde gelegt (Maniatis et al. 1989):

1 OD_{260nm} entspricht 50 µg/ml DNA. Eine Aussage über die Qualität der DNA-Präparation in Bezug auf Protein- und/oder Phenolverunreinigungen erfolgte an Hand des Quotienten aus den Absorptionswerten bei 260 nm und 280 nm, der bei hoher Reinheit zwischen 1,8 und 2,0 liegt.

3.3. MACS – Methodenprotokoll zum Nachweis disseminierter Tumorzellen in peripherem Blut

Die Isolation der DTZ erfolgte mittels Negativselektion auf einem *autoMACS*-Gerät der Firma Miltenyi (Abb. 3-1). Zuerst wurden aus Vollblut mittels Biocoll-Gradienten die Erythrozyten abgetrennt. Im nächsten Schritt sind die Leukozyten in der Blutprobe stark verringert (depletiert) worden. Die Leukozyten besitzen auf ihrer Zelloberfläche CD45 Oberflächenantigene. Durch den Einsatz von CD45 Microbeads – 5 nm große Kügelchen, die CD45 Antikörper und kleine Eisenpartikel tragen – können Leukozyten am MACS-Gerät auf einer Magnetsäule (positive Fraktion) festgehalten werden (Siehe 3.3.1.). Das Eluat enthält die nicht markierten angereicherten Tumorzellen (negative Fraktion). Die Tumorzellen aus einer Blutprobe können per Zytopspin auf einen Objektträger konzentriert aufgebracht und immunhistochemisch charakterisiert werden (Siehe 3.3.2.).

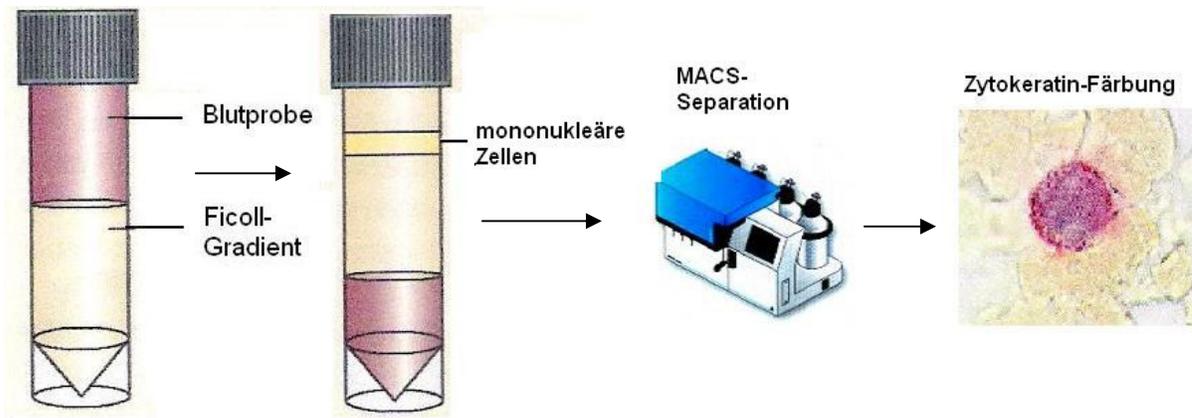


Abb. 3 – 1 Isolation der Tumorzellen aus dem peripheren Blut und Anfärbung des Zytoplasmas. Für die Isolation der zirkulierenden Tumorzellen wurde das Blut der Patienten vorsichtig über einen Ficoll-Gradienten geschichtet. Nach der Zentrifugation erfolgte die Gewinnung der mononukleären Phase mit den Leukozyten und eventuellen Tumorzellen. Anschließend sind ein Großteil der Lymphozyten mit CD45-Microbeads über eine magnetisch-aktivierte Zellsortierung (MACS) entfernt und die Tumorzellen über Anfärbung von Zytokeratinen im Zytoplasma nachgewiesen worden.

3.3.1. MACS – Separation

Die DTZ sind nach folgendem Methodenprotokoll am *autoMACS*-Gerät der Firma Miltenyi isoliert worden:

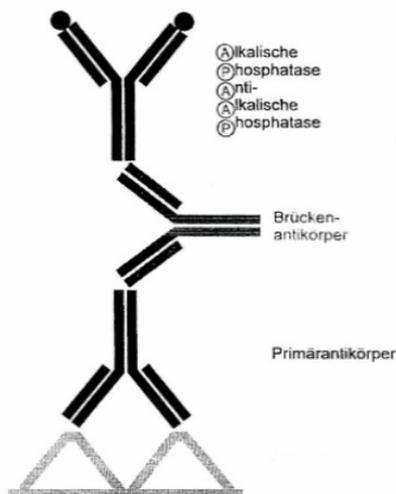
- 2 x 8 ml EDTA – Blut auf 25 ml mit FACS Flow™ auffüllen und mischen
- 20 ml vorgelegtes Biocoll mit dem verdünnten Blut vorsichtig überschichten und für 20 min bei 2.000 U/min zentrifugieren (20°C, ohne Bremse!)
- Interphase vorsichtig abnehmen (ca. 5 ml) und in ein neues 50 ml Röhrchen überführen, mit FACS Flow™ auf 50 ml auffüllen
- Zentrifugation für 8 min bei 1.700 U/min (4°C)
- Resuspension des Pellets in 60 µl FACS Flow™, Überführung in ein 2,0 ml Reaktionsgefäß
- Zugabe von 40 µl CD45 Microbeads (Miltenyi Biotech), vorsichtig mischen und 15 min bei 4-8°C inkubieren
- Abstoppen mit 800 µl kaltem FACS Flow™
- Separation am *autoMACS* mit Deplete S – Programm, zweimal mit 250 µl FACS Flow™ nachspülen, bevor letzte Flüssigkeit aufgesogen wird
- Auffangen der Negativ – Fraktion, Zentrifugation auf Objektträger für 5 min bei 1.650 U/min, Lagerung der Präparate bei 4°C bis zur immunhistochemischen Färbung

3.3.2. Immunhistochemische Färbung

Die Tumorzellen wurden immunhistochemisch identifiziert. Es erfolgte der immunhistochemische Nachweis der Zytokeratine (CK) 8 und 18, welche in den epithelialen Tumorzellen, aber nicht in den mesenchymalen Leukozyten vorkommen. Hierbei kommt es zur Bindung eines unkonjugierten Antikörpers an das Antigen im Präparat. Bei der verwendeten APAAP-Methode (Abb. 3-2) kam ein Enzym-Anti-Enzymkomplex zum Einsatz. Als Enzym wurde die alkalische Phosphatase eingesetzt. Die Katalysatorwirkung von Enzymen wurde ausgenutzt, um die Antikörperbindung an spezifische Antigene nachzuweisen. Alkalische Phosphatase hydrolysiert Naphtholphosphatester (Substrat) zu Phenolkomponenten und Phosphaten. Die Phenole koppeln mit farblosen Diazoniumsalzen (Chromogene) und bilden so unlösliche Azofarbstoffe. Es wurde New Fuchsin verwendet, welches ein rotes Reaktionsprodukt liefert. Die entstehende Farbe ist nicht in Alkohol oder anderen organischen Lösungsmitteln lösbar (Storjohann 1998).

Durchführung der immunhistochemischen Färbung:

- Fixierung der Präparate in 3%iger Formaldehydlösung für 3 min
- Objektträger mit Leitungswasser spülen
- ca. 6-7 min mit Tris-Lösung spülen
- 100 µl Primärantikörper-Lösung CK 8/18 (1: 50 verdünnt in RPMI [Kap. 2.6.]) auf die Präparate geben und 1 Stunde inkubieren
- nach der Inkubation 7 min mit Tris-Lösung spülen
- 30 min Inkubation mit Brücken-Antikörper (1 : 100 verdünnt in RPMI)
- 7 minütiges Spülen mit Tris-Lösung
- Inkubation für 60 min mit APAAP (1 : 100 verdünnt mit RPMI)
- Objektträger mit PBS (Kap. 2.6.) spülen
- Färbung der Präparate mittels New Fuchsin – Kit
- In Aqua bidest. spülen und 1 min mit Hämalaun gegenfärben
- gründlich mit Wasser spülen
- Nach dem Trocknen mit Glyzeringelatine und Deckgläschen eindecken



Hämalaun	Hämatoxylin	2,5 g
	KJO ₃ oder NaJO ₃	500 mg
	Kalialaun	125 g
	Chloralhydrat	125 g
	→ auf 2,5 l mit Aqua bidest. auffüllen nach 24 h 2,5 g Zitronensäure zufügen	

Abb. 3 – 2

Immunhistochemische Färbung mittels APAAP-Methode.

3.4. Isolation und Amplifizierung der DNA der disseminierten Tumorzellen

3.4.1. DNA – Isolation aus wenigen Zellen

Nach der Anreicherung der DTZ aus dem Blut der Karzinompatienten befanden sich diese auf einem Objektträger. Die Auswertung der Präparate erfolgte mikroskopisch. Zur Isolierung der Tumorzellen mussten die Deckgläschen und das Eindeckmedium (Glyzeringelatine) in einem ca. 60°C warmen Wasserbad entfernt werden. Die Tumorzellen lösten sich bei dieser Methode nicht von den Objektträgern, so dass sie nach dem vollständigen Trocknen der Präparate am Mikroskop isoliert werden konnten. Die Zellen wurden mit einer Injektionskanüle von den Objektträgern gekratzt und in 2 µl Aqua bidest. aufgenommen. Auf einem weiteren Objektträger wurden diese Zellen noch einmal separiert, um Kontaminationen mit Leukozyten weitgehend zu vermeiden. Die Anzahl der isolierten Tumorzellen variierten von einer Zelle bis vier Zellen pro Patient (anhängig von der Gesamtzahl an DTZ, die ein Patient in 16 ml Blut aufwies).

Die isolierten Zellen wurden in 7 µl Verdaupuffer (Wright / Manos [Vgl. Kap. 3.2.1.]) aufgenommen und nach Zugabe von 3 µl Proteinase K (20 mg/ml) bei 50°C mit leichtem Schütteln über Nacht verdaut. Nach vollständigem Verdau wurde die PK bei 94°C für 15 min inaktiviert.

3.4.2. I-PEP – PCR

Die I-PEP-PCR ermöglicht die Amplifizierung des gesamten Genoms weniger Zellen. Sie wurde nach einem modifizierten Protokoll nach Dietmaier et al. (1999) durchgeführt. Anwendung fanden hier 15-mer Zufallsprimer, die von der Firma MWG-Biotech (Ebersberg) synthetisiert wurden. Weiterhin wurde für diese PCR das „Expand High Fidelity PCR System“ der Firma Roche verwendet. In Tabelle 3-1 ist der Ansatz für eine Probe dargestellt.

1x Ansatz I-PEP – PCR	
DNA (aus PK – Verdau)	10 µl
Aqua bidest.	5 µl
Puffer 3 (Expand High Fidelity PCR-System)	2 µl
MgCl ₂ (25 mM)	2 µl
dNTP's (25 mM)	2 µl
I-PEP – Primer (16 pmol/µl)	2 µl
DMSO	1 µl
Taq – Polymerase (3,5 U/µl)	1 µl

Tab. 3 – 1 *Angaben über die eingesetzten Volumina für einen I-PEP – PCR-Ansatz.*

Die PCR – Reaktion erfolgte nach folgendem Programm in einem Thermocycler:

50 x						
94°C 1 min	37°C 2 min	37°C bis 55°C mit 0,1°C / sek	55°C 4 min	68°C 30 sek	4°C ∞	

3.5. LOH- und Mikrosatellitenanalysen

3.5.1. PCR – Reaktion

Die aus Tumor- und autologen Normalgewebeproben isolierte DNA der NZK-Patienten und MMK-Patientinnen wurde durch eine PCR-Reaktion amplifiziert. Die Auswahl der Mikrosatellitenprimer umfasste ein möglichst weites Spektrum an ausgewählten Gensequenzen.

Alle nachfolgend aufgeführten Oligonukleotide stellten die Firmen Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg) und Tibmolbiol (Berlin) her und reinigten sie über Gelfiltration. Tabelle 3-2 führt die Oligonukleotide auf, die für LOH- und Mikrosatellitenanalysen verwendet wurden.

Name	Sequenz 5' → 3'	Locus	Referenz
P53 Alu – SE	5'-GCA CTT TCC TCA ACT CTA CA-3'	17p13	Futreal et al. (1991)
P53 Alu – AS	5'-AAC AGC TCC TTT AAT GGC AG-3'	17p13	Futreal et al. (1991)
RB 3 – SE	5'-CTC CTC CCT ACT TAC TTG T-3'	13q14	Huang et al. (1992)
RB 4 – AS	5'-AAT TAA CAA GGT GTG GTG G-3'	13q14	Huang et al. (1992)
Myc-L 1 – SE	5'-CTT TTT AAG CTG CAA CAA TTT C-3'	1p32	Makela et al. (1992)
Myc-L 1 – AS	5'-TGG CGA GAC TCC ATC AAA G-3'	1p32	Makela et al. (1992)
RH 66312 – SE	5'-AGA AAG GGG AAG GAA ATG G-3'	3p21.3	UniSTS:11207
RH 66312 – AS	5'-GAT TTG CCC CTC CAT GTA G-3'	3p21.3	UniSTS:11207
RH 91127 – SE	5'-ATT CTC TCA GGC CCC AGG-3'	3p21.3	UniSTS:86003
RH 91127 – AS	5'-GTC TGT GTG AAT GTG GGC AC-3'	3p21.3	UniSTS:86003
D3S3118 – SE	5'-GCAGGATCTACAAATCATTTTATT G-3'	3p21.3	UniSTS:47615
D3S3118 – AS	5'-TGTGAAGTTTTGTAAATAGTCCATG-3'	3p21.3	UniSTS:47615
N24898 – SE	5'-TCC TCA ATG GAA GCC ACA C-3'	3p21.3	UniSTS:66881
N24898 – AS	5'-TCA GGG CAT CGT GAA GC-3'	3p21.3	UniSTS:66881
WI-19554 – SE	5'-GAG AAA GGG GAA GGA AAT GG-3'	3p21.3	UniSTS:43806
WI-19554 – AS	5'-GTC CTC ACC AGC TTG GTC AT-3'	3p21.3	UniSTS:43806

Tab. 3 – 2 Oligonukleotide, die für LOH- und Mikrosatellitenanalysen eingesetzt wurden.
(UniSTS: www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/sts/sts.cgi)

Für einen PCR-Ansatz von 50 µl wurde ca. 100 ng genomische DNA eingesetzt. Die Zusammensetzung für einen 50 µl Ansatz ist in der Tabelle 3-3 dargestellt.

1x PCR – Reaktionsansatz	
Aqua bidest.	18,5 µl
Q – solution	10,0 µl
10x Reaktionspuffer (mit 15 mM MgCl ₂)	5,0 µl
MgCl ₂ (25 mM)	2,0 µl
dNTP´s (2,5 mM)	4,0 µl
Primer SE (10 pmol/µl)	2,5 µl
Primer AS (10 pmol/µl)	2,5 µl
Taq – Polymerase (5 U/µl)	0,5 µl
DNA (ca. 20 ng/µl)	5,0 µl

Tab. 3 – 3 Reaktionsansatz für eine PCR mit 100 ng DNA für MSI- und LOH-Analysen.

Die folgende Tabelle 3-4 führt die spezifische Primeranlagerungs-Temperatur der Oligonukleotide auf. Weiterhin ist ihr die Größe der PCR-Produkte zu entnehmen.

Oligonukleotide	Primeranlagerung	PCR – Produktgröße
P53 Alu	62 °C	400 bp
RB	58 °C	260 – 300 bp
Myc – L	53 °C	140 – 209 bp
RH 66312	61 °C	159 bp
RH 91127	61 °C	187 bp
D3S3118	61 °C	195 bp
N24898	61 °C	152 bp
WI-19554	61 °C	258 bp

Tab. 3 – 4 Primeranlagerungs-Temperaturen der verwendeten Oligonukleotide und ihre PCR-Produktgröße.

Die Amplifizierung der DNA erfolgte nach folgendem Temperaturprofil. Die einzelnen Profile der verschiedenen Oligonukleotide unterschieden sich nur in der spezifischen Temperatur der Primeranlagerung (Tabelle 3-4). Als Beispiel soll hier die PCR für p53Alu exemplarisch dargestellt werden (Temperatur für Primeranlagerung: 62 °C).

1 x		40 x		1 x			
		Denaturierung:	94 °C 1 min				
94 °C	5 min	Primeranlagerung:	62 °C 1 min	72 °C	8 min	4 °C	∞
		Synthese:	72 °C 1 min				

3.5.2. Agarose – Gelelektrophorese

Die Amplifizierung der DNA mittels PCR wurde durch elektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte überprüft. In Abhängigkeit von der zu erwartenden Fragmentlänge erfolgte die Auftrennung in 1–2%igen Agarosegelen (versetzt mit 5 µl Ethidiumbromid [10 mg/l] auf 100 ml Agarose – 0,5x TBE – Lösung). Die Auftragungsmenge auf das Gel betrug jeweils 5 µl des PCR-Produktes plus 1,5 µl DNA-Auftragspuffer. Die Auftrennung erfolgte bei ca. 75 Volt. Die Banden wurden nach dem Gellauf unter UV-Licht sichtbar gemacht. DNA-Längenstandards dienten der Größenbestimmung der DNA-Fragmente.

TBE – Puffer (10x):	Tris – HCl	108 g
	Borsäure	55 g
	EDTA 0,5 M (pH 8,0)	20 ml
	→ mit Aqua bidest. auf 1 l auffüllen	

3.5.3. Polyacrylamid – Gelelektrophorese

Die Analyse von LOH- und Mikrosatelliteninstabilitäten erfolgte durch die Auftrennung der PCR-Produkte in einem 6,7- bzw. 8%igem Polyacrylamidgel (29:1) mit anschließender Silberfärbung.

Probenvorbereitung:

Zwischen 14 und 25 µl der PCR-Produkte wurden in 100 µl Isopropanol bei –20°C über Nacht gefällt. Das Volumen an zu fällendem PCR-Produkt richtete sich nach der Konzentration der amplifizierten DNA. Die Beurteilung erfolgte in einem Agarosegel. Nach der Fällung wurden die Proben bei 4°C / 15.000 U/min für 30 min zentrifugiert. Das Pellet wurde nach dem Trocknen in 8 µl denaturierendem Auftragspuffer aufgenommen.

Gellauf:

Vor dem Zusammenbau der Gelkammer sind die Platten, „Spacer“ und Kämmen intensiv mit 70%igem Ethanol gereinigt worden. Um ein späteres Ablösen des Gels zu erleichtern, wurde die Pufferkammer mit BlueSlick behandelt. Die Gelkammer wurde entsprechend der Herstellerangaben zusammengesetzt.

Unmittelbar vor dem Gießen wurden ca. 80 ml steril filtrierte Polyacrylamid – Stammlösung mit 1 ml APS (50 mg/ml) versetzt und 3 ml 10%iges TEMED (v/v) hinzugefügt. Die Gellösung wurde dann zügig in die Gelkammer gegossen und nach Polymerisation des Gels erfolgte der Vorlauf bei 100 Watt, um das Gel auf ca. 50°C zu erhitzen. Der Gellauf wurde in 1x TBE-Puffer (Vgl. Kap. 3.5.2.) durchgeführt.

Die in 8 µl Auftragspuffer aufgenommenen PCR-Produkte wurden unmittelbar vor dem Auftragen bei 94°C denaturiert und heiß auf das Gel aufgetragen. Der Gellauf erfolgte bei ca.

87 Watt. Die Geltemperatur lag bei ca. 50°C. Die Laufzeit richtete sich nach der Länge der zu untersuchenden PCR-Produkte und lag zwischen 150 und 210 min.

Auftragspuffer:	Formamid	10 ml
	Xylencyanol	10 mg
	Bromphenolblau	10 mg
	EDTA (0,5 M; pH 8,0)	200 µl

Polyacrylamid – Stammlösung:	6,7%ig	8%ig	
	Harnstoff	226,8 g	226,8 g
	10 x TBE	54 ml	54 ml
	Acrylamid/Bisacrylamid (29:1) 30%ig	90 ml	107,5 ml
	Aqua bidest.	216 ml	216 ml

3.5.4. Silberfärbung

Nach Beendigung des Gellaufs wurde die Pufferkammer vorsichtig vom Gel gelöst und ein Plexiglasrahmen auf die Glasplatte mit dem Gel gespannt. Die Banden wurden mittels Silberfärbung sichtbar gemacht:

- Gel kurz mit Aqua bidest. spülen
- 5 min mit 10%igem Ethanol und 2 x mit Aqua bidest. spülen
- 3 min mit 1%iger Salpetersäure (15 ml 65% Salpetersäure auf 1 Liter Aqua bidest.) inkubieren, 2 x mit Aqua bidest. spülen
- 20 min abgedeckt mit 0,2% Silbernitrat färben (1 g Silbernitrat auf 1 Liter Aqua bidest.)
- zum Entwickeln mit Natriumcarbonat-Formalin-Lösung spülen, Lösung mehrmals wechseln (59,4 g Natriumcarbonat und 2 ml 37% Formalin auf 2 Liter Aqua bidest.)
- zum Abstoppen 2 min mit 10%iger Essigsäure spülen, 2 min Aqua bidest.

Nach Beendigung der Färbung wurde das Gel auf Filterpapier übertragen, mit Folie abgedeckt und unter Vakuum bei 75°C für eine Stunde getrocknet.

3.6. Methylierungsanalysen

TSG können durch eine epigenetische Veränderung in Form von Methylierung der Promotorregion inaktiviert werden. Diese Inaktivierung von Genen kann durch Methylierungsanalysen nachgewiesen werden. Hierfür wurde die zu untersuchende DNA mit Bisulphit behandelt. Nichtmethylierte Cytosine wurden dadurch in Uracil umgewandelt, was zu einer Sequenzänderung führte. Durch Auswahl spezifischer Primersequenzen konnte nun

in einer anschließenden PCR bestimmt werden, ob die DNA methyliert war und damit das Gen inaktiv oder keine Methylierung vorhanden war. Untersucht wurden die Promotorregionen der Gene *RASSF1A* („ras association domain family 1A“), *rar-β* („retinoic acid receptor – β“), *p16*, *FHIT* („fragile histidine triad“) und *VHL* (von Hippel-Lindau). Die Methylierungsanalysen wurden anhand von Protokollen der AG Tumorgenetik von Dr. Dammann (Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg) durchgeführt.

3.6.1. *In vitro*-DNA-Methylierung

Die *in vitro*-DNA-Methylierung dient der Herstellung von Kontrollen, damit die Ausgangsmengen für die Bisulphit-Behandlungen übereinstimmen und methylierte und unmethylierte DNA zur Verfügung steht (Tab. 3-5). Die Kontroll-DNA wurde aus Leukozyten gesunder Spender isoliert.

	Positivkontrolle (methyliert)	Negativkontrolle (unmethyliert)
DNA (20 µg)	x µl	x µl
Puffer 2	10 µl	
SAM 200x	1 µl	
CpG – Methylase (4U/µl)	15 µl	
TE-Puffer	ad 200 µl	ad 200 µl

Tab. 3–5 *Reaktionsansatz für die in vitro DNA-Methylierung.*

- beide Reaktionsgefäße im Wasserbad bei 37°C inkubieren
- am Anfang der Reaktion nach 1 h 1 µl SAM zusätzlich zur Positivkontrolle geben, da sich dieses sehr schnell verbraucht
- am nächsten Tag Zugabe von jeweils 100 µl TE-Puffer (Volumenerhöhung auf 300 µl)
- 300 µl Chloroform/Phenol (1:1) zur Probe geben und kräftig ausschütteln, Zentrifugation für 3 min bei 13.000 U/min
- zum Überstand 300 µl Chloroform geben, kräftig ausschütteln, Zentrifugation für 3 min bei 13.000 U/min
- zum Überstand 30 µl 3M NaAc (pH 5,2) und 750 µl 100%igen Ethanol geben, DNA 5 min bei -20°C fällen, 10 min bei 13.000 U/min zentrifugieren
- Pellet mit 100 µl 75%igen Ethanol waschen, 3 min bei 13.000 U/min zentrifugieren
- Pellet trocknen und in 40 µl TE-Puffer aufnehmen

3.6.2. Bisulphit-Behandlung der DNA

Die isolierte DNA aus den Patientenproben (Gefrier- und Paraffingewebe) wurden nach folgendem Methodenprotokoll mit Bisulphit behandelt. Als Kontrollen dienten die in vitro-methylierten Proben (Positiv- und Negativkontrolle). Die Bisulphit-Behandlung der DNA führt zur Deaminierung von Cytosin zu Uracil (Abb. 3-3):

- 2 – 3 µg DNA und 2 µl 3M NaOH mit TE-Puffer auf 20 µl auffüllen
- die Ansätze 15 min bei 37°C im Wasserbad inkubieren
- Zugabe von 208 µl 3,6M Natrium-Bisulphit Lösung und 12 µl 0,1M Hydrochinon-Lösung
- Inkubation der Proben für 16 – 18 h bei 55°C im Wasserbad
- DNA – Reinigung vom Bisulphit mit dem Wizard DNA Clean-Up System von Promega
- Elution der gereinigten DNA in 50 µl Aqua bidest.
- 5 µl 3M NaOH zugeben und die Probe für 10 min bei 37°C im Wasserbad inkubieren
- 55 µl 7,5M Ammoniumacetat und 275 µl 100%igen Ethanol zugeben, DNA für 10 min bei -20°C fällen
- 10 min bei 13.000 U/min zentrifugieren
- Überstand waschen mit 200 µl 75%igen Ethanol, 2 min bei 13.000 U/min zentrifugieren
- Pellet an der Luft trocknen und in 40 µl TE-Puffer aufnehmen

TE – Puffer:

Tris – HCl 10 mM
EDTA 0,5 mM

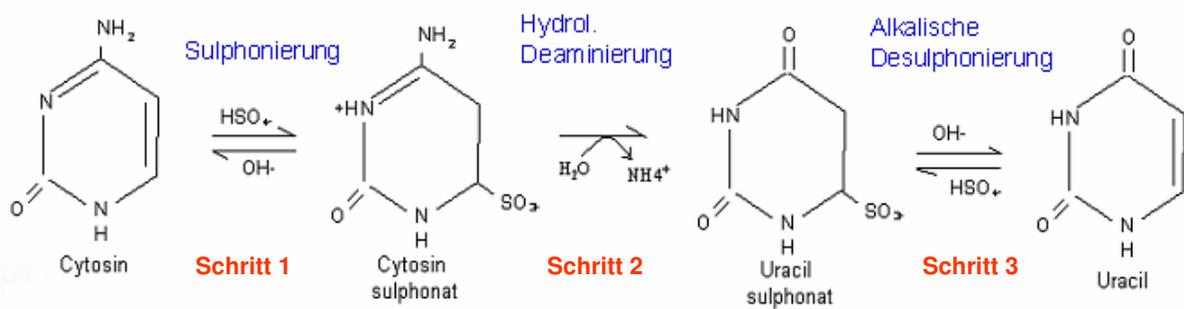


Abb. 3 – 3 Durch Bisulphit-Behandlung der DNA kommt es zur Deaminierung von Cytosin zu Uracil.

3.6.3. Methylierungsspezifische PCR (MSP)

Die aus Tumorgewebe und Normalgewebe isolierte DNA der NZK-Patienten und MMK-Patientinnen wurde nach der Bisulphit-Behandlung in methylierungsspezifischen PCR-Reaktionen amplifiziert. Es wurden verschiedene Gensequenzen mit möglichst vielen CpG-Inseln ausgewählt. Alle nachfolgend aufgeführten Oligonukleotide wurden von den Firmen Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg) und Tibmolbiol (Berlin) hergestellt und über Gelfiltration gereinigt (Tab. 3-6).

Name	Sequenz 5' → 3'	Locus	Referenz
RASSF1-A m ₁	5'-GTG TTA ACG CGT TGC GTA TC-3'		
RASSF1-A m ₂	5'-AAC CCC GCG AAC TAA AAA CGA-3'	3p21.3	Dammann et al.
RASSF1-A u ₁	5'-TTT GGT TGG AGT GTG TTA ATG TG-3'		(2000)
RASSF1-A u ₂	5'-CAA ACC CCA CAA ACT AAA AAC AA-3'		
p16 m ₁	5'-TTA TTA GAG GGT GGG GCG GAT CGC-3'		
p16 m ₂	5'-GAC CCC GAA CCG CGA CCG TAA-3'	9p21	Herman et al.
p16 u ₁	5'-TTA TTA GAG GGT GGG GTG GAT TGT-3'		(1996)
p16 u ₂	5'-CAA CCC CAA ACC ACA ACC ATA A-3'		
rar-β MF	5'-TCG AGA ACG CGA GCG ATT CG-3'		
rar-β MR	5'-GAC CAA TCC AAC CGA AAC GA-3'	3p24	Kuroki et al.
rar-β UF	5'-TTT TGT TTT GTT ATT TTT TGT TTT TGG TTT T-3'		(2003)
rar-β UR	5'-AAC CAA TCC AAC CAA AAC AA-3'		
FHIT m ₁	5'-TTG GGG CGC GGG TTT GGG TTT TTA CGC-3'		
FHIT m ₂	5'-ACC CTC GTA AAA CGA AAA AAT ACT CG-3'	3p14.2	Foja et al.
FHIT u ₁	5'-TGG GGT GTG GGT TTG GGT TTT TAT G-3'		(2005)
FHIT u ₂	5'-CCA CCA CCC CAT AAA CAA CAC CA-3'		

Tab. 3 – 6 Oligonukleotide, die für Methylierungsanalysen eingesetzt wurden.

Für jede PCR kamen 3 µl der Bisulphit-behandelten DNA und 0,5 µl Tag-Polymerase (3,5 U/µl) in folgendem Standard-Ansatz (25 µl Volumen) zum Einsatz: 2,5 µl 10x NH₄-Puffer, 2 µl dNTP's (2,5 mM), 1,5 µl MgCl₂ (25 mM), 0,5 – 1 µl Formamid und 1µl von jedem Primer (10pmol). Es wurde jeweils eine Negativ- (nichtmethylierte DNA) und eine Positivkontrolle (durch *in vitro*-Methylierung methylierte DNA) und eine Wasserprobe (ohne DNA) mitgeführt. Für alle Amplifikationen wurde die Taq-Polymerase erst nach dem Aufheizen der Proben auf 68°C zum Reaktionsansatz gegeben.

Die folgende Tabelle 3-7 führt die spezifische Primeranlagerungs-Temperatur der Oligonukleotide auf. Weiterhin ist ihr die Größe der PCR-Produkte zu entnehmen.

Oligonukleotide	Primeranlagerung	PCR – Produktgröße
RASSF1A – methyliert	60°C	93 bp
RASSF1A – nichtmethyliert	60°C	105 bp
p16 – methyliert	65°C	150 bp
p16 – nichtmethyliert	60°C	151 bp
rar-β – methyliert	57°C	142 bp
rar-β – nichtmethyliert	59°C	163 bp
FHIT – methyliert	63°C	120 bp
FHIT – nichtmethyliert	63°C	85 bp

Tab. 3 – 7 Primeranlagerungs- Temperatur der Oligonukleotide und ihre PCR – Produktgröße.

Die Amplifizierung der DNA erfolgte nach folgendem Temperaturprofil. Die einzelnen Profile der verschiedenen Oligonukleotide unterschieden sich nur in der spezifischen Temperatur der Primeranlagerung (Tab. 3-7). Als Beispiel soll hier die PCR für den *RASSF1A* – Promotor exemplarisch aufgeführt werden (Anlagerungstemperatur 60 °C).

1 x	38 x	1 x	1x	
68°C Hotstart	Denaturierung: 94°C 30 sek	60°C 2 min	72°C 4 min	4°C ∞
	Primeranlagerung: 60°C 45 sek			
	Synthese: 72°C 45 sek			

3.7. Protein – Präparationen

3.7.1. Protein – Isolation aus Gefriergewebe

Die Isolation des Gesamtproteins aus Gefriergewebe erfolgte nach folgendem Protokoll:

- Ca. 15 Kryoschnitte á 50 µm am Mikrotom anfertigen
- 750 µl Extraktionspuffer zu den Schnitten geben, Proben für 30 Sekunden mit UltraTurrax T8 homogenisieren, Probe sollte dabei im Eisbad stehen
- die Homogenate für 4 h bei 4°C auf dem Roller eluieren
- Proben für 15 min / 4°C bei 15.000 U/min zentrifugieren
- Suspension aliquotieren und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C lagern

3.7.2. ELISA für uPAR, uPA, PAI-1 und Survivin

In dieser Arbeit wurden an Gefriermaterial und Seren von NZK- und 36 MMK-Patienten die Konzentration der Proteine uPAR-, uPA-, PAI-1 und Survivin bestimmt. Survivin reguliert die Zellteilung und inhibiert die Apoptose (Ambrosini et al. 1998, Altieri et al. 2006). Es ist ein Mitglied der Inhibitor der Apoptose-Familie (IAP), die aktivierte Caspasen und Zelltodproteasen direkt oder indirekt inhibieren. Es sollte nachgewiesen werden, ob es Unterschiede in der Konzentration zwischen dem Tumorgewebe und dem autologen Normalgewebe gibt. Um Vergleiche zwischen dem Normal- und dem Tumorgewebe durchführen zu können, wurde die Konzentration an Gesamtprotein in den Geweben bestimmt. Die Konzentrationen der Antigene im Gesamtprotein der Gefrierproben ließen sich durch ELISA-Reaktionen bestimmen. Diese wurden in gemeinsamer Arbeit im Labor von Dr. M. Kotzsch (Institut für Pathologie Dresden) nach Herstellerangaben der Firma american diagnostica inc. durchgeführt. Die ELISA-Reaktionen für Survivin erfolgten entsprechend den Angaben der Firma R&D Systems. Die Nachweisgrenze für uPA lag bei 0,020 ng/ml, für

PAI-1 bei 0,050 ng/ml, für uPAR bei 0,020 ng/ml und für Survivin bei 0,060 ng/ml. Die Auswertung der Daten erfolgte, indem die Expressionswerte für das Normalgewebe und das korrespondierende Tumorgewebe von einem Patienten verglichen wurden. Bei einer wesentlichen Erhöhung der Konzentration im Tumorgewebe (> 2fach) wurde dies als Überexpression gewertet.

3.8. HLA – Typisierung

Im Rahmen der Promotionsarbeit wurde auch der HLA-Typ der NZK-Patienten bestimmt. Ziel war es festzustellen, ob ein bestimmter HLA-Typ bevorzugt zur Bildung von NZK führt. Weiterhin sollte untersucht werden, inwieweit spezifische HLA-Merkmale mit dem Auftreten von disseminierten Tumorzellen bzw. Metastasen korrelieren. Die HLA-Typisierungen von 91 NZK-Patienten wurden im HLA-Labor von DM Altermann (Institut für Medizinische Immunologie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg) durchgeführt. Dafür sind standardisierte serologische und molekularbiologische Techniken angewandt worden. Die serologische Bestimmung der HLA Klasse I-Antigene erfolgte mit dem Mikrolymphozytotoxizitätstests (MLCT) der Firma Biotest AG. Nach Gewinnung der Lymphozyten aus dem peripheren Blut der Patienten wurden die Lymphozyten als Träger der HLA-Merkmale mit Anti-HLA-Testseren inkubiert. Die Testseren enthalten zytotoxische Antikörper, die bestimmte Merkmale erkennen und binden können. Kommt es zur Bildung eines Antigen-Antikörper-Komplexes wird auf der Zelloberfläche Komplement aktiviert, was zur Perforation der Zelloberfläche führt (zytotoxische Reaktion). Anschließend wird ein Farbstoff zugegeben, der in die lysierte Zelle eindringen kann und eine positive Farbreaktion auslöst. Tragen die Lymphozyten das HLA-Merkmal nicht, kommt es zu keiner Komplexbildung und die Zelle bleibt intakt (negative Reaktion). Die Bestimmung der HLA Klasse II-Merkmale erfolgte mittels einer SSP-PCR. Dabei werden HLA-Allele über die Bildung sequenzspezifischer PCR-Produkte differenziert. Eine Amplifizierung fand nur statt bei Komplementarität zwischen dem 3'-Ende des Primers und der Zielsequenz. Es wurden also Primer eingesetzt, die entsprechend ihrer Sequenz nur in Anwesenheit bestimmter Allele ein PCR-Produkt bilden. Die Amplifikate konnten anschließend gelelektrophoretisch nachgewiesen werden. Die PCR-Reaktionen wurden mit Primerkits der Firmen BAG (HLA-DRB/-DQB1) und Dynal Biotech (HLA-DRB1, -DRB3, -DRB4, -DRB5, -DQB1) entsprechend den Anleitungen durchgeführt.

3.9. Statistische Auswertungen

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mit dem Softwareprogramm SPSS 12.0 (SPSS inc., Chicago, IL, USA). Als signifikant wurden alle Werte eingestuft, die innerhalb des Wahrscheinlichkeitsintervalls von 5% lagen. Die statistischen Analysen beinhalteten Überlebenszeitanalysen (Kaplan-Meier-Analysen, Cox-Regressionsanalysen), T-Teste, Fisher-Exact-Test, Bonferroni-Ungleichheitsmethode und Chi²-Teste (Kreuztabellen). Die Ergebnisse der Auswertungen wurden mit Frau Dr. Lautenschläger (Institut für Medizinische Epidemiologie, Biometrie und Informatik der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg) besprochen und auf Richtigkeit überprüft.

Die Überlebenszeitanalyse ist eine statistische Analyse, bei der die Zeit bis zu einem bestimmten Ereignis zwischen zwei oder mehr Gruppen verglichen wird, um die Wirkung von prognostischen Faktoren, medizinischer Behandlung oder schädlichen Einflüssen zu schätzen. Das Ereignis kann dabei Tod sein, jedoch auch beliebige andere Endpunkte, wie Heilung, Erkrankung oder Eintreten einer Komplikation. Beispiele für eine solche Analyse sind die Kaplan-Meier-Analyse oder die Cox-Regression (basiert auf dem Konzept der Hazardrate). Mit Hilfe der Kaplan-Meier-Analyse lässt sich die Wahrscheinlichkeit, dass ein Ereignis bis zu einem bestimmten Zeitpunkt eintritt auch dann berechnen, wenn nicht alle Patienten identische Beobachtungszeiträume haben. Die Kaplan-Meier-Kurve ist hilfreich zum Ablesen spezifischer Überlebensraten (z.B. 1-Jahres-Überlebensrate) oder Überlebenszeiten.

4. Ergebnisse

Ziel dieser Arbeit war es, die Bedeutung des Auftretens von disseminierten Tumorzellen für die Tumorarten NZK, PCA und MMK bzw. gutartige Tumore der Brust zu untersuchen. Hierfür wurden DTZ aus peripherem Blut angereichert und zum Teil isoliert. Ihr Auftreten wurde mit bekannten klinischen Faktoren und in dieser Arbeit bestimmten molekularen Markern in den Tumoren korreliert. Die nähere Untersuchung der Karzinome umfasste sowohl DNA- als auch Proteinanalysen. Es sollte herausgefunden werden, inwiefern Mutationen in TSG und Onkogenen bzw. die Analyse verschiedener molekularer Marker Einfluss auf eine Tumorzeldisseminierung und damit einer Metastasierung haben. Dafür wurde DNA aus NZK, PCA und MMK und, soweit vorhanden, auch aus dem autologen Normalgewebe und den Metastasen isoliert. Es gelang zudem, die DNA der disseminierten Tumorzellen aus dem Blut einiger MMK- und NZK-Patienten zu isolieren und anschließend zu amplifizieren. Die DNA-Proben wurden auf genetische Veränderungen, wie Mutation, Verlust von Heterozygotie und Mikrosatelliteninstabilitäten für Tumorsuppressor- und Onkogenloci im Vergleich zum Normalgewebe untersucht. Weiterhin wurde sie in Methylierungsanalysen verwendet.

Die Ergebnisdarstellung wurde in verschiedene Unterkapitel eingeteilt. Zuerst erfolgte die Vorcharakterisierung der disseminierten Tumorzellen, im Besonderen der großen blauen Zellen (BI+), die in den Blutproben auffielen. Desweiteren wurden die einzelnen Tumorentitäten separat betrachtet. In diesen Abschnitten wurden zuerst die Ergebnisse zu den Untersuchungen der Blutproben auf DTZ dargestellt. Das Auftreten der Tumorzellen im Blut ist zu klinischen Daten und der molekularen Analyse des Tumormaterials korreliert worden. Statistische Analysen zwischen der Prognose und dem Auftreten zirkulierender Tumorzellen im Blut bzw. zu molekularen Markern im Tumorgewebe wurden ebenfalls durchgeführt

4.1. Charakterisierung der disseminierten Tumorzellen

Für den Nachweis bzw. die weitere molekulare Charakterisierung von DTZ wurde den Tumorpatienten 16 ml peripher venöses Blut abgenommen. Die Aufarbeitung der Blutproben erfolgte mit dem MACS-Gerät der Firma Miltenyi. Der Vorteil dieser Methode ist eine negative Selektion der Tumorzellen, d.h. die Anreicherung der Tumorzellen erfolgte über eine positive Markierung der Leukozyten, wodurch eine Aussortierung eines Großteils dieser Blutzellen möglich wurde, welche den überwiegenden Anteil an kernhaltigen Zellen im Blut darstellen. Die Tumorzellen wurden nicht markiert. Auch Tumorzellen, die ihre Oberflächenantigene verloren haben, konnten mit dieser Methode erfasst werden. Nach der immunhistochemischen Färbung der Präparate mit CK 8/18-Antikörpern sind diese mikroskopisch ausgewertet worden. Dabei fiel auf, dass sowohl Zytokeratin-positive Tumorzellen sichtbar waren, wie dies auch erwartet wurde, als auch große blaue Zytokeratin-

negative Zellen (Bl+). Nach Aussagen des begutachtenden Pathologen (Dr. U. Bilkenroth) und eines weiteren Kollegen (Prof. Dr. H-J. Holzhausen) handelte es sich dabei nicht um normale Blutzellen. Diese Zellen traten häufiger als die Zytokeratin-positiven Zellen (CK+) auf. Um auszuschließen, dass es sich dabei um Zellen des Blutes handelte, wurden zusätzliche Routinefärbungen durchgeführt. Diese detektieren spezifisch verschiedene Blutzellmarker. Es konnten keine Färbungen nachgewiesen werden für Megakaryozyten (Faktor VIII, CD61), für Vorstufen der Erythropoese (Glycophorin C), für unreife und reife Granulozyten (Myeloperoxidase), für B-Lymphozyten und ihre Vorstufen (CD20, CD79a), für typische und atypische Plasmazellen (VS 38 c) und für Makrophagen (MAK 387, CD68). Die negativen Färbungen weisen darauf hin, dass die großen blauen Zellen eindeutig nicht mesodermalen Ursprungs sind bzw. dem Blutzellsystem entstammen. Die großen blauen Zellen sind größer als die Zytokeratin-positiven Zellen und zeigen eine tumorzellähnliche Morphologie. Aufgrund dieser Kriterien wurden die blauen Zellen im Weiteren zusätzlich zu den Zytokeratin-positiven Zellen ebenso als Tumorzellen eingeschätzt. Ein Beispiel für diese atypischen blauen Zellen ist in Abbildung 4-1 dargestellt. Das Auftreten von nicht angefärbten blauen Tumorzellen konnte in den Präparaten aller untersuchten Tumorarten nachgewiesen werden. Zytologische Kriterien eines bösartigen Tumors sind Kerngrößenunterschiede (Kernpolymorphie) und ein unterschiedliches Färbeverhalten der Kernstrukturen (Kernpolychromasie). Zudem ist eine Verschiebung der Kern-Plasma-Relation (normal 1:4 bis 1:6) zugunsten der Kerne (Relation in Tumorzellen 1:1 bis 1:2) und eine wechselnd deutliche Vergrößerung der Nukleolen für Tumorzellen charakteristisch. Abbildung 4-2 zeigt das Färbungsmuster Zytokeratin-positiver Zellen.

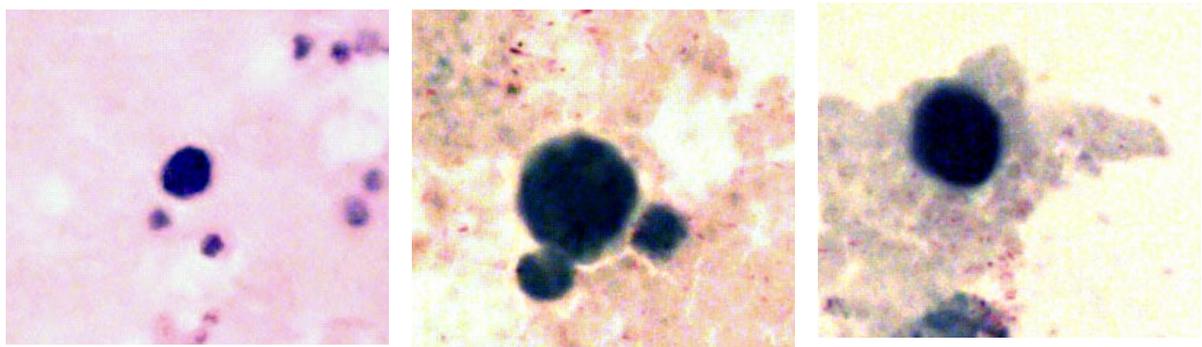


Abb 4 – 1 Darstellung der häufig auftretenden großen blauen Tumorzellen (Bl+).

In Abbildung 4-1 sind Beispiele für große blaue Zytokeratin-negative Zellen (400x Vergrößerung) dargestellt. Das Zytoplasma zeigt keine Färbung für Zytokeratin. Die Verschiebung der Kern-Plasma-Relation zugunsten des Zellkerns ist an diesen Zellen sehr gut zu erkennen. Der Zellkern füllt die Zellen nahezu aus (2. Bild). Es handelt sich bei diesen Bildern um Zellen von 3 verschiedenen NZK-Patienten.

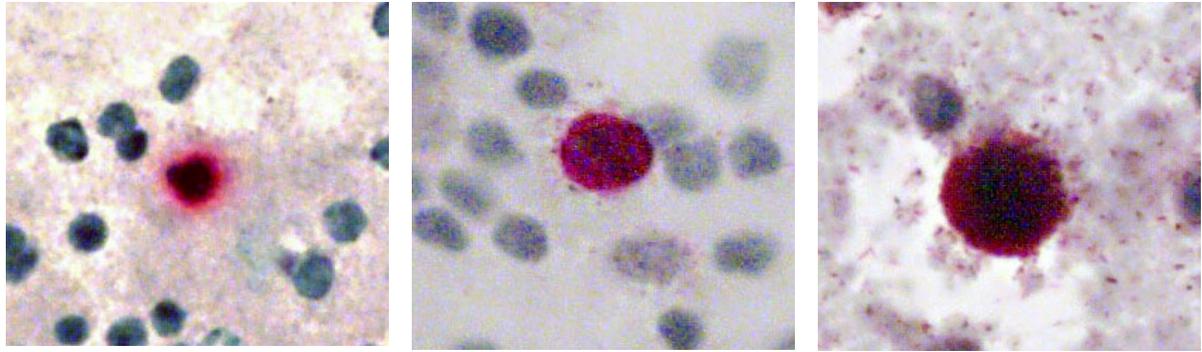


Abb. 4 –2 Darstellung Zytokeratin-positiver Zellen (CK+).

In Abbildung 4-2 sind Beispiele Zytokeratin-positiver Zellen dargestellt (400x Vergrößerung). Die ersten beiden Abbildungen sind Zellen von zwei MMK-Patientinnen. Im dritten Bild handelt es sich um eine Zytokeratin-positive Zelle von einem NZK-Patienten. Das Zytoplasma der dargestellten Zellen weist eine Zytokeratin-Positivität (Rotfärbung) auf.

4.2. Das Mammakarzinom

4.2.1. Analyse der Blutproben

Es wurden Blutproben von 173 MMK-Patienten und von weiteren 78 Patienten mit gutartigen (benigen) Erkrankungen der Brust analysiert. Letztere dienten als Vergleichsgruppe zu den Karzinomfällen. Jedoch muss man einschränkend sagen, dass es sich nicht um gesunde Blutspender handelte. Jeder Patient wies benigne Erkrankungen der Brust auf. Alle Blutproben der Patienten mit sowohl malignen als auch benignen Erkrankungen der Brust stammen von weiblichen Personen. In der folgenden Tabelle (Tab. 4-1) sind Daten zur Blutprobenanzahl, der TumorgroÙe, dem Lymphknotenstatus, dem Metastasenstatus, dem Tumorgrad und dem Auftreten von Tumorzellen in den Blutproben bei den MMK-Patienten zusammengefasst. Es wurde eine Unterteilung in 4 Kategorien vorgenommen. Proben die ausschließlich Zytokeratin-positive Tumorzellen aufwiesen, wurden mit CK+ bezeichnet. Proben, die sowohl Zytokeratin-positiv als auch große blaue Zellen aufwiesen, sind als CK+/BI+ aufgeführt. Negative Präparate wurden als CK-/BI- bezeichnet und beim Auftreten von ausschließlich großen blauen Zellen mit BI+ markiert. Die letzte Spalte enthält die Gesamtzahl an Patienten bzw. Blutproben mit Tumorzellen (pos. gesamt) und die Anzahl der untersuchten Proben bzw. Patienten (insgesamt).

	CK+	CK+ / BI+	CK- / BI-	BI+	Pos. Gesamt / insgesamt
Anzahl der Patienten	6 (3,5 %)	14 (8,1 %)	90 (52,0 %)	63 (36,4 %)	83 (48,0 %) / 173
Überleben					
am Leben	5 (3,2 %)	12 (7,7%)	81 (51,9 %)	58 (37,2 %)	75 (48,1 %) / 156
verstorben	1 (5,9 %)	2 (11,8 %)	9 (52,9 %)	5 (29,4 %)	8 (47,1 %) / 17

	CK+	CK+ / BI+	CK- / BI-	BI+	Pos. Gesamt / insgesamt
Patienten mit 1 BP	0	0	46 (73,0 %)	17 (27,0 %)	17 (27,0 %) / 63
präoperativ	0	0	39 (72,2 %)	15 (27,8 %)	15 (27,8 %) / 54
postoperativ	0	0	5 (83,3 %)	1 (16,7 %)	1 (16,7 %) / 6
Chemotherapie	0	0	1 (50,0 %)	1 (50,0 %)	1 (50,0 %) / 2
Nachsorge	0	0	1 (100 %)	0	0 / 1
Patienten mit 2 BP	2 (3,0 %)	1 (1,5 %)	35 (52,2 %)	29 (43,3 %)	32 (47,8 %) / 67
präop. und postop.	1 (1,8 %)	1 (1,8 %)	31 (55,3 %)	23 (41,1 %)	25 (44,6 %) / 56
präop. und Chemoth.	1 (25,0 %)	0	1 (25,0 %)	2 (50,0 %)	3 (75,0 %) / 4
präop. und Nachsorge	0	0	1 (20,0 %)	4 (80,0 %)	4 (80,0 %) / 5
postop. und Chemoth.	0	0	2 (100 %)	0	0 / 2
Patienten mit 3 oder mehr BP	4 (9,3 %)	13 (30,2 %)	8 (18,6 %)	18 (41,9 %)	35 (81,4 %) / 43
Anzahl der BP insges.	17 (4,5 %)	14 (3,7 %)	243 (64,8%)	101 (26,9%)	132 (35,2 %) / 375
präoperativ	5 (3,1 %)	3 (1,9 %)	111 (68,9%)	42 (26,1 %)	50 (31,0 %) / 161
postoperativ	3 (3,2 %)	2 (2,1 %)	65 (69,1 %)	24 (25,5 %)	29 (30,8 %) / 94
Chemotherapie	7 (7,7 %)	7 (7,7 %)	51 (56,0 %)	26 (28,6 %)	40 (44,0 %) / 91
Nachsorge	2 (6,9 %)	2 (6,9 %)	16 (55,2 %)	9 (31,0 %)	13 (44,8 %) / 29
Tumorgroße (pT)					
pT1	4 (4,3 %)	7 (7,5 %)	50 (53,8 %)	32 (34,4 %)	43 (46,2 %) / 93
pT2	0	5 (9,4 %)	25 (47,2 %)	23 (43,4 %)	28 (52,8 %) / 53
pT3	0	2 (33,3 %)	3 (50,0 %)	1 (16,7 %)	3 (50,0 %) / 6
pT4	1 (50,0 %)	0	1 (50,0 %)	0	1 (50,0 %) / 2
nicht bekannt	1 (5,3 %)	1 (5,3 %)	11 (57,9 %)	6 (31,6 %)	8 (42,1 %) / 19
Lymphknotenstatus					
pN0	3 (3,0 %)	10 (10,0 %)	47 (47,0 %)	40 (40,0 %)	53 (53,0 %) / 100
pN1	2 (4,7 %)	4 (9,3 %)	24 (55,8 %)	13 (30,2 %)	19 (44,2 %) / 43
pN2	1 (8,3 %)	0	5 (41,7 %)	6 (50,0 %)	7 (58,3 %) / 12
pN3	0	0	2 (100 %)	0	0 / 2
nicht bekannt	0	0	12 (75,0 %)	4 (25,0 %)	4 (25,0 %) / 16
Metastasenstatus					
pM0	4 (2,7 %)	13 (8,9 %)	76 (52,1 %)	53 (36,3 %)	70 (47,9 %) / 146
pM1	2 (13,3 %)	1 (6,7 %)	4 (26,7 %)	8 (53,3 %)	11 (73,3 %) / 15
nicht bekannt	0	0	10 (83,3 %)	2 (16,7 %)	2 (16,7 %) / 12

	CK+	CK+ / BI+	CK- / BI-	BI+	Pos. Gesamt / insgesamt
Tumorgrad					
G1	0	1 (4,2 %)	14 (58,3 %)	9 (37,5 %)	10 (41,7 %) / 24
G2	4 (4,2 %)	7 (7,4 %)	46 (48,4 %)	38 (40,0 %)	49 (51,6 %) / 95
G3	2 (4,5 %)	6 (13,6 %)	27 (61,4 %)	9 (20,4 %)	17 (38,6 %) / 44
G4	1 (33,3 %)	0	1 (33,3 %)	1 (33,3 %)	2 (66,7 %) / 3
nicht bekannt	0	0	2 (28,6 %)	5 (71,4 %)	5 (71,4 %) / 7

Tab. 4 – 1 Klinische Daten der MMK-Patientinnen und Auftreten von DTZ.

BP ... Blutprobe, CK+... Zytokeratin-positive Zellen, CK-/BI- ... es wurden in diesen Blutproben keine Tumorzellen nachgewiesen, BI+... Blutproben mit großen blauen Tumorzellen, CK+/BI+ - die Blutproben wiesen sowohl CK+-Zellen als auch BI+-Zellen auf. Die Klassifizierung nach dem pTNM-System ist im Anhang (Tab. 8-1) dargestellt.

Die Blutproben der MMK-Patienten wurden zu verschiedenen Zeitpunkten entnommen. Präoperative Proben sind ein bis zwei Tage vor der Primäroperation entnommen worden. Der Entnahmezeitpunkt postoperativer Blutproben war zwischen dem 5. und 8. Tag nach der Operation. Weitere Proben wurden direkt vor der 1. Applikation einer Chemotherapie, in der Mitte der Therapiezyklen und nach Beendigung der Chemotherapie gewonnen. Patientinnen, die zu regelmäßigen Nachsorgeuntersuchungen kamen, wurde auch zu diesen Terminen Blut entnommen. Zu diesen Zeiten fanden keine Therapien statt und die Patienten galten als tumorfrei. In den untersuchten Blutproben konnten insgesamt bei 83 von 173 Patientinnen (48,0%) Tumorzellen im Blut nachgewiesen werden. Es wurde dabei das Auftreten von CK+- und BI+-Zellen zusammengefasst. Von 63 Patientinnen stand eine Blutprobe zur Verfügung, von 67 Patientinnen zwei und von weiteren 43 Patientinnen drei oder mehr Blutproben von unterschiedlichen Entnahmezeitpunkten (Tab. 4-1). Wobei der Großteil präoperativ entnommen wurde. Wird die Anzahl der Blutproben zusammengefasst, so ergibt sich eine Gesamtsumme von 375 untersuchten Proben von 173 MMK-Patientinnen in vier Jahren. In 132 (35,2%) von diesen 375 Blutproben wurden DTZ nachgewiesen. Die Anzahl der Tumorzellen in einer Blutprobe (16 ml EDTA-Blut) variierte von einer bis 40 Tumorzellen. Der Durchschnitt lag bei fünf Tumorzellen und der Median bei vier Tumorzellen je positiver Blutprobe. Auffallend sind die Überlebensraten der MMK-Patientinnen. Insgesamt sind von 173 Patientinnen bereits 17 verstorben. Von den 17 verstorbenen Patientinnen wiesen drei CK+-Zellen (15%) und fünf BI+-Zellen (29,4%) in den untersuchten Blutproben auf. Insgesamt sind acht von 83 (9,6%) Patientinnen, bei denen Tumorzellen in den Blutproben nachgewiesen wurden, verstorben.

Testparameter	X ² (Chi ²) - nach Pearson	Gesamtzahl der Patienten
Auftreten von Tumorzellen vor OP		
▪ Auftreten von CK+/BI+-Zellen korreliert mit pM	P = 0,025	n = 146
▪ Auftreten von CK+/BI+-Zellen korreliert mit Tumorgrad G	P = 0,050	n = 153
▪ Auftreten von BI+-Zellen korreliert mit Tumorgrad G	P = 0,049	n = 153
Auftreten von Tumorzellen in der Nachsorge		
▪ Auftreten von BI+-Zellen korreliert mit Operationsart	P = 0,017	n = 21
Methylierung		
▪ Auftreten von CK+-Zellen insgesamt korreliert mit der rar-β Methylierung in der Tumor-DNA	P = 0,026	n = 17

Tab. 4 – 2 Übersicht über die statistischen Auswertungen der klinischen Daten und die Ergebnisse der molekularen Analysen an den MMK.

Die Ergebnisse der statistischen Auswertungen mit dem SPSS-Programm sind in Tabelle 4-2 dargestellt worden. Es konnte eine signifikante Korrelation für das Auftreten von Tumorzellen (CK+ und BI+) vor der Primäroperation zum Metastasenstadium nachgewiesen werden (P = 0,025; Abb.4-3). Weiterhin ergab sich eine Korrelation zwischen dem Vorhandensein von CK+/BI+ Tumorzellen vor der Operation zum Tumorgrad (P = 0,050; Abb. 4-4). Interessanterweise haben hier die großen blauen Zellen den entscheidenden Anteil, da ihr Auftreten bereits mit dem Tumorgrad korrelierte (P = 0,049; Abb. 4-5). Je weniger differenziert ein Tumor war, umso mehr Patienten wiesen Tumorzellen in ihrem Blut auf: beim Tumorgrad 1 waren dies 41,7% der Patienten, bei Tumorgrad 2 51,6% und bei Tumorgrad 4 66,7%. Patientinnen mit Tumorgrad 3 wiesen dabei jedoch seltener Tumorzellen in den Blutproben auf (38,6%; Vgl. Tab. 4-1). Allerdings wurden in dieser Gruppe nur 44 Patientinnen untersucht. Insgesamt kann gesagt werden, dass bereits in den Blutproben von Patienten mit G1 und G2 Tumoren zirkulierende Tumorzellen nachgewiesen wurden. Die Untersuchung von Blutproben in der Nachsorge der Patienten, d.h. wenn alle Therapien abgeschlossen waren (Ausnahme: Hormontherapie) und die Patienten zu diesem Zeitpunkt als tumorfrei galten, ergab das Vorhandensein von BI+-Zellen eine Korrelation zur Operationsart (P = 0,017). Je radikaler die Operationsmethode war, desto häufiger traten auch noch nach Monaten große blaue Tumorzellen im Blutkreislauf auf (Abb. 4-6). Dies wurde besonders deutlich, wenn die ganze Brust abgenommen wurde (Ablatio) und gleichzeitig axilläre Lymphknoten entfernt wurden. Bei einer brusterhaltenden Operationsmethode (BET) mit Entfernung der axillären Lymphknoten traten wesentlich weniger Tumorzellen auf. Die Tumorgöße war hier nicht der entscheidende Faktor. Auch kleine Tumore mit pT1 wurden teilweise durch Abnahme der ganzen Brust entfernt. Bei dieser radikalen Methode traten häufiger BI+-Zellen bei den Patienten in der Nachsorge auf. Patienten mit pT1, die brusterhaltend operiert wurden, zeigten seltener BI+-Zellen in den Blutproben von der Nachsorgeuntersuchung. Das Überleben der Patienten war unabhängig davon, ob BI+-Zellen in den Blutproben aus der Nachsorge detektiert wurden oder nicht.

Zwei von 21 (9,5%) untersuchten Patienten sind verstorben. Diese wurden mit der radikalen Operationsmethode operiert und wiesen jeweils einen pT2, pN0, pM0 Status auf. Das Überleben der Patientinnen ist nach diesen Daten nicht vom Nachweis von disseminierten Tumorzellen in der Nachsorge abhängig. Jedoch ist das Auftreten der BI+-Zellen mit der Entwicklung von Metastasen assoziiert (siehe oben).

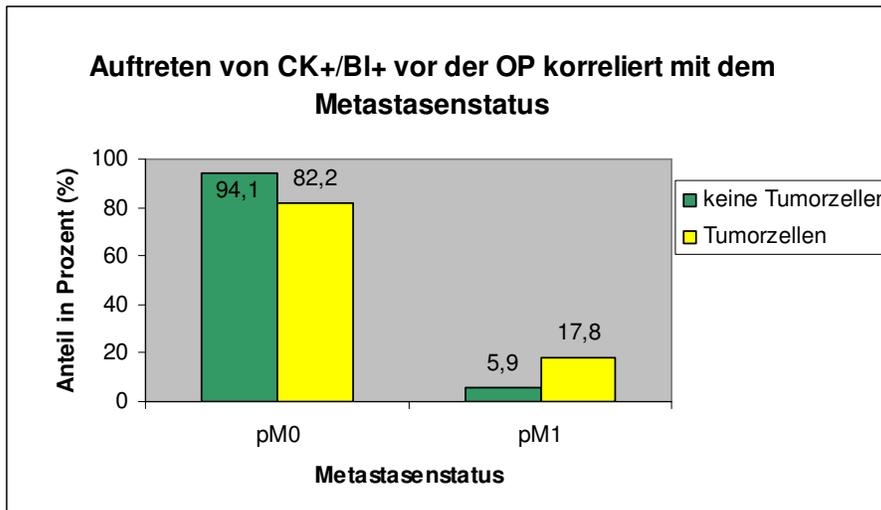


Abb. 4 – 3 Das Auftreten von CK+/BI+-Zellen vor der Operation korreliert mit dem Auftreten von Metastasen (pM0 ... keine Metastasen, pM1 ... Vorhandensein von Metastasen).

$P = 0,025$; $RR = 3.0$

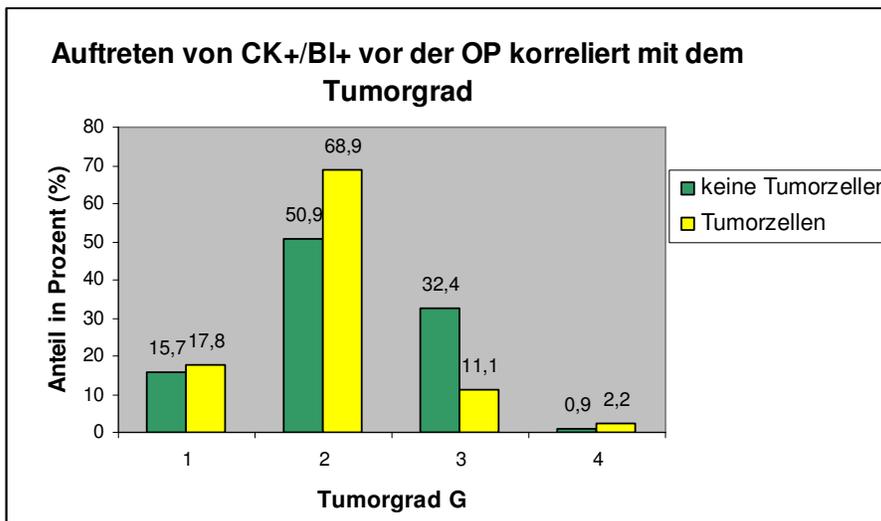


Abb. 4 – 4 Das Auftreten von CK+/BI+-Zellen vor der Operation korreliert mit dem Tumorgrad (Patienten für die der Tumorgrad nicht bestimmt werden konnte, wurden in die Berechnungen nicht einbezogen).

$P = 0,050$

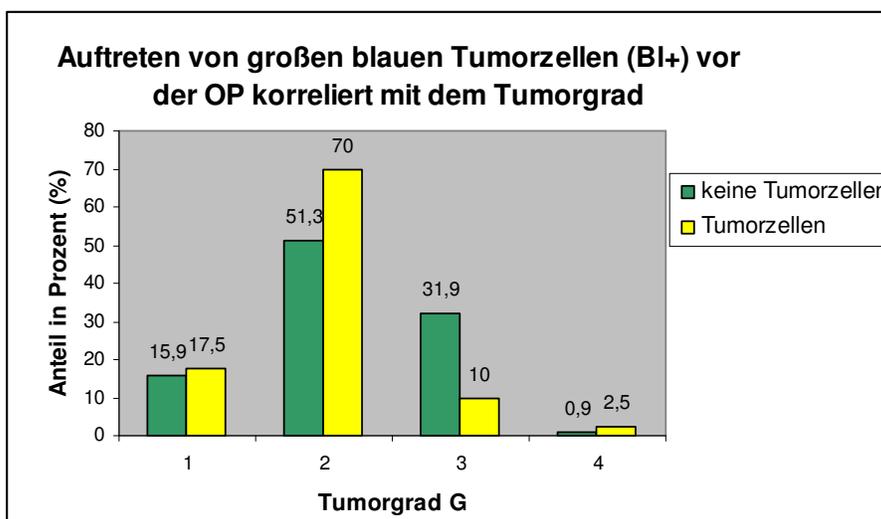


Abb. 4 – 5 Das Auftreten von BI+-Zellen vor der Operation korreliert mit dem Tumorgrad.

$P = 0,049$

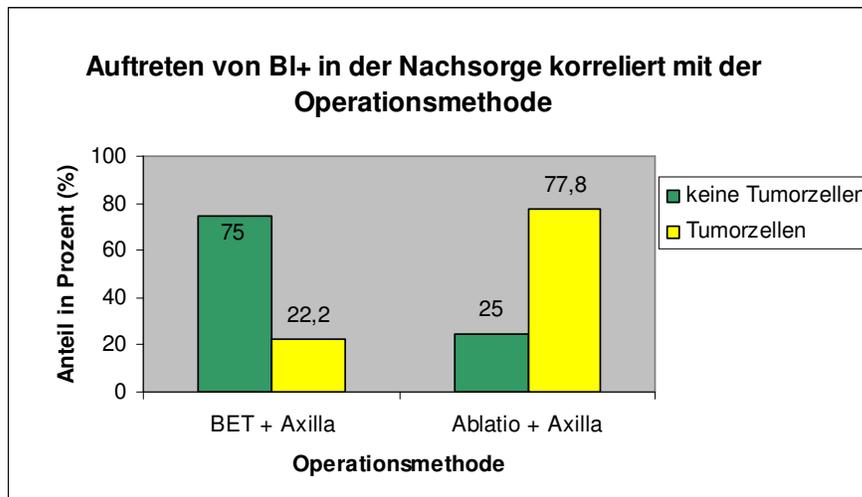


Abb. 4 – 6 Das Auftreten von BI+ in der Nachsorge korreliert mit der Operationsmethode.

$P = 0,017$; $RR = 3,1$

4.2.2. Molekulargenetische DNA-Analysen

4.2.2.1. MSI- und LOH-Analysen

Von 17 der anhand von Blutproben untersuchten MMK-Patientinnen stand Gefriermaterial vom Primärtumor und dem autologen Normalgewebe zur Verfügung. Sechs dieser Patientinnen wiesen auch Metastasen in den Lymphknoten auf. Nach der DNA-Isolation aus diesem Gefriermaterial, den Lymphozyten und den Metastasen (Paraffinmaterial) erfolgten MSI- und LOH-Analysen mit den Mikrosatellitenmarkern für p53Alu, Rb und myc-L1. Mutationen, die p53 betreffen, bilden mit über 50% die häufigsten molekularen Veränderungen in bösartigen Tumoren (Hollstein et al. 1991). Auch Rb-Genveränderungen sind mit etwa 30% sehr häufig. In dieser Arbeit wurde die DNA der DTZ von drei Patientinnen mit MMK isoliert und in die Mikrosatellitenanalysen mit einbezogen. Die Ergebnisse der MSI- und LOH-Analysen sind in Tab. 8-5 (im Anhang) für alle Patientinnen aufgeführt, die Veränderungen in der DNA des Tumorgewebes bzw. der DTZ aufwiesen. Die Auswertung der silbergefärbten Mikrosatellitenbilder ergab nur für zwei der drei Patientinnen, bei denen auch die DTZ aus dem Blut untersucht wurden, Veränderungen. Weitere Alterationen konnten in den untersuchten Markern für die 17 MMK-Patientinnen nicht nachgewiesen werden. Beide Patientinnen die Veränderungen aufwiesen, hatten diese sowohl im Rb-Marker als auch im myc-L1-Marker. Die genetischen Veränderungen, die im Rb-Marker auftraten, waren bei beiden Patientinnen Heterozygotieverluste. Bei Patientin F1180836 weist interessanterweise bereits das Normalgewebe einen Verlust im Vergleich zur DNA aus den Lymphozyten auf (Abb. 4-7). Die Lymphozyten haben sieben Banden und das Normalgewebe vier Banden. Diese Veränderung wurde auch im Tumorgewebe nachgewiesen. Die DNA der DTZ dagegen unterscheidet sich im Vergleich zum Tumorgewebe nocheinmal in ihren Veränderungen, da sechs Banden detektiert wurden. Im zweiten Fall (KH181139) wurde ein LOH sowohl im Tumor als auch in den DTZ nachgewiesen (Abb. 4-8). Im Vergleich zum Normalgewebe kam es zum Verlust einer Bande. Die gleichen Patientinnen wiesen auch Veränderungen für den Marker myc-L1 auf.

Patientin FI180836 wies einen LOH in den DTZ auf (Abb. 4-9). Dagegen wurde bei Patientin KH181139 ein Zugewinn in der DNA der DTZ nachgewiesen (Abb. 4-10).

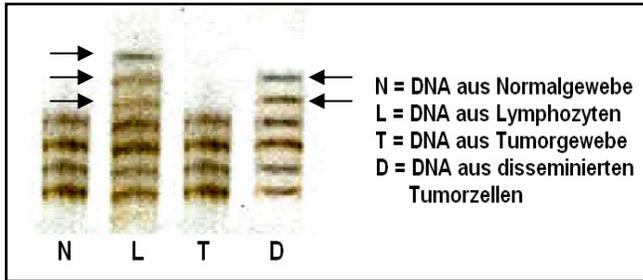


Abb. 4 – 7 LOH im Normalgewebe, im Tumor und in den DTZ im Rb-Marker für Patientin FI180836

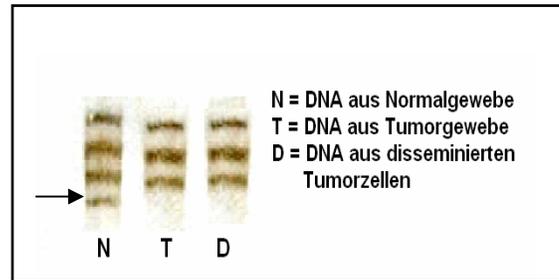


Abb. 4 – 8 LOH im Tumorgewebe und in den DTZ im Rb-Marker für Patientin KH181139

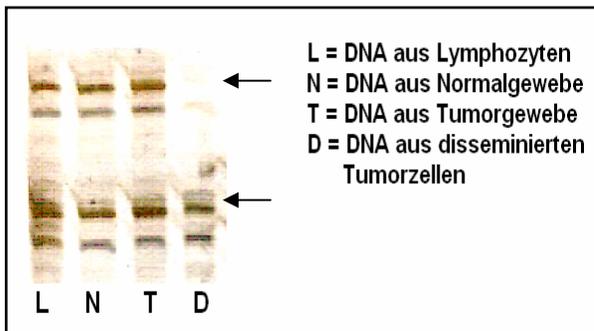


Abb. 4 – 9 LOH im myc-L1-Marker für Patientin FI180836 in den DTZ

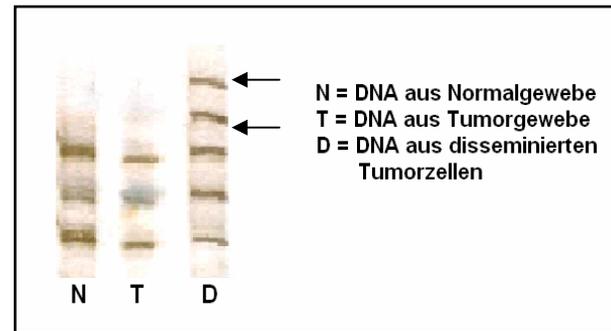


Abb. 4 – 10 Zugewinn im myc-L1-Marker für Patientin KH181139 in den DTZ

4.2.2.2. Methylierungsanalysen

Die DNA-Proben der MMK wurden weiterhin in Methylierungsanalysen untersucht, welche an den Promotorregionen der Gene *RASSF1A*, *p16*, *rar-β* und *FHIT* durchgeführt wurden. Das *rar-β*-Gen ist für Differenzierungsprozesse verantwortlich und die anderen Gene werden als TSG eingeschätzt. Sie sind von genetischen / epigenetischen Veränderungen betroffen und dadurch an der Progression verschiedener Tumorarten beteiligt. Das *RASSF1A*-Gen („ras association domain family 1A“) liegt auf dem kurzen Arm von Chromosom 3. *RASSF1A* interagiert mit Mikrotubuli und treibt die Bildung des Spindelapparates voran. In der Tabelle 4-3 sind die Häufigkeiten der Methylierung in den einzelnen Gewebearten aufgeführt (Vgl. Tab. 8-5 im Anhang). Eine Methylierung des *RASSF1A*-Promotors trat in der DNA des Tumorgewebes zu 94,1% auf, währenddessen eine Methylierung in der Normalgewebe-DNA in 35,3% der Fälle nachgewiesen werden konnte. Eine *rar-β*-Methylierung war für die TumordNA mit 58,8% relativ häufig und konnte in der Normalgewebe-DNA nicht detektiert werden. Eine Methylierung der *FHIT*-Promotorregion trat am wenigsten auf. Nur 11,8% der DNA-Proben aus dem Tumorgewebe waren methyliert.

	Lymphozyten	Normalgewebe	Tumorgewebe	Metastasen
Gesamtzahl untersuchter Gewebe	17	17	17	6
RASSF1A	0	6 (35,3 %)	16 (94,1 %)	4 (66,7 %)
p16	1 (5,9 %)	0	3 (17,6 %)	0
rar-β	0	0	10 (58,8 %)	2 (33,3 %)
FHIT	1 (5,9 %)	0	2 (11,8 %)	0

Tab. 4 – 3 Häufigkeiten der Methylierung in den einzelnen Gewebearten.

Die Methylierung der rar-β-Promotorregion in der Tumor-DNA korrelierte mit dem Auftreten von CK+-Zellen in allen untersuchten Blutproben (Tab. 4-2; P = 0,026). Die Probenanzahl betrug lediglich 17, aber alle fünf Patienten, die CK+-Zellen im Blut aufwiesen, hatten auch eine Methylierung in der untersuchten Tumor-DNA (Abb. 4-11).

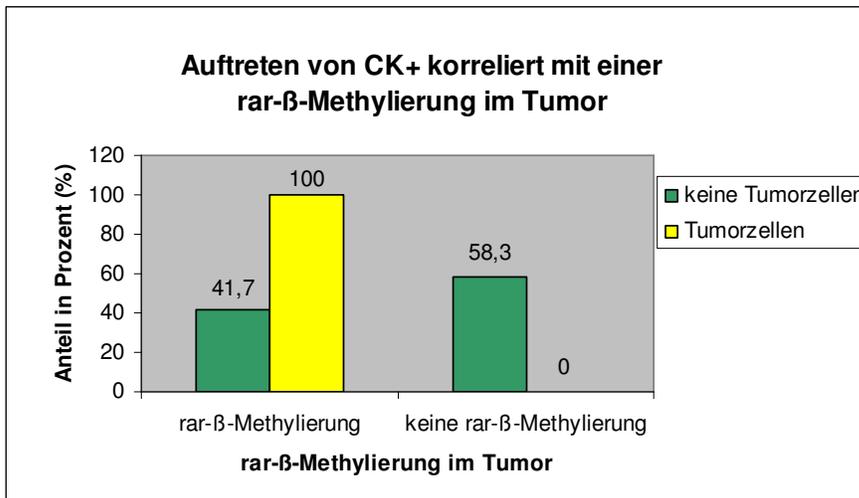


Abb. 4 – 11 Das Auftreten von CK+-Zellen insgesamt korreliert mit einer rar-β-Methylierung in der DNA der untersuchten Tumorgewebe.

P = 0,026

4.2.2.3. Der SNP309-Polymorphismus

Das TSG p53 ist in mindestens der Hälfte aller Karzinome mutiert (Hollstein et al. 1991). Eine zentrale Rolle im p53-Pathway stellt das MDM2-Protein als direkter negativer Regulator von p53 dar. Im P2-Promotor des mdm2-Gens wurde ein Polymorphismus (SNP309) gefunden, der ein einzelnes Nukleotid betrifft (T → G). Es wurde von unserer Arbeitsgruppe gezeigt, dass dadurch die Affinität von Sp1, einem Transkriptionsaktivator erhöht wurde, was in höheren MDM2-RNA- und Protein-Konzentrationen resultiert (Bond et al. 2004). Der SNP309-Polymorphismus ist bei der Bildung sowohl hereditärer als auch sporadischer Tumore beteiligt. Normalerweise ist das 309. Nukleotid im ersten Intron ein T. Tritt der SNP309-Polymorphismus auf, so kommt es zu einem Austausch des Thymins gegen ein Guanosin in einem Allel (heterozygot T/G) oder in beiden Allelen (homozygot G/G). Diese Studien zeigten (Bond et al. 2004), dass Personen mit dem G/G-Polymorphismus

mindestens neun Jahre früher sowohl hereditäre als auch sporadische Tumore bekommen im Vergleich zu Personen mit der Wildtyp T/T-Variante. Von 95 der in dieser Arbeit untersuchten MMK konnte in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe um A. Levine (Cancer Institute of New Jersey) durch Sequenzierung die DNA auf den SNP309-Polymorphismus getestet werden. In 28,4% (27/95) der Proben wurde der T/T-Genotyp ermittelt. Den T/G-Genotyp wiesen 54,7% (52/95) auf und den G/G-Genotyp 16,8% (16/95). Die statistische Auswertung ergab für den SNP309-Polymorphismus keine signifikante Korrelation zum Alter. Jedoch zeigte sich, dass Patientinnen mit dem T/T-Genotyp mit durchschnittlich 53 Jahren erkrankten, Patientinnen mit dem T/G-Genotyp mit 57 Jahren und Patientinnen, die einen G/G-Genotyp hatten, erkrankten im Durchschnitt mit 61 Jahren an einem MMK. Erstaunlicherweise erkrankten demnach Frauen mit dem Wildtyp-Genotyp im Schnitt acht Jahre früher als Frauen mit dem G/G-Polymorphismus.

4.2.3. Protein-Analysen

4.2.3.1. Bestimmung von uPAR, uPA und PAI-1 beim Mammakarzinom

Ein Hauptfaktor der Tumorzellinvasion und Metastasierung ist die extrazelluläre Proteolyse durch ihren Einfluss auf die Proliferation, Adhäsion, Migration von Zellen und die Angiogenese. Das Plasminogen Aktivator (PA) – System ist eines dieser proteolytischen Systeme. Hauptkomponenten des Systems sind der Urokinase-Typ PA (uPA), sein Rezeptor uPAR (CD 87) und sein Inhibitor PAI-1.

Die Daten der ELISA-Proteinbestimmungen wurden in die statistischen Auswertungen mit allen klinischen Daten und molekulargenetischen Ergebnissen einbezogen (Tab. 4-4). Dabei konnte eine signifikante Korrelation zwischen dem Auftreten von großen blauen Tumorzellen vor der Operation ($P = 0,006$) und der uPA-Konzentration im Tumor nachgewiesen werden (Abb. 4-12).

Testparameter	X^2 (Chi ²) - nach Pearson	Gesamtzahl der Patienten
Erhöhung von uPA im Tumor		
▪ Auftreten von BI+-Zellen vor der OP korreliert mit der uPA-Konzentration im Tumor	$P = 0,006$	$n = 32$
Auftreten von BI+-Zellen vor OP korreliert mit einer hohen CA 15-3-Konzentration	$P = 0,049$	$n = 31$

Tab. 4 – 4 *Übersicht über die statistischen Auswertungen zwischen dem Auftreten von DTZ im Blut und der Konzentration bestimmter Proteine*

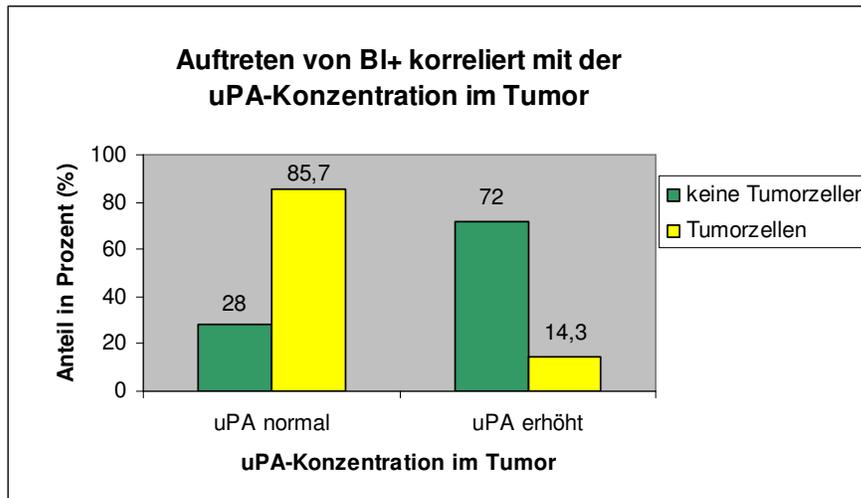


Abb. 4 – 12 Das Auftreten von BI+-Zellen vor der Operation korreliert mit dem uPA-Expressionslevel im Tumor.

$P = 0,006$

4.2.3.2. Das „Cancer Antigen“ CA 15-3

Im Rahmen der Diagnosesicherung wurden von einem Teil der MMK-Patientinnen auch die Konzentrationen des „Cancer Antigens“ CA 15-3 und des carcino-embryonalen Antigens CEA im Serum bestimmt. Durch die Entdifferenzierung von Tumorzellen werden auch embryonale, für den erwachsenen Organismus untypische, Substanzen gebildet. Zu diesen Substanzen gehört das carcino-embryonale Antigen, ein Glykoprotein, welches auch von MMK gebildet wird. Die Proteine bieten, wenn sie vermehrt in das Serum abgegeben werden, einen diagnostischen Hinweis auf das Vorliegen eines Tumors. In den statistischen Auswertungen gab es eine Korrelation zwischen einer hohen CA 15-3-Expression und dem Auftreten von BI+-Zellen vor der Primäroperation ($P = 0,049$; Abb. 4-13).

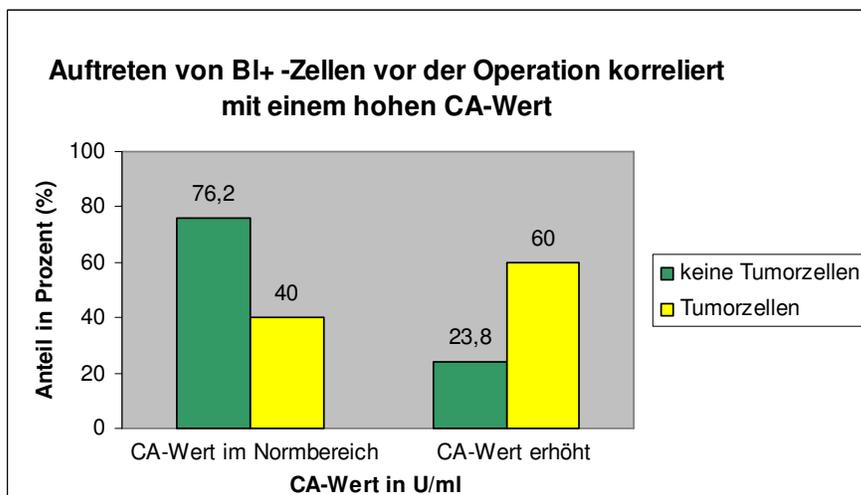


Abb. 4 – 13 Das Auftreten von BI+-Zellen vor der Operation korreliert mit einer erhöhten Konzentration an CA 15-3.

$P = 0,0049$

4.2.4. Überlebensanalysen

Alle Ergebnisse der Nachweise von DTZ, der molekulargenetischen DNA-Analysen und der Proteinanalysen wurden mit den klinischen Daten in χ^2 -Tests verglichen. Wie erwartet, zeigte die Tumorgroße pT ($P = 0,002$), der Lymphknotenstatus pN ($P = 0,002$) und der Metastasenstatus pM ($P = 0,003$) eine signifikante Korrelation mit dem Überleben (Tab. 4-5). Im Anschluss an die χ^2 -Tests wurden Kaplan-Meier-Analysen und Cox-Regressionsanalysen durchgeführt (Tab. 4-6). In den multivariaten Cox-Regressionsanalysen wurde der Lymphknotenstatus (pN), der Metastasenstatus (pM) und die Tumorgroße (pT) bei den Berechnungen mit einbezogen. Hierbei sollte geklärt werden, ob die signifikante Korrelation aus der univariaten Analyse durch die anderen Prognoseparameter (pT, pN, pM) beeinflusst wird oder unabhängig ist.

Testparameter	χ^2 (Chi ²) - nach Pearson	Anzahl der Patienten
Überleben		
▪ Tumorgroße (pT) korreliert mit Überleben	$P = 0,002$	$n = 154$
▪ Lymphknotenstatus (pN) korreliert mit Überleben	$P = 0,002$	$n = 157$
▪ Metastasenstatus (pM) korreliert mit Überleben	$P = 0,003$	$n = 161$

Tab. 4 – 5 Ergebnisse der statistischen Auswertungen der klinischen Daten und der Ergebnisse der molekularen Analysen mit dem Überleben.

Testparameter	Anzahl der pos. Patienten	Anzahl Patienten gesamt	Signifikanz	relatives Risiko für die Patienten am Tumor zu versterben
Kaplan-Meier-Analysen				
▪ CA 15-3-Expression erhöht	$n = 14$	$n = 39$	$P = 0,034$	
▪ FHIT-Methylierung im Tumor	$n = 2$	$n = 17$	$P = 0,005$	
▪ CK+ - Tumorzellen nach OP	$n = 4$	$n = 93$	$P = 0,024$	
Cox-Regressions-Analysen				
▪ CA 15-3-Expression erhöht	$n = 12$	$n = 33$	$P = 0,035$	RR = 15,9
▪ Hormontherapie (Aromatasehemmer)				
Univariat	$n = 10$	$n = 116$	$P = 0,129$	RR = 3,5
multivariat	$n = 10$	$n = 116$	$P = 0,149$	RR = 3,7
▪ CK+ -Tumorzellen nach OP				
Univariat	$n = 4$	$n = 93$	$P = 0,042$	RR = 4,8
Multivariat	$n = 4$	$n = 93$	$P = 0,271$	RR = 3,5
▪ FHIT-Methylierung im Tumor				
Univariat	$n = 2$	$n = 17$	$P = 0,023$	RR = 10
multivariat	$n = 2$	$n = 17$	$P = 0,257$	RR = 6,8

Tab. 4 – 6 Übersicht über die Ergebnisse der Kaplan-Meier- und Cox-Regressions-Analysen für die MMK.

Es konnte in Kaplan-Meier-Analysen (Log Rank-Test: $P = 0,024$) und Cox-Regressionsanalysen eine Assoziation des Überlebens mit dem Auftreten Zytokeratin-positiver Tumorzellen nach der Primäroperation festgestellt werden. Patienten mit CK+-Zellen im Blut nach der Operation hatten ein 4-Jahresüberleben von 33,3% (Standardfehler $\pm 0,27$) im Gegensatz zu einer Überlebensrate von 82,1% (Standardfehler $\pm 0,05$) bei Patienten ohne CK+-Zellen nach der Operation (Abb.4-14). Die schlechtere Prognose bestätigte sich auch in der Cox-Regressionsanalyse. Sowohl univariat als auch multivariat war ein deutlich erhöhtes Risiko für Patientinnen mit CK+-Zellen in den Blutproben nach der Entfernung des Primärtumors zu beobachten (Tab. 4-6).

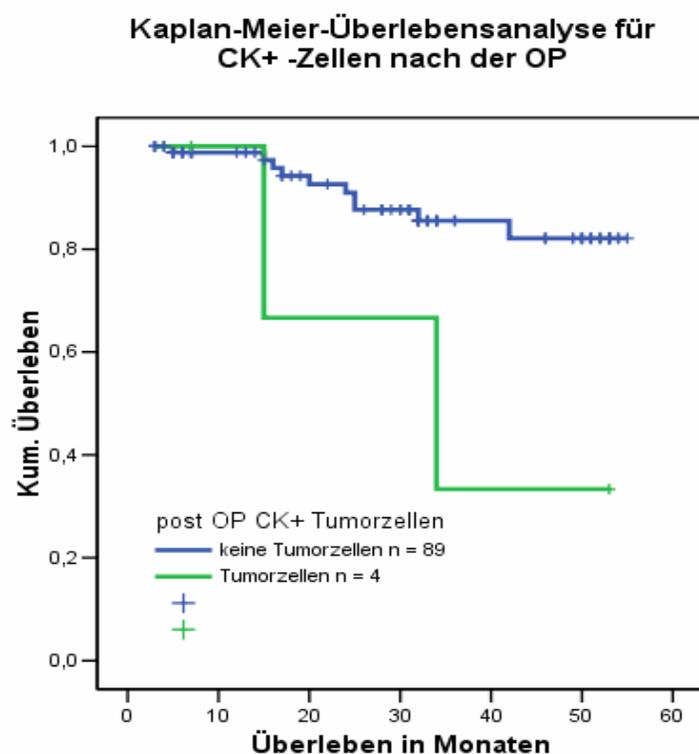


Abb. 4 – 14 Kaplan-Meier-Analyse: Schlechtere Prognose für Patientinnen, die nach der Primärtumoroperation CK+-Zellen im Blut aufweisen.

Log Rank-Test: $P = 0,024$

Cox-Regression: $P = 0,042$; $RR = 4,8$

Patientinnen, die eine Methylierung in der DNA des Tumorgewebes im *FHIT*-Gen aufwiesen, überlebten ebenfalls eine kürzere Zeit (Tab. 4-6). Es waren nur zwei Patientinnen mit einer Methylierung im *FHIT*-Gen. Jedoch sind beide Patientinnen nach zwei Jahren verstorben. Weiterhin korrelierte eine erhöhte CA 15-3-Expression mit dem Überleben. Patientinnen, die vor der Primäroperation eine hohe CA 15-3-Konzentration aufwiesen, hatten eine durchschnittliche Überlebenszeit von 44 Monaten, wohingegen Patienten mit normalen CA 15-3-Konzentrationen im Durchschnitt 53 Monate überlebten. Dies konnte auch in der Cox-Regressions-Analyse ($P = 0,035$) bestätigt werden. Zudem ergab die multivariate Cox-Regressions-Analyse ein 15,9fach erhöhtes Risiko für die Patienten mit einer hohen CA 15-3 Expression am Tumor zu versterben.

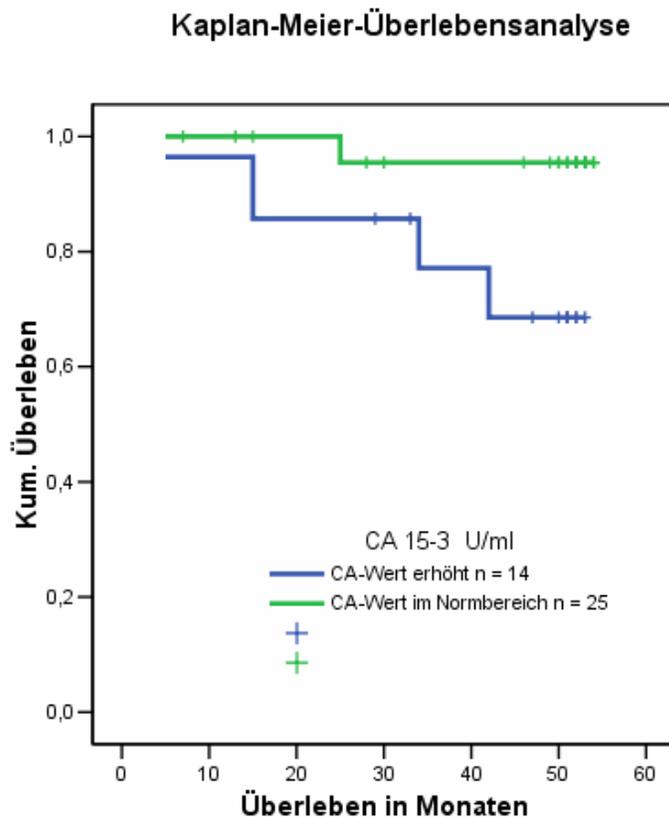


Abb. 4 – 15 Kaplan-Meier-Analyse
Schlechtere Prognose für Patientinnen mit
einer hohen CA 15-3-Expression vor der
OP

Log Rank-Test: $P = 0,034$

Cox-Regression: $P = 0,035$;

$RR = 15,9$

Ein weiterer Faktor für die Prognose war in der vorliegenden Arbeit die Wahl der Hormontherapie. Eine langjährige Hormonbehandlung wurde bei nahezu allen Hormonrezeptor-positiven Tumoren nach Beendigung der Chemotherapie angeschlossen. Dabei wurden die Wirkstoffe Tamoxifen (Antiöstrogen), Zoladex (LHRH-Analogon – lutenisierendes Hormon Releasing Hormon-Analogon) und Aromatasehemmer allein oder in verschiedenen Kombinationen verschrieben. Die Einnahme sollte für die nächsten fünf Jahre täglich in Tablettenform erfolgen. Patienten, die ausschließlich mit einem Aromatasehemmer behandelt wurden, wiesen ein 3,7fach erhöhtes Risiko auf, an ihrem Tumor zu versterben (Abb. 4-15). So überlebten 83,3% (Standardfehler $\pm 0,09$) ohne Hormonbehandlung, 84,7% (Standardfehler $\pm 0,07$) unter Tamoxifen, 95,2% (Standardfehler $\pm 0,04$) mit einer Kombinationstherapie (Tamoxifen und Aromatasehemmer) und lediglich 35,7% (Standardfehler $\pm 0,26$) der Patientinnen mit einer Aromatasehemmertherapie die ersten drei Jahre. Von zehn Patientinnen, die eine Aromatasehemmertherapie erhielten, verstarben bisher drei.

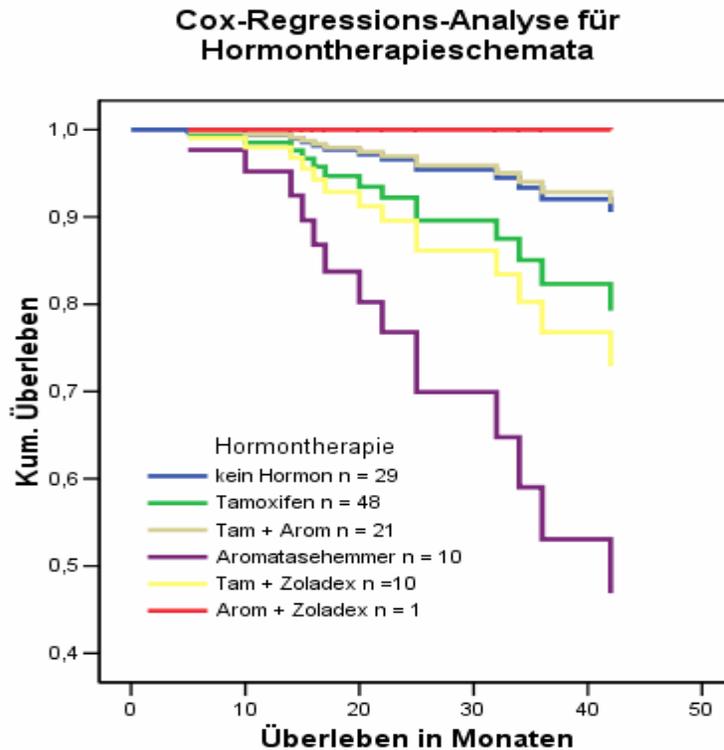


Abb. 4 – 16 Cox-Regressions-Analyse: schlechtere Prognose für Patientinnen, die ausschließlich eine Aromatasehemmertherapie erhielten ($P = 0,149$; $RR = 3,7$).

4.2.5. Benigne Brusterkrankungen

Von 78 Patienten mit benignen Brusterkrankungen standen ebenfalls Blutproben zur Verfügung. Hierbei wurden von 73 Patientinnen nur Blutproben vor der Operation entnommen und von fünf Patientinnen vor und nach der Operation (Tab. 4-7). Bei den gutartigen Erkrankungen der Brust handelte es sich um Fibrose, Fibroadenome, atypische duktale Hyperplasien und in den häufigsten Fällen um Mastopathien. Bei der Fibrose handelt es sich um eine dem Narbengewebe verwandte Gewebeveränderung, die durch Faserreichtum gekennzeichnet ist. Das Fibroadenom ist einer der häufigsten gutartigen Knoten in der Brust und tritt vor allem bei jüngeren Frauen zwischen dem 15. und 30. Lebensjahr und bei 45- bis 55-jährigen Frauen meist vor der Menopause auf. Fibroadenome bestehen aus Binde- und Drüsengewebe, können an mehreren Stellen der Brust auftreten und werden durch Östrogen im Wachstum beeinflusst. Mastopathie wird häufig durch einen Progesteronmangel und damit relativen Überschuss an Östrogen ausgelöst. Es gibt verschiedene Klassifikationen der Mastopathie. Eine Einteilung in Grad I bis III nach Prechtel stuft sie nach dem Entartungsrisiko ein (Blümcke 1995). Grad I mit vermehrten Bindegewebeszellen zeigt keine Neigung zu bösartiger Entwicklung und macht etwa 70% aller Mastopathien aus. Grad II Mastopathien (20%) sind durch gutartige Zellwucherungen im Milchgangsystem gekennzeichnet. Das Krebsrisiko ist gering. Bei Grad III handelt es sich um proliferierende Mastopathien, Wucherungen der Epithelien mit atypischen Zellveränderungen. Das Entartungsrisiko ist in Verbindung mit familiärer Belastung um das 2,5- bis vierfache erhöht.

Von den 78 untersuchten Blutproben wiesen 30 (38,5%) DTZ auf (CK+ oder BI+ oder beide Zelltypen). Die statistischen Analysen ergaben keine Korrelationen zum Überleben oder anderen Parametern. Auffallend war jedoch das häufigere Auftreten von Tumorzellen bei Patientinnen nach der Menopause (Abb. 4-17). Patienten mit benignen Erkrankungen der Brust vor der Menopause wiesen seltener Tumorzellen in den Blutproben auf. Die Anzahl der Tumorzellen lag bei durchschnittlich zwei Zellen (Median drei) je positiver Blutprobe. Von den in dieser Arbeit untersuchten Patientinnen mit benignen Erkrankungen wiesen drei Patientinnen CK+-Zellen in den Blutproben vor der Operation auf. Von diesen Patientinnen hat eine Frau innerhalb von zwei Jahren ein malignes MMK entwickelt. Bei einer weiteren Patientin mit CK+/BI+-Zellen in den untersuchten Blutproben wurde ein Leiomyosarkom (Weichteilsarkom) nachgewiesen. Weitere Patientinnen mit sowohl CK+- als auch BI+-Zellen hatten ein Hämatom, einen anderen Tumor oder eine Mastitis. Der Nachweis von BI+-Zellen in den Blutproben wurde besonders häufig bei Patientinnen mit einer Mastitis (Entzündung der Brustdrüsen) beobachtet (83,3%). Ebenso häufig wurden Tumorzellen in den Blutproben von Patientinnen mit einer atypischen duktalem Hyperplasie (ADH) detektiert (83,3%). Der häufige Nachweis von BI+-Zellen in den Blutproben dieser Patienten zeigt somit bereits das Vorhandensein atypischer veränderter Zellen an. Patienten mit einer Mastopathie wiesen in 32,3% Tumorzellen in ihrem Blut auf.

	CK+	CK+ / BI+	CK- / BI-	BI+	Pos. gesamt / insgesamt
Anzahl der Patienten	2 (2,6 %)	4 (5,1 %)	48 (61,5 %)	24 (30,7 %)	30 (38,5 %) / 78
Anzahl der Blutproben	3 (3,6 %)	3 (3,6 %)	51 (61,4 %)	26 (31,3 %)	32 (38,5 %) / 83
Art der Erkrankung					
Mastopathie	2 (6,5 %)	0	21 (67,7 %)	8 (25,8 %)	10 (32,3 %) / 31
Mastitis	0	1 (16,7 %)	1 (16,7 %)	4 (66,7 %)	5 (83,3 %) / 6
Fibroadenom	0	0	6 (60,0 %)	4 (40,0 %)	4 (40,0 %) / 10
Fibrose	0	0	2 (100 %)	0	0 / 2
ADH	0	0	1 (16,7 %)	5 (83,3 %)	5 (83,3 %) / 6
Hämatom	0	1 (100 %)	0	0	1 (100 %) / 1
Anderer Tumor	1 (20,0 %)	1 (20,0 %)	0	3 (60,0 %)	5 (100 %) / 5
Nicht bekannt	0	0	16 (94,1 %)	1 (5,8 %)	1 (5,8 %) / 17

Tab. 4 – 7 Nachweis von disseminierten Tumorzellen im Blut von Patientinnen mit benignen Brusterkrankungen.

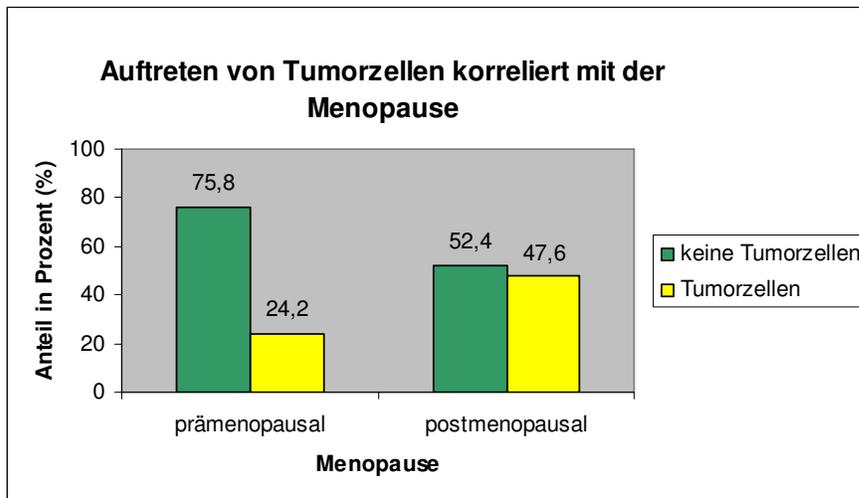


Abb. 4 – 17 Das Auftreten von Tumorzellen (CK+/BI+) korreliert mit der Menopause.

$P = 0,038$, $n = 75$

4.3. Das Nierenzellkarzinom

4.3.1. Analyse der Blutproben

Es wurden insgesamt von 154 NZK-Patienten Blutproben analysiert (Tab. 4-8 im Ergebnisteil). Die geschlechtsspezifische Verteilung der Patienten gliederte sich in 52 (33,8%) weibliche und 102 (66,2%) männliche Personen auf. Von 79 Patienten stand nur eine Blutprobe zur Verfügung, von 69 zwei und von sechs Patienten drei Blutproben. Insgesamt sind damit 233 Blutproben präpariert und begutachtet worden. Von den untersuchten Blutproben konnten bei 96 (41,2%) DTZ nachgewiesen werden. Hierbei wurde das Vorhandensein von CK+- und BI+-Zellen zusammengefasst. Der Nachweis von DTZ im Blut betraf damit 81 (52,6%) der Patienten. Bei 15 Patienten wurden in mehr als einer Blutprobe zirkulierende Tumorzellen detektiert. Die Anzahl der nachgewiesenen DTZ variierte auch bei den NZK-Patienten ähnlich wie bei den MMK-Patientinnen von eins bis 51 (Durchschnitt: sechs, Median: vier Tumorzellen je positiver Blutprobe). Bei den präoperativ entnommenen Blutproben wurden 52 von 140 (37,1%) und bei den postoperativen 35 der 77 (45,5%) Proben positiv auf DTZ getestet.

	CK+	CK+ / BI+	CK- / BI-	BI+	Pos. gesamt / insgesamt
Anzahl der Patienten	7 (4,5 %)	15 (9,7 %)	73 (47,4 %)	59 (38,3 %)	81 (52,6 %) / 154
Überleben					
am Leben	4 (3,4%)	9 (7,6 %)	60 (50,8 %)	45 (38,1 %)	58 (49,1 %) / 118
verstorben	3 (8,3 %)	6 (16,7 %)	13 (36,1 %)	14 (38,9 %)	23 (63,9 %) / 36
Patienten mit 1 BP	4 (5,1 %)	6 (7,6 %)	43 (54,4 %)	26 (32,9 %)	36 (45,6 %) / 79
präoperativ	1 (1,4 %)	4 (5,8 %)	39 (56,5 %)	25 (36,2 %)	30 (43,5 %) / 69
postoperativ	1 (33,3 %)	0	1 (33,3 %)	1 (33,3 %)	2 (66,7 %) / 3
Immuntherapie	0	0	3 (100 %)	0	0 / 3
Nachsorge	2 (50,0 %)	2 (50,0 %)	0	0	4 (100 %) / 4

	CK+	CK+ / BI+	CK- / BI-	BI+	Pos. gesamt / insgesamt
Patienten mit 2 BP	3 (4,3 %)	5 (7,2 %)	31 (44,9 %)	30 (43,5 %)	38 (55,1 %) / 69
prä- und postoperativ	3 (4,5 %)	4 (6,1 %)	31 (47,0 %)	28 (42,4 %)	35 (53,0 %) / 66
postop. und Immunth.	0	1 (33,3 %)	0	2 (66,7 %)	3 (100 %) / 3
Patienten mit 3 BP	0	4 (66,7 %)	0	2 (33,3 %)	6 (100 %) / 6
Anzahl der BP	7 (3,0 %)	17 (7,3 %)	137 (58,8 %)	72 (30,9 %)	96 (41,2 %) / 233
präoperativ	1 (0,7 %)	9 (6,4 %)	88 (62,9 %)	42 (30,0 %)	52 (37,1 %) / 140
postoperativ	4 (5,2 %)	3 (3,9 %)	42 (54,5 %)	28 (36,4 %)	35 (45,4 %) / 77
Immuntherapie	0	4 (30,8 %)	7 (53,8 %)	2 (15,4 %)	6 (46,1 %) / 13
Nachsorge	2 (66,7 %)	1 (33,3 %)	0	0	3 (100 %) / 3
Tumorgröße (pT)					
pT1	2 (2,9 %)	4 (5,7 %)	38 (54,3 %)	26 (37,1 %)	32 (45,7 %) / 70
pT2	1 (6,7 %)	3 (20,0 %)	6 (40,0 %)	5 (33,3 %)	9 (60,0 %) / 15
pT3	4 (6,2 %)	8 (12,3 %)	27 (41,5 %)	26 (40,0 %)	38 (58,4 %) / 65
pT4	0	0	2 (50,0 %)	2 (50,0 %)	2 (50,0 %) / 4
Lymphknotenstatus (pN)					
pN0	6 (5,0 %)	8 (6,7 %)	69 (57,5 %)	37 (30,8 %)	51 (42,5 %) / 120
pN1	1 (4,5 %)	3 (13,6 %)	3 (13,6 %)	15 (68,2 %)	19 (86,4 %) / 22
pN2	0	3 (27,3 %)	1 (9,1 %)	7 (63,6 %)	10 (90,9 %) / 11
pN3	0	0	1 (100 %)	0	0 / 1
Metastasenstatus (pM)					
pM0	6 (5,7 %)	7 (6,7 %)	58 (55,2 %)	34 (32,4 %)	47 (44,8 %) / 105
pM1	1 (2,0 %)	8 (16,3 %)	16 (32,7 %)	24 (49,0 %)	33 (67,3 %) / 49
Tumorgrad (G)					
G1	0	0	9 (60,0 %)	6 (40,0 %)	6 (40,0 %) / 15
G2	2 (2,7 %)	8 (10,7 %)	35 (46,7 %)	30 (40,0 %)	40 (53,3 %) / 75
G3	5 (7,9 %)	7 (11,1 %)	29 (46,0 %)	22 (34,9 %)	34 (54,0 %) / 63
G4	0	0	0	1 (100 %)	1 (100 %) / 1

Tab. 4 – 8 *Darstellung der klinischen Daten und das Auftreten von DTZ bei den NZK-Patienten.*

Die statistische Auswertung ergab eine signifikante Korrelation zwischen dem Auftreten von Tumorzellen (CK+/BI+) im Blut und dem Lymphknotenstatus ($P < 0,001$; Abb. 4-18; Tab. 4-9). BI+-Zellen machen dabei den Hauptanteil aus, da der Nachweis dieser Tumorzellen allein, bereits stark signifikant mit dem Auftreten von LKM korrelierte ($P < 0,001$). Eine signifikante Korrelation des Auftretens von Tumorzellen (CK+/BI+) im Blut unabhängig vom Entnahmezeitpunkt (präOP, postOP) wurde auch zum Metastasenstatus gefunden ($P = 0,014$; Abb. 4-19). BI+-Zellen haben hierbei ebenso den entscheidenden Anteil ($P = 0,003$). Von 49 Patienten, die Metastasen entwickelt haben, wiesen 33 (67,3%) schon frühzeitig Tumorzellen in ihrem Blut auf. Es war jedoch auffällig, dass auch bei 44,8% der Patienten,

bei denen bisher keine Metastasen nachgewiesen wurden, Tumorzellen (CK+/BI+) in ihrem Blut detektiert wurden. Es ist aber nicht auszuschließen, dass diese Patienten zu einem späteren Zeitpunkt noch Metastasen entwickeln. Weiterhin korrelierte das Überleben der Patienten mit dem Auftreten von CK+-Zellen. Dies wurde in der Kaplan-Meier-Überlebensanalyse (Log Rank-Test: P = 0,033; Abb. 4 –20) und in der multivariaten Cox-Regressions-Analyse gezeigt (P = 0,049; RR 2,7). Von zehn Patienten, bei denen vor der Entfernung des Primärtumors CK+-Zellen in ihrem Blut nachgewiesen wurden, sind fünf bereits verstorben (Tab. 4 – 10). Das durchschnittliche 3-Jahresüberleben war für Patienten mit CK+-Zellen im Blut 33,3% (Standardfehler ± 0,18) im Vergleich zu 70,3% (Standardfehler ± 0,05) für Patienten ohne CK+-Zellen. In der multivariaten Cox-Regressions-Analyse unter Einbeziehung der Tumorgröße und des Metastasenstatus ergab sich ein 2,7fach erhöhtes Risiko für Patienten mit CK+-Zellen vor der Primäroperation, an ihrem Tumor zu versterben. Die schlechtere Prognose für Patienten mit CK+-Zellen nach der Entfernung des Primärtumors war ebenfalls eindeutig. So wiesen Patienten mit CK+-Zellen ein 3-Jahresüberleben von 44,4% (Standardfehler ± 0,22) im Vergleich zu 77,3% (Standardfehler ± 0,05) Überlebensrate bei Patienten ohne CK+-Zellen. In der multivariaten Cox-Regressions-Analyse betrug das relative Risiko 4,3. Damit deutet das Auftreten von CK+-Zellen nach der Entfernung des Primärtumors auf eine noch schlechtere Prognose hin im Vergleich zum Auftreten von CK+-Zellen vor der Operation (Tab. 4-10).

Testparameter	X ² (Chi ²) - nach Pearson	Anzahl der Patienten
Auftreten von Tumorzellen		
▪ Auftreten von blauen Tumorzellen (BI+) korreliert mit pN	P < 0,001	n = 153
▪ Auftreten von Tumorzellen (CK+/BI+) korreliert mit pN	P < 0,001	n = 153
▪ Auftreten von Tumorzellen (CK+/BI+) korreliert mit pM	P = 0,014	n = 152
▪ Auftreten von blauen Tumorzellen (BI+) korreliert mit pM	P = 0,003	n = 152

Tab. 4 – 9 Ergebnisse der statistischen Auswertungen zwischen dem Auftreten von Tumorzellen im Blut und den klinischen Daten der NZK-Patienten.

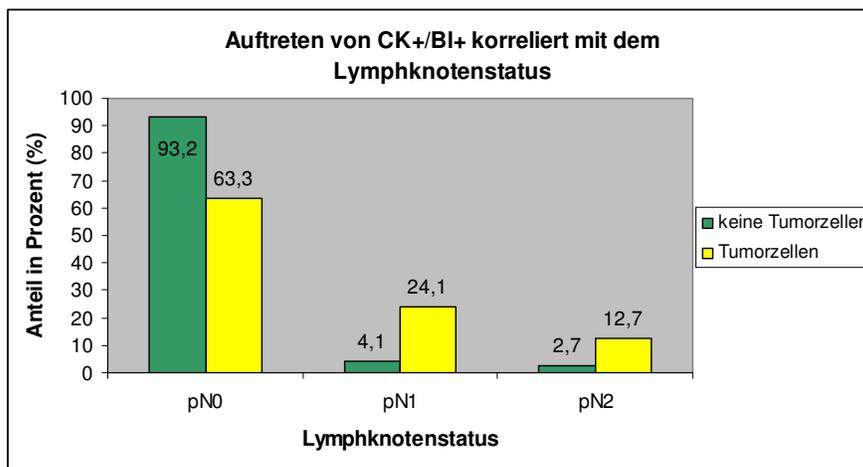


Abb. 4 – 18 Das Auftreten von CK+/BI+-Zellen insgesamt korreliert mit dem Lymphknotenstatus.

P < 0,001

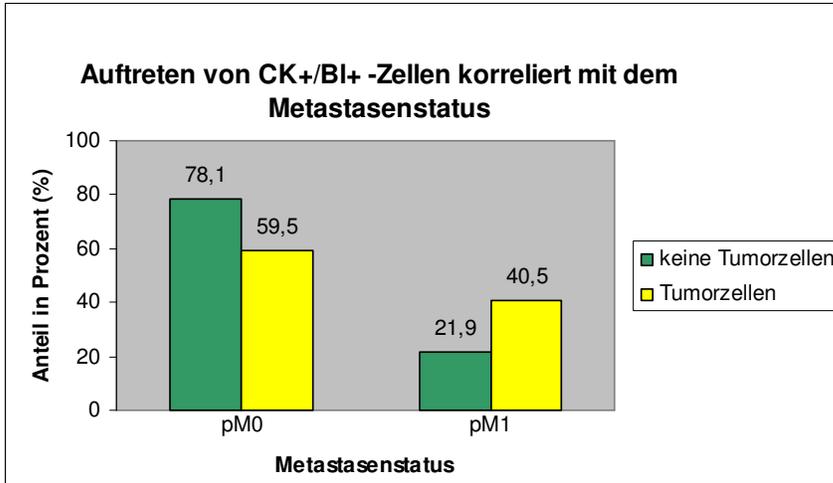


Abb. 4 – 19 Das Auftreten von CK+/BI+-Zellen insgesamt korreliert mit dem Metastasenstatus.

$P = 0,014$

Testparameter	Anzahl der pos. Patienten	Anzahl Patienten gesamt	Signifikanz	relatives Risiko für die Patienten
Kaplan-Meier-Analyse				
▪ CK+ -Tumorzellen vor OP	n = 10	n = 140	P = 0,033	
▪ CK+ -Zellen nach OP	n = 7	n = 77	P = 0,139	
Cox-Regressions-Analyse				
▪ CK+ -Tumorzellen vor OP				
Univariat	n = 10	n = 139	P = 0,042	RR = 2,7
Multivariat	n = 10	n = 139	P = 0,049	RR = 2,7
▪ CK+ -Zellen nach OP				
Univariat	n = 7	n = 77	P = 0,153	RR = 2,5
multivariat	n = 7	n = 77	P = 0,036	RR = 4,3

Tab. 4 – 10 Ergebnisse der Kaplan-Meier-Analyse und der Cox-Regressions-Analyse für das Auftreten von CK-Zellen+ vor der Primärtumoroperation von NZK-Patienten.

Kaplan-Meier-Analyse für CK+ -Zellen vor Primäroperation

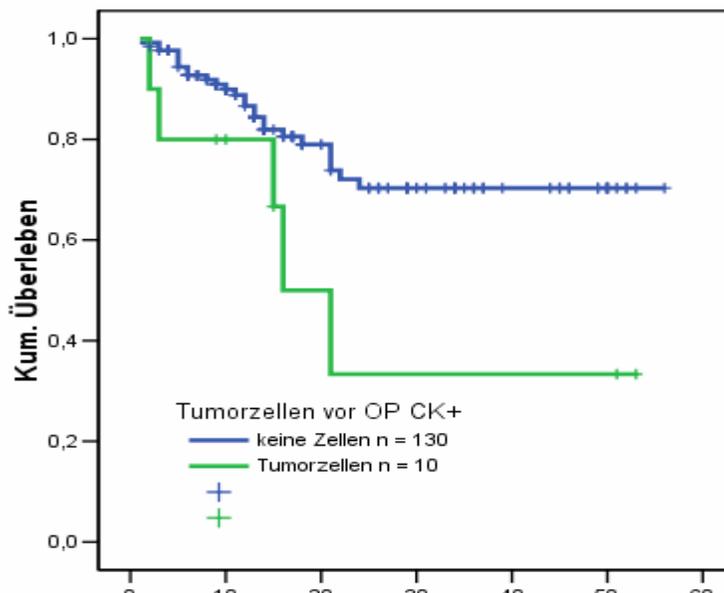


Abb. 4 – 20 Kaplan-Meier-Analyse: schlechtere Prognose für Patienten mit CK+-Zellen im Blut vor der Primäroperation.

Log Rank Test: $P = 0,033$
 Cox-Regression: $P = 0,049$;
 RR = 2,7

4.3.2. Molekulargenetische DNA-Analysen

4.3.2.1. MSI- und LOH-Analysen

Für die DNA-Analysen stand von 27 Patienten mit NZK Gefriergewebe zur Verfügung. Von weiteren 71 Patienten wurde DNA aus dem archivierten Paraffinmaterial isoliert. In allen 98 Fällen erfolgte die DNA-Präparation aus dem Tumorgewebe und dem autologen Normalgewebe. Bei der Aufarbeitung der Blutproben konnte für jeden Patienten auch DNA aus den Lymphozyten gewonnen werden. Wiesen die Patienten auch Metastasen auf und waren diese als Paraffinmaterial vorhanden, so wurde diese DNA ebenfalls isoliert (36 Metastasen von 30 Patienten).

An den Gefriergewebeproben sind MSI- und LOH-Analysen mit den Mikrosatellitenmarkern RH66312, WI-19554, D3S3118, RH91127 und STS-N24898 durchgeführt worden. Diese Marker befinden sich in Nähe des *RASSF1A*-Gens auf dem Chromosom 3p21. Die Region 3p21 ist bei NZK-Patienten sehr häufig von genetischen Veränderungen betroffen. Für die untersuchten Gefriergewebe ergaben sich keine Veränderungen der DNA. Diese MSI- und LOH-Analysen wurden deshalb nicht am Paraffinmaterial durchgeführt. Anschließend sind weitere Analysen mit den Mikrosatellitenmarkern p53 Alu, Rb und myc-L1 vorgenommen worden. Diese wurden sowohl für die Gefrierproben als auch für die Paraffinproben durchgeführt. Aufgrund von Schwierigkeiten bei der Bearbeitung des Paraffinmaterials konnten noch nicht alle DNA-Proben für die Marker getestet werden. Bisher liegen die Daten von 85 Patienten für den Marker Rb vor, von 68 Patienten für den Marker myc-L1 und von 57 Patienten für p53 Alu. Diese Daten schließen die Ergebnisse für alle Gefrierproben ein, für die die Analysen mit allen Mikrosatellitenmarkern vollständig abgeschlossen werden konnten. Die Ergebnisse der MSI- und LOH-Analysen für die NZK-Patienten sind in Tab. 8-4 (im Anhang) dargestellt. Als die häufigsten Veränderungen für alle drei Marker sind LOH zu beobachten gewesen. Die wenigsten genetischen Alterationen wies der Marker p53 Alu auf. Vier Patienten von insgesamt 57 (7,0%) hatten einen LOH in der Tumorgewebe-DNA des p53 Alu-Markers (Abb. 4-21).

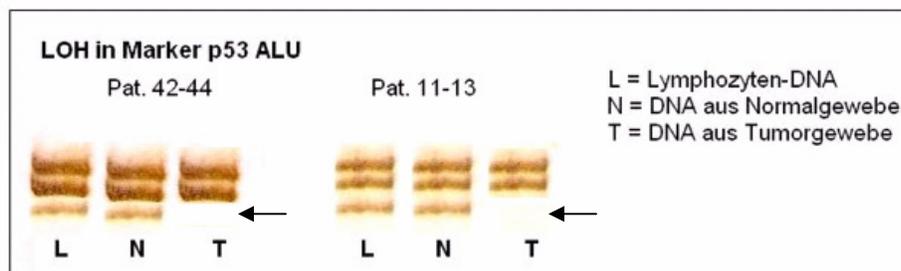


Abb. 4 – 21 Zwei Beispiele für einen LOH im Tumor beim Mikrosatellitenmarker p53 Alu. Verluste im Tumorgewebe wurden durch Pfeile dargestellt.

Weiterhin konnte im Marker p53 Alu bei drei von 57 (5,3%) Patienten eine Mikrosatelliteninstabilität nachgewiesen werden. Für den Mikrosatellitenmarker myc-L1 wurden LOH bei drei (4,4%) und MSI bei zwei (2,9%) von 68 Patienten in der untersuchten DNA detektiert. Die Veränderungen betrafen auch hier jeweils das Tumorgewebe. Jedoch konnte auch in der DNA einer Metastase aus dem Nierengewebe eines NZK-Patienten ein Heterozygotieverlust beobachtet werden (Abb. 4-22).

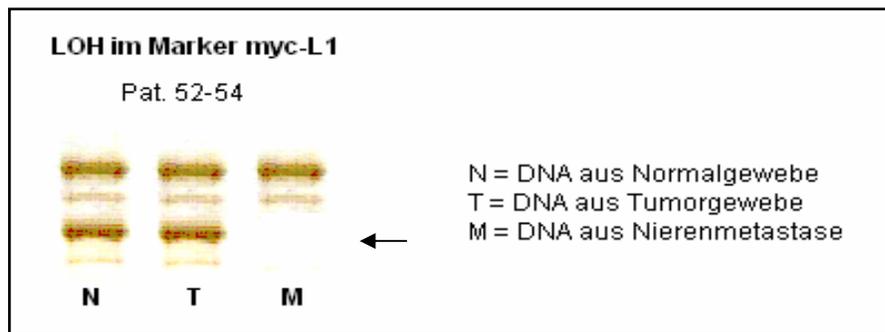


Abb. 4 – 22 Beispiel für einen LOH im myc-L1 Marker in einer Nierenmetastase eines NZK-Patienten.

Die häufigsten genetischen Veränderungen betrafen den Rb-Mikrosatellitenmarker. Ein LOH wurde bei acht (9,4%) von 85 untersuchten Patienten-DNA-Proben nachgewiesen. Mikrosatelliteninstabilitäten traten in der DNA von drei (3,6%) Personen jeweils in den Metastasen auf.

Von neun Patienten gelang die DNA-Isolation aus den disseminierten Tumorzellen. Aufgrund der aufwendigen Isolation konnten im Rahmen der vorliegenden Arbeit keine weiteren DTZ von NZK-Patienten isoliert werden. Für fünf (55,6%) von neun Patienten wurde eine Veränderung in der DTZ-DNA gefunden. Der Vergleich der DNA des Tumor- und Normalgewebes mit der DNA der DTZ ergab für den p53 Alu-Marker keine Veränderungen. Dagegen gelang der Nachweis eines LOH und eines MSI für den Rb-Locus in der DTZ-DNA bei zwei Patienten (Abb. 4-23).

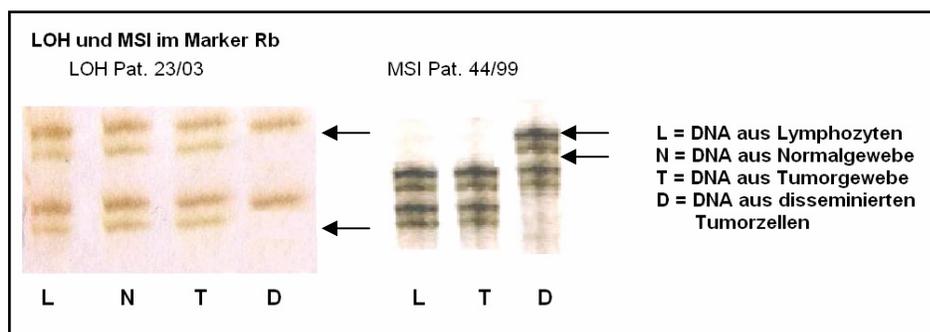


Abb. 4 – 23 Nachweise von LOH und MSI in den DTZ von NZK-Patienten für den Marker Rb.

Beide Patienten, die genetische Alterationen in der DNA der DTZ im Mikrosatellitenmarker Rb hatten, wiesen auch bei myc-L1 Veränderungen in Form von MSI auf (nicht gezeigt). Weiterhin hatten auch zwei andere Patienten MSI im myc-L1-Marker in der DNA der DTZ im

Vergleich zum Tumorgewebe (Abb. 4-24; Tab. 8-4). Ein LOH in der DTZ-DNA in einem anderen Fall machte deutlich, dass Veränderungen in der DNA der DTZ im Marker myc-L1 häufig auftraten (nicht dargestellt).

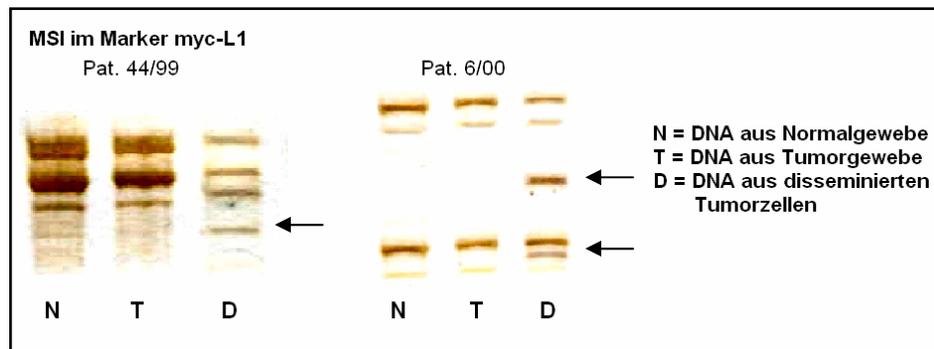


Abb. 4 –24 Nachweise von MSI in den DTZ von NZK-Patienten für den Marker myc-L1.

4.3.2.2. Methylierungsanalysen

Die genomische DNA der NZK konnte auch in Methylierungsanalysen untersucht werden. Diese wurden an den Promotorregionen der Gene *RASSF1A*, *p16*, *rar-β* und *FHIT* durchgeführt. Tabelle 4-11 führt die Häufigkeiten einer DNA-Methylierung in den einzelnen Gewebearten auf. Untersucht wurde die DNA der Lymphozyten, Normal- und Tumorgewebe von insgesamt 98 Patienten. Zudem konnte auch die DNA von 36 Metastasen dieser Patienten in die Analysen mit einbezogen werden. Eine Methylierung des *RASSF1A*-Promotors trat in der DNA des Tumorgewebes in 60,2% und in der DNA des Metastasengewebes in 58,3% der untersuchten Fälle auf. Eine Methylierung in der Normalgewebe-DNA konnte aber auch in 44,9% der Fälle nachgewiesen werden, wobei nur 5% der Lymphozyten-DNA eine *RASSF1A*-Promotormethylierung aufwies. Die Promotorregion des *rar-β*-Gens ist sehr selten im Tumorgewebe (3,1%), Normalgewebe (4,1%) und Lymphozyten (2%) und gar nicht in Metastasen methyliert. Auffallend war eine häufige Methylierung in den Metastasen bei den Genen *p16* (19,4%) und *FHIT* (16,7%). In den MMK traten ähnliche Methylierungsraten für die *RASSF1A*-Promotorregion im Normalgewebe (35,3%) und den Metastasen (66,7%) auf. Die DNA des Tumorgewebes wies dagegen in 94,1% der MMK eine Methylierung des *RASSF1A*-Gens auf. Eine Methylierung von *p16* und *FHIT* in der DNA der Metastasen konnte bei den MMK-Patienten nicht gefunden werden. Dagegen trat die Methylierung dieser Gene in den Metastasen bei den NZK relativ häufig auf. Auch die Methylierung der *rar-β*-Promotorregion in den Metastasen (33,3%) der MMK-Patienten unterschied sich sehr zu den NZK-Patienten (0%).

	Lymphozyten	Normalgewebe	Tumorgewebe	Metastasen
Gesamtzahl untersuchter Gewebe	98	98	98	36
RASSF1A	5 (5,1 %)	44 (44,9 %)	59 (60,2 %)	21 (58,3 %)
p16	11 (11,2 %)	6 (6,1 %)	10 (10,2 %)	7 (19,4 %)
rar-β	2 (2,0 %)	4 (4,1 %)	3 (3,1 %)	0 (0,0 %)
FHIT	8 (8,2 %)	5 (5,1 %)	5 (5,1 %)	6 (16,7 %)

Tab. 4 –11 Häufigkeiten der Methylierung der Promotorregionen in den NZK-Proben.

4.3.2.3. Der SNP 309-Polymorphismus

Auch bei den NZK-Patienten wurde der Status für den SNP309-Polymorphismus bestimmt. Von 60 untersuchten Personen waren 14 (23,3%) homozygot Wildtyp mit dem T/T-Genotyp. Den Hauptanteil machte der heterozygote T/G-Genotyp mit 45 (75%) Personen aus und nur ein Patient (1,6 %) hatte den homozygoten G/G-Genotyp. Der SNP309-Polymorphismus korrelierte signifikant mit dem Erkrankungsalter ($P = 0,014$, Tab. 4-12; Abb. 4-25). Patienten mit dem Wildtyp T/T-Genotyp sind nicht vor dem 61. Lebensjahr erkrankt. Wohingegen 15 von 45 (33,3%) Personen mit dem T/G-Genotyp bereits vor dem 61. Lebensjahr NZK entwickelt haben. Patienten mit dem T/G-Genotyp sind im Durchschnitt acht Jahre früher an NZK (Durchschnitt: 63 Jahre) erkrankt, als Patienten mit dem Wildtypgenotyp (Durchschnitt: 71 Jahre). Da nur ein Patient homozygot den G/G-Genotyp hatte, kann keine Aussage dazu getroffen werden, ob Personen dieses Genotyps möglicherweise noch eher erkranken. Bei diesem einen Fall erkrankte der Patient im Alter von 49 Jahren. Alle Patienten, die unter 61 Jahren einen Tumor bekamen, hatten den SNP309-Polymorphismus heterozygot oder homozygot.

Werden die Patienten nach dem Geschlecht getrennt untersucht, so ergibt sich für die männlichen NZK-Patienten ebenso eine signifikante Korrelation des Erkrankungsalters zum SNP309-Polymorphismus ($P = 0,024$). Männliche Patienten mit dem T/T-Genotyp erkrankten im Durchschnitt mit 71 Jahren, männliche Patienten mit dem T/G-Genotyp mit 61 Jahren. Für die weiblichen Patienten konnte keine Korrelation zwischen dem Erkrankungsalter und dem SNP309-Polymorphismus festgestellt werden. Jedoch wurde der SNP309-Status nur von 20 Patientinnen bestimmt. Vier von diesen 20 wiesen den T/T-Genotyp auf. Diese erkrankten im Durchschnitt mit 70 Jahren. Patientinnen mit dem T/G-Genotyp erkrankten durchschnittlich mit 66 Jahren.

Testparameter	X ² (Chi ²) - nach Pearson	Anzahl der Patienten
▪ Erkrankungsalter der Patienten (ab 61 Jahre) korreliert mit dem SNP309-Polymorphismus	P = 0,014	n = 60
▪ Erkrankungsalter der männlichen Patienten korreliert mit dem SNP309-Polymorphismus	P = 0,024	n = 40

Tab. 4 – 12 Erkrankungsalter der NZK-Patienten in Bezug zum SNP309-Polymorphismus.

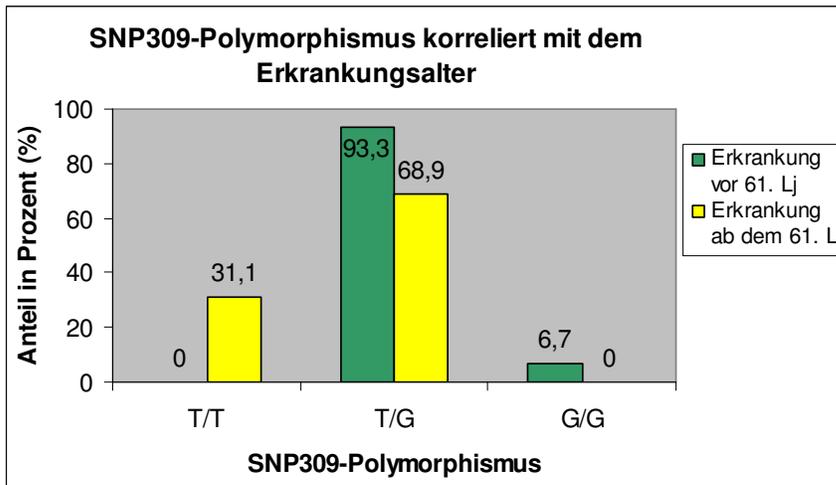


Abb. 4 – 25 Der SNP309 - Polymorphismus korreliert mit dem Erkrankungsalter.

P = 0,014

4.3.3. Protein-Analysen

Für die Proteinanalysen von uPA, uPAR, PAI-1 und Survivin (Tab. 4-13) wurde von 39 NZK-Patienten das Gesamtprotein aus dem Tumorgewebe und dem autologen Normalgewebe isoliert. Dieses wurde anschließend in ELISA-Studien eingesetzt. Für Survivin konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen einer Überexpression und einer Normalexpression an Survivin im Tumor festgestellt werden. Eine niedrigere Konzentration an PAI-1 im Tumor im Vergleich zum autologen Normalgewebe zeigte eine tendenziell schlechtere Prognose für die Patienten. Eine Überexpression von uPA korrelierte sowohl mit der TumorgroÙe pT (P = 0,020; Abb. 4-26), als auch mit dem Metastasenstatus pM (P = 0,043; Abb. 4-27). Patienten mit kleineren Tumoren und/oder ohne bekannte Metastasen hatten selten eine uPA-Überexpression im Tumor. Weiterhin stand eine Erhöhung der uPA-Konzentration im Zusammenhang mit dem Tumorgrad (P = 0,038). Je weniger differenziert der Primärtumor war, umso höher war auch die Proteinkonzentration an uPA. Eine Überexpression an uPAR im Tumor zeigte ebenso Korrelationen zur TumorgroÙe (P = 0,028), zum Metastasenstatus (P = 0,007) und zum Tumorgrad (P = 0,041). Zusätzlich korrelierte eine erhöhte uPAR-Konzentration im Tumor grenzwertig auch mit dem Auftreten von BI+-Tumorzellen in den Blutproben (P = 0,051; Abb. 4-28). Der Entnahmezeitpunkt war dabei nicht entscheidend.

In Kaplan-Meier-Analysen korrelierte die Überexpression an uPAR im Tumor mit einer schlechteren Prognose. Dies war nicht signifikant ($P = 0,118$), jedoch betrug das 3-Jahresüberleben der Patienten mit einer uPAR-Überexpression 53,5% (Standardfehler $\pm 0,13$) im Vergleich zu 83,3% (Standardfehler $\pm 0,07$) bei den Patienten mit normaler Expression an uPAR im Tumor. Die univariate Cox-Regressions-Analyse erbrachte ein 2,8fach erhöhtes Risiko für die Patienten mit einer erhöhten uPAR-Konzentration im Tumor (Tab. 4-13).

Testparameter	X^2 (Chi ²) - nach Pearson
uPA-Konzentration im Tumor erhöht	
▪ Erhöhte uPA-Konzentration im Tumor korreliert mit pT	$P = 0,020$
▪ Erhöhte uPA-Konzentration im Tumor korreliert mit pM	$P = 0,043$
▪ Erhöhte uPA-Konzentration im Tumor korreliert mit G	$P = 0,038$
uPAR-Konzentration im Tumor erhöht	
▪ Erhöhte uPAR-Konzentration im Tumor korreliert mit pT	$P = 0,028$
▪ Erhöhte uPAR-Konzentration im Tumor korreliert mit pM	$P = 0,007$
▪ Erhöhte uPAR-Konzentration im Tumor korreliert mit G	$P = 0,041$
▪ Erhöhte uPAR-Konzentration im Tumor korreliert mit dem Auftreten von großen blauen Tumorzellen	$P = 0,051$
Kaplan-Meier-Analysen	
▪ Erhöhte uPAR-konzentration im Tumor	$P = 0,118$
Cox-Regressions-Analyse	
Univariat (RR = 2.8)	$P = 0,137$

Tab. 4 – 13 Ergebnisse der statistischen Auswertungen zwischen einer erhöhten uPA- bzw. uPAR-Expression im Tumor und den klinischen Daten (Anzahl der untersuchten NZK-Patienten $n = 39$).

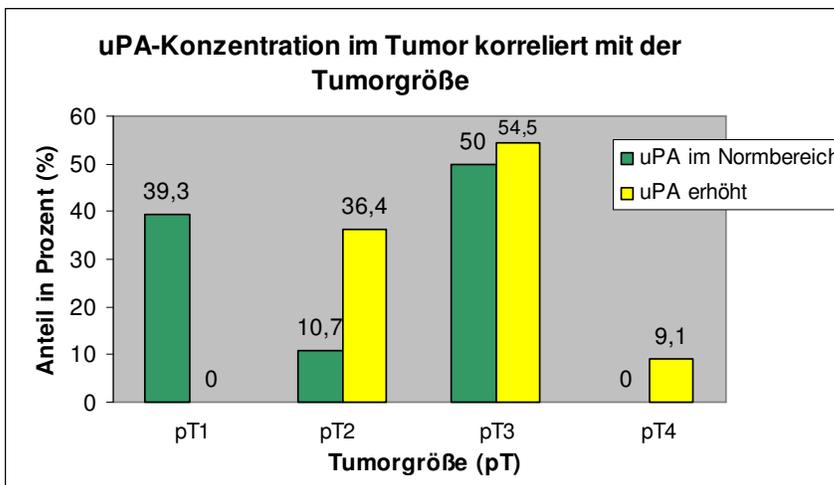


Abb. 4 – 26 Erhöhte uPA-Konzentration im Tumor korreliert mit der TumorgroÙe .

$P = 0,020$

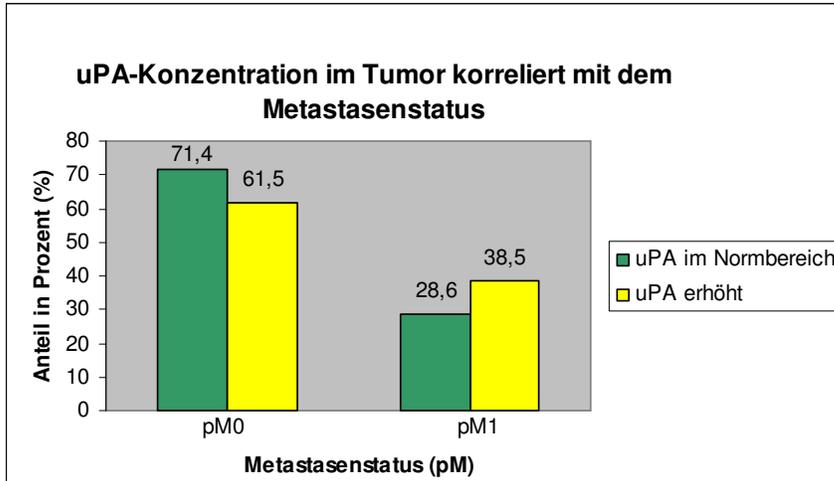


Abb. 4 – 27 Erhöhte uPA-Konzentration im Tumor korreliert mit dem Metastasenstatus.

$P = 0,043$

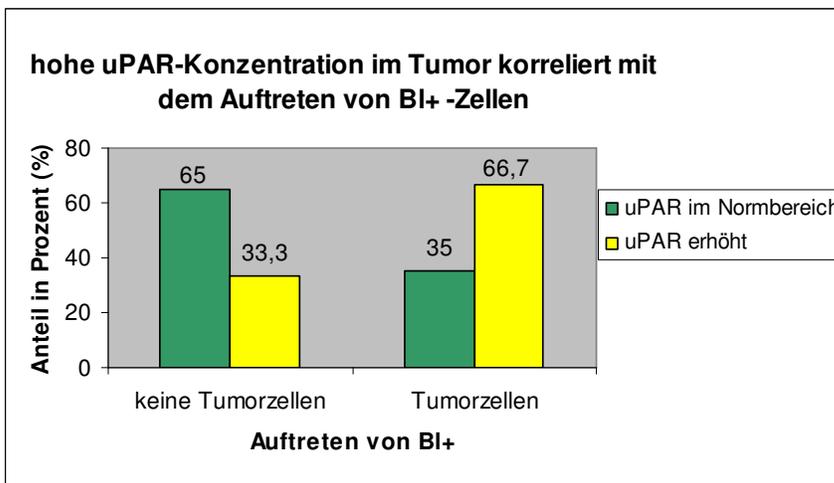


Abb. 4 – 28 Erhöhte uPAR-Konzentration im Tumor korreliert mit dem Auftreten von BI+ -Zellen in den Blutproben

$P = 0,051$

4.3.4. HLA-Typisierung

4.3.4.1. Das HLA-System

Die medizinische Wissenschaft hat in den letzten Jahrzehnten große Fortschritte bei der Transplantation von Organen gemacht. Ein wichtiger Bestandteil ist dabei die Unterdrückung von Abstoßungsreaktionen. Hierbei spielt das HLA-System (human leukocyte antigen) eine entscheidende Rolle. Das Ziel der HLA-Serologie ist die Identifizierung von Spenderorganen, deren Gewebeeigenschaften denen des Patienten so stark ähneln, dass keine gefährlichen Abstoßungsreaktionen auftreten. Das HLA-System ist genetisch auf dem kurzen Arm von Chromosom 6 (6p) verankert. Im Falle dieser Gene werden beide Chromosomen abgelesen und exprimiert (codominante Expression). Die Antigene, die vom HLA-System codiert werden, lassen sich auf der Grundlage ihrer Struktur und Funktion in drei Klassen einteilen: I, II und IV. Klasse III-Gene kodieren Moleküle des Komplementsystems und haben mit dem HLA-System im engeren Sinne nichts zu tun. Sie werden deshalb hier nicht näher besprochen. Die molekulargenetische Analyse der chromosomalen Regionen für die Klasse I- und Klasse II-Moleküle führte zur Entdeckung vieler nicht funktioneller Gene (z.B. Pseudogene). Abb. 4-29 zeigt eine molekulargenetische Karte des HLA-Gebiets. Darin sind

Selbst-Markern. Sie spielen auch bei der Wechselwirkung zwischen T-Helferzellen und B-Lymphozyten eine Rolle (van den Tweel et al. 1999).

4.3.4.2. Ergebnisse der HLA-Typisierung beim Nierenzellkarzinom

Im Rahmen dieser Arbeit wurde von 91 NZK-Patienten in Zusammenarbeit mit dem HLA-Labor des Instituts für Medizinische Immunologie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg (Leiter: DM Altermann) der HLA-Typ bestimmt. Ziel dieser Bestimmungen war es, herauszufinden, ob es zwischen der Entstehung von NZK und bestimmten HLA-Typen Korrelationen gibt. Als Vergleich standen die Daten von 203 gesunden Blutspendern (Kontrollen) zur Verfügung. Eine Übersicht gefundener HLA-Einzelspezifitäten bestimmter HLA-Loci wurde in Abbildung 4-30 zusammengefasst. Es wurden die Phänotypfrequenzen berechnet. Dafür wurden pro Patient zwei Allele berücksichtigt und diese getrennt in die Berechnungen eingebracht (Gesamtsumme: 200 %).

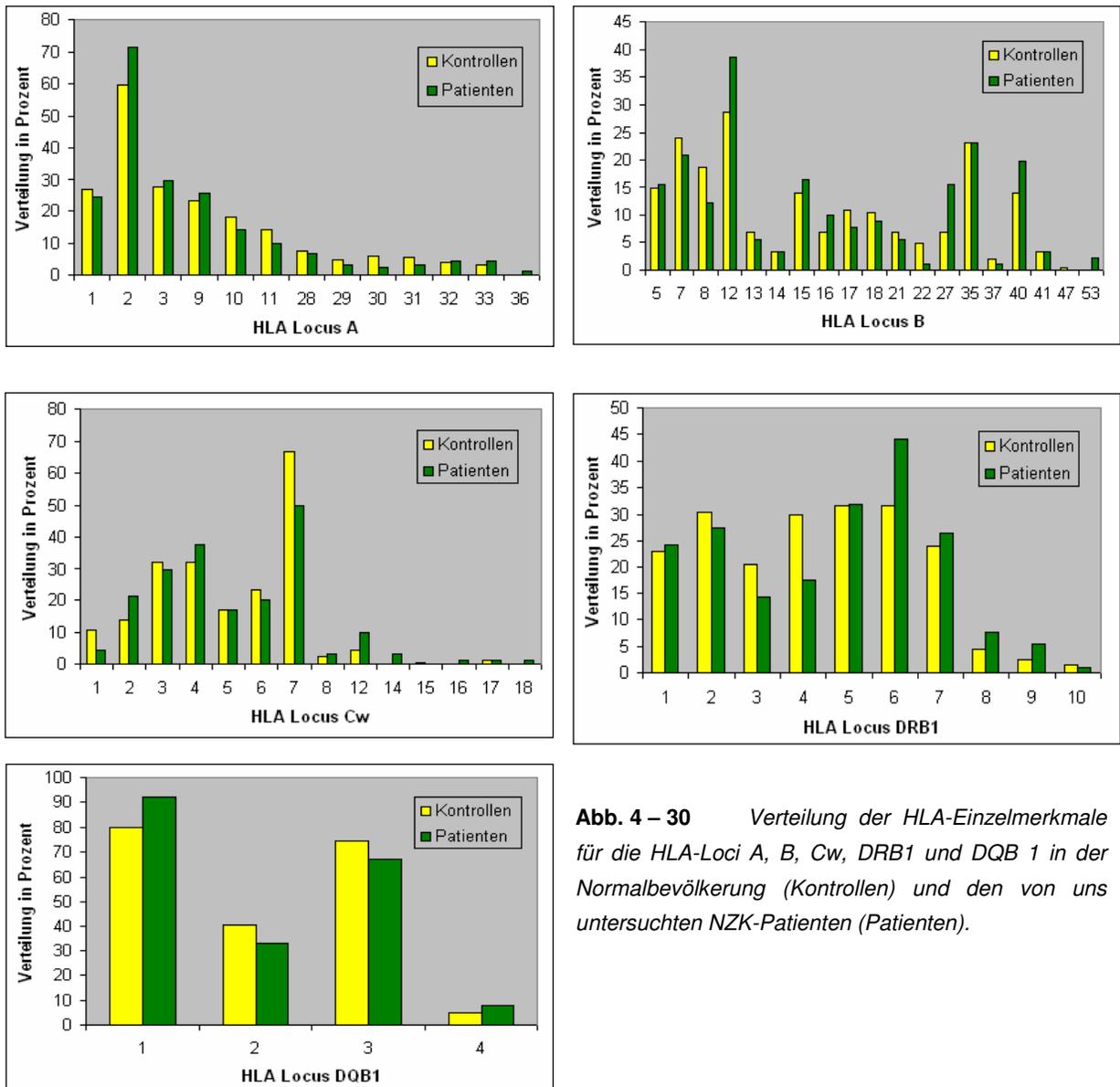


Abb. 4 – 30 Verteilung der HLA-Einzelmerkmale für die HLA-Loci A, B, Cw, DRB1 und DQB 1 in der Normalbevölkerung (Kontrollen) und den von uns untersuchten NZK-Patienten (Patienten).

Wesentliche Unterschiede in den Häufigkeitsverteilungen der HLA-Merkmale zwischen den Kontrollen und Patienten ließen sich nachweisen. Es waren bei Patienten gegenüber den Kontrollen die Häufigkeiten deutlich erhöht für die HLA-Merkmale: B*27, Cw*12, DRB1*06 und DQB1*01. Demgegenüber waren bei den Kontrollen gegenüber den Patienten die Häufigkeiten deutlich erhöht für die HLA-Merkmale: Cw*07 und DRB1*04. Für die Allele Cw*07, Cw*12 und DRB1*04 ergaben sich signifikante Unterschiede zwischen den Kontrollen und den Patienten (Tab. 4-14). Patienten, die das Allel HLA-Cw*07 aufwiesen und Patienten mit dem HLA-DRB1*04 Allel kamen signifikant weniger häufig vor, als nach der Normalverteilung zu erwarten wäre. Das Vorhandensein dieser Allele könnte das Risiko für NZK verringern. Für Patienten mit dem Allelen HLA-Cw*12 und HLA-B*27 ergaben sich erhöhte Risiken (RR = 2,3) an einem NZK zu erkranken. Die Ergebnisse wurden mit Hilfe der Bonferroni-Ungleichheitsmethode korrigiert, um innerhalb eines HLA-Locus entstehende zufällige Assoziationen möglichst auszuschließen.

Testparameter	Anzahl Kontrollen mit dem HLA-Typ	Anzahl Patienten mit dem HLA-Typ	X ² (Chi ²) - nach Pearson	Exakter Test nach Fisher	Odds Ratio
HLA-Cw*07	140 von 404 (34,6%)	45 von 180 (25%)	P = 0,042	P = 0,042	RR = 0,7
HLA-Cw*12	9 von 404 (2,2%)	9 von 180 (5%)	P = 0,073	P = 0,116	RR = 2,3
HLA-B*27	14 von 406 (3,4%)	14 von 182 (7,7%)	P = 0,025	P = 0,035	RR = 2,3
HLA-DRB1*04	61 von 406 (15%)	16 von 182 (8,8%)	P = 0,038	P = 0,047	RR = 0,5

Tab. 4 – 14 Ergebnisse der statistischen Auswertungen zwischen den Kontrollen und den NZK-Patienten für die einzelnen HLA Loci.

Insgesamt sind bisher 36 von 154 NZK-Patienten verstorben. Der HLA-Typ konnte dabei von 13 der 36 verstorbenen Patienten bestimmt werden. Das erhöhte Risiko für das Allel HLA-Cw*12 zeigt sich auch bei einer Korrelation zum Überleben. Von neun NZK-Patienten mit diesem Allel sind bereits vier verstorben (44,4%). Dagegen zeigen Patienten mit HLA-Cw*04 ein besseres Überleben. Von 34 NZK-Patienten mit diesem Alleltyp sind bisher zwei verstorben (5,9%). Bei den anderen Alleltypen variierte die Sterberate zwischen 10,5% und 30%. Aus den HLA-Daten lassen sich HLA-Typen ableiten, die mit einem schlechteren Überleben in Verbindung waren. So trat bei zehn von 13 (77%) Verstorbenen das HLA-A*02 oder HLA-A*24 Allel auf. HLA-Cw*03 und HLA-Cw*12 zeigten ebenfalls eine Korrelation zum schlechteren Überleben. Diese Alleltypen wiesen neun von 13 (69,2%) Verstorbenen auf. Zusätzlich konnte auch auf dem HLA-DQB1 Locus zwei Allele festgestellt werden, die bei den Verstorbenen häufig auftraten. Hierbei handelte es sich um HLA-DQB1*03 und HLA-DQB1*06, die bei zwölf von 13 (92,3%) Patienten nachgewiesen wurden.

4.4. Das Prostatakarzinom

4.4.1. Analyse der Blutproben

In einem Zeitraum von 2½ Jahren wurde das Blut von 175 Patienten analysiert. Der Anteil der Patienten mit DTZ belief sich dabei auf 52,6%, was einen sehr hohen Positivanteil darstellt (Tab. 4-15). Die Gesamtanzahl der präparierten Blutproben war 248. Von diesen 248 Proben wiesen 104 (41,9%) Tumorzellen auf. Die Anzahl der Tumorzellen in einer Blutprobe variierte von eins bis zehn (Durchschnitt: 4, Median: 4). In einem Einzelfall wurden 28 Tumorzellen in einer Blutprobe gefunden.

	CK+	CK+ / BI+	CK- / BI-	BI+	Pos. gesamt / insgesamt
Anzahl der Patienten	6 (3,4 %)	14 (8,0 %)	83 (47,4 %)	72 (41,1 %)	92 (52,6 %) / 175
Überleben					
am Leben	6 (3,8 %)	10 (6,3 %)	77 (48,7 %)	65 (41,1 %)	81 (51,3 %) / 158
verstorben	0	4 (23,5 %)	6 (35,3 %)	7 (41,1 %)	11 (64,7 %) / 17
Patienten mit 1 BP	1 (1,0 %)	6 (5,9 %)	57 (55,9 %)	38 (37,2 %)	45 (44,1 %) / 102
präoperativ	1 (1,1 %)	5 (5,3 %)	52 (55,3 %)	36 (38,3 %)	42 (44,7 %) / 94
postoperativ	0	1 (12,5 %)	5 (62,5 %)	2 (25,0 %)	3 (37,5 %) / 8
Patienten mit 2 BP	4 (5,5 %)	8 (11,0 %)	26 (35,6 %)	35 (47,9 %)	47 (64,4 %) / 73
Anzahl der BP	10 (4,0 %)	12 (4,8 %)	144 (58,1%)	82 (33,1 %)	104 (41,9 %) / 248
präoperativ	1 (0,6 %)	6 (3,6 %)	103 (62,0%)	56 (33,7 %)	63 (38,0 %) / 166
postoperativ	9 (11,0 %)	6 (7,3 %)	41 (50,0 %)	26 (31,7 %)	41 (50,0 %) / 82
Tumorgroße (pT)					
pT1	0	0	3 (50,0 %)	3 (50,0 %)	3 (50,0 %) / 6
pT2	6 (4,8 %)	9 (7,3 %)	53 (42,7 %)	56 (45,2 %)	71 (57,3 %) / 124
pT3	1 (2,4 %)	4 (9,8 %)	26 (63,4 %)	10 (24,4 %)	15 (36,6 %) / 41
pT4	0	1 (100 %)	0	0	1 (100 %) / 1
nicht bekannt	0	0	1 (33,3 %)	2 (66,7 %)	2 (66,7 %) / 3
Lymphknotenstatus (pN)					
pN0	6 (3,9 %)	12 (7,8 %)	71 (46,1 %)	65 (42,2 %)	83 (53,9 %) / 154
pN1	1 (12,5 %)	0	6 (75,0 %)	1 (12,5 %)	2 (25,0 %) / 8
nicht bekannt	0	2 (15,4 %)	7 (53,8 %)	4 (30,8 %)	6 (50,0 %) / 13
Tumorgrad (G)					
G1	0	0	3 (60,0 %)	2 (40,0 %)	2 (40,0 %) / 5
G2	7 (4,9 %)	9 (6,3 %)	67 (46,9 %)	60 (42,0 %)	76 (53,1 %) / 143
G3	0	5 (23,8 %)	10 (47,6 %)	6 (28,6 %)	11 (52,4 %) / 21
nicht bekannt	0	0	3 (50,0 %)	3 (50,0 %)	3 (50,0 %) / 6

Tab. 4 – 15 Darstellung der klinischen Daten und das Auftreten von DTZ bei den PCA-Patienten.

Die TumorgroÙe pT ($P < 0,001$), der Lymphknotenstatus pN ($P = 0,001$), der Metastasenstatus pM ($P < 0,001$) und auch der Tumorgrad G ($P < 0,001$) korrelierten mit dem Überleben, wie dies zu erwarten war. Die statistischen Auswertungen ergaben eine Korrelation zwischen der TumorgroÙe (pT) und dem Auftreten von CK+-Zellen vor der Entfernung des Primärtumors ($P = 0,009$; Abb. 4-31). Der Nachweis von CK+-Zellen war auch unabhängig vom Entnahmezeitpunkt signifikant mit der TumorgroÙe assoziiert ($P = 0,002$). Der Lymphknotenstatus konnte sehr häufig nicht bestimmt werden, da bei der Primäroperation selten regionäre Lymphknoten entfernt wurden. Die Zeitspanne der Nachbeobachtung betrug bei einem Großteil der Patienten nur sechs bis zehn Monate, und ist damit zu kurz gewesen, um weitere Korrelationen zwischen dem Auftreten von DTZ im Blut und den klinischen Daten zu erwarten.

Testparameter	X ² (Chi ²) - nach Pearson	Anzahl der Patienten
Auftreten von Tumorzellen		
▪ Auftreten von CK+ -Zellen vor der OP korreliert mit der TumorgroÙe	P = 0,009	n = 167
▪ Auftreten von CK+ -Zellen insgesamt korreliert mit der TumorgroÙe	P = 0,002	n = 176

Tab. 4 – 16 Ergebnisse der statistischen Auswertungen zum PCA.

Aus zeitlichen Gründen wurden die Prostatatumore bzw. die disseminierten Tumorzellen der PCA-Patienten keiner weiteren molekularen Untersuchung unterzogen.

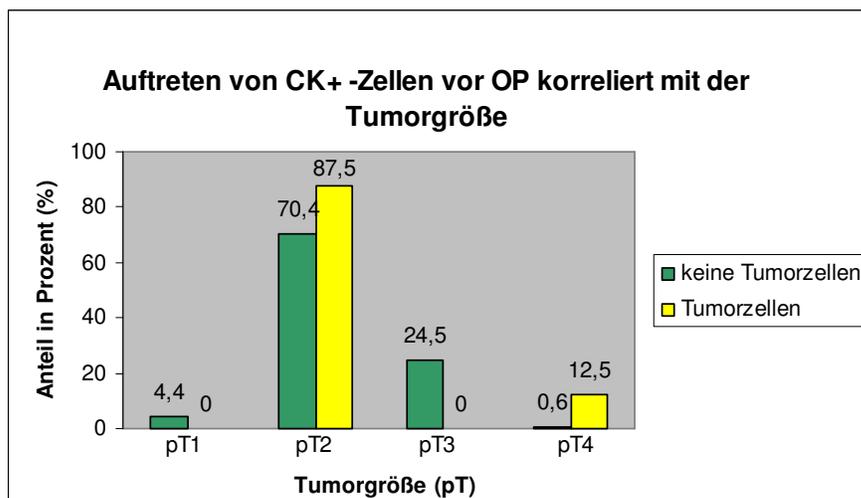


Abb. 4 – 31 Das Auftreten von CK+-Zellen vor der OP korreliert bei den PCA-Patienten mit der TumorgroÙe.

P = 0,009

4.5. Zusammenfassung der wichtigsten Ergebnisse

Im Folgenden sind die wichtigsten Ergebnisse noch einmal zusammengefasst worden. Es wurden drei verschiedene Tumorarten untersucht. Der Nachweis von DTZ im Blut der Karzinompatienten und die Korrelation zu den klinischen Daten war dabei ein wichtiger Aspekt. Weiterhin sind die Tumore und die DTZ molekulargenetisch charakterisiert worden und die Befunde zu den klinischen Daten und dem Auftreten von DTZ korreliert worden.

Für die MMK-Patientinnen, die noch nicht am Primärtumor operiert worden waren, konnte eine Korrelation gefunden werden zwischen dem Auftreten von CK+/BI+-Zellen im Blut und dem Metastasenstatus bzw. dem Tumorgrad. Die BI+-Zellen scheinen dabei den Hauptanteil auszumachen, da das Auftreten dieser Zellen allein bereits signifikant mit dem Metastasenstatus und dem Tumorgrad korrelierten. Erstaunlich war die Korrelation zwischen dem Auftreten von BI+-Zellen in der Nachsorge und der Operationsart. Je radikaler die Operationsmethode war, umso mehr Patientinnen wiesen DTZ in der Nachsorge auf. Die Tumorgöße war dabei nicht entscheidend, da sowohl kleinere als auch größere Tumore zu gleichen Anteilen bei den verschiedenen Operationsmethoden berücksichtigt wurden. Der Nachweis von CK+-DTZ nach der Primärtumoroperation korrelierte in der Kaplan-Meier-Analyse mit dem Überleben. Patientinnen, bei denen keine CK+-Zellen nach der Operation nachgewiesen werden konnten, hatten ein durchschnittliches Überleben von 50 Monaten. Dagegen überlebten Patientinnen mit CK+-Zellen im Blut nach der Operation im Durchschnitt nur 34 Monate ($P = 0,024$). Interessant war auch die Tatsache, dass die Wahl einer Hormontherapie für das Überleben der Patientinnen entscheidend war. Eine alleinige Aromatase-therapie erhöhte das Risiko am Tumor zu versterben auf das 3,5fache gegenüber Kombinationstherapien. Weiterhin korrelierte die uPA-Konzentration im Tumor mit dem Auftreten von BI+-DTZ. Für die MMK wurde auch eine signifikante Korrelation zwischen einer FHIT-Promotormethylierung in der Tumor-DNA und dem Überleben gefunden.

Für die NZK-Patienten ergaben sich ebenfalls Korrelationen zwischen dem Auftreten von DTZ im Blut und den klinischen Daten. Sowohl der Lymphknotenstatus als auch der Metastasenstatus korrelierten mit dem Auftreten von Tumorzellen (CK+/BI+), unabhängig vom Entnahmezeitpunkt. Auch hier hatten die BI+-Zellen den entscheidenden Anteil, da ihr Nachweis allein, ebenfalls eine signifikante Beziehung zum Lymphknoten- und Metastasenstatus zeigte. Der Nachweis von CK+-Zellen vor der Primärtumoroperation korrelierte mit dem Überleben der Patienten. Dies wurde in der Kaplan-Meier-Analyse und in der Cox-Regressions-Analyse bestätigt. Weiterhin wurden die uPA- und uPAR-Konzentrationen in den Tumoren bestimmt. Eine erhöhte Konzentration sowohl an uPA und an uPAR korrelierte mit der Tumorgöße, dem Metastasenstatus und dem Tumorgrad. Tendenziell war eine hohe uPAR-Konzentration im Tumor mit einer schlechteren Prognose assoziiert. Eine erhöhte uPA-Konzentration korrelierte bei den NZK mit der Tumorgöße,

dem Lymphknotenstatus und dem Tumorgrad. Für die MMK wurde dies nicht gefunden, jedoch korrelierte hier die Konzentration im Tumor mit dem Auftreten von BI+-Zellen vor der Primäroperation. Weiterhin korrelierte bei den NZK eine erhöhte uPAR-Konzentration mit dem Auftreten von BI+-Zellen.

Bei den PCA-Patienten korrelierte das Auftreten von CK+-Zellen signifikant mit der TumorgroÙe. Weitere molekulare Analysen wurden an den PCA nicht durchgeführt.

Testparameter	Mamma- karzinom	Nierenzell- karzinom	Prostata- karzinom
Auftreten von Tumorzellen			
▪ CK+/BI+ -Zellen korrelieren mit pN	Nicht signifikant	Signifikant	Nicht signifikant
▪ BI+ -Zellen korrelieren mit pN	Nicht signifikant	Signifikant	Nicht signifikant
▪ CK+/BI+ -Zellen vor OP korrelieren mit pM	Signifikant	Signifikant	Nicht signifikant
▪ BI+ -Zellen korrelieren mit pM	Nicht signifikant	Signifikant	Nicht signifikant
▪ CK+/BI+ -Zellen vor OP korrelieren mit G	Signifikant	Nicht signifikant	Nicht signifikant
▪ BI+ -Zellen vor OP korrelieren mit G	Signifikant	Nicht signifikant	Nicht signifikant
▪ CK+ -Zellen korrelieren mit TumorgroÙe	Nicht signifikant	Nicht signifikant	Signifikant
▪ BI+ -Zellen korrelieren mit hohem CA-Wert	Signifikant	Nicht bestimmt	Nicht bestimmt
Methylierung			
▪ CK+-Zellen korrelieren mit rar- β -Methylierung im Tumor	Signifikant	Nicht signifikant	Nicht bestimmt
Erhöhte uPA-Konzentration im Tumor			
▪ Hohe uPA-Konz. im Tumor korreliert mit pT	Nicht signifikant	Signifikant	Nicht bestimmt
▪ Hohe uPA-Konz. im Tumor korreliert mit pM	Nicht signifikant	Signifikant	Nicht bestimmt
▪ Hohe uPA-Konz. im Tumor korreliert mit G	Nicht signifikant	Signifikant	Nicht bestimmt
▪ BI+ -Zellen korrelieren mit uPA-Konz.	Signifikant	Nicht signifikant	Nicht bestimmt
Erhöhte uPAR-Konzentration im Tumor			
▪ Hohe uPAR-Konz. im Tumor korreliert mit pT	Nicht signifikant	Signifikant	Nicht bestimmt
▪ Hohe uPAR-Konz. im Tumor korreliert mit pM	Nicht signifikant	Signifikant	Nicht bestimmt
▪ Hohe uPAR-Konz. im Tumor korreliert mit G	Nicht signifikant	Signifikant	Nicht bestimmt
▪ BI+ -Zellen korrelieren mit hoher uPAR-Konz.	Nicht signifikant	Signifikant	Nicht bestimmt
Kaplan-Meier-Analysen			
▪ FHIT-Methylierung im Tumor	Signifikant	Nicht signifikant	Nicht signifikant
▪ CK+ -Zellen vor OP	Nicht signifikant	Signifikant	Nicht signifikant
▪ CK+ -Zellen nach OP	Signifikant	Signifik.-Trend	Nicht bestimmt
▪ Hoher CA-Wert	Signifikant	Nicht bestimmt	Nicht signifikant
Cox-Regressions-Analysen			
▪ FHIT-Methylierung im Tumor	Signifikant	Nicht signifikant	Nicht bestimmt
▪ CK+ -Zellen vor OP	Nicht signifikant	Signifikant	Nicht signifikant
▪ CK+ -Zellen nach OP	Signifikant	Signifik.-Trend	Nicht bestimmt
▪ Hoher CA-Wert	signifikant	Nicht bestimmt	Nicht bestimmt

Tab. 4 – 16 Zusammenfassung der wichtigsten Ergebnisse aller untersuchten Karzinomtypen.

5. Diskussion

Primäre Tumore sind in den seltensten Fällen die Ursache für den tödlichen Ausgang maligner Tumorerkrankungen. Fast immer sind Fernmetastasen für den progressiven Verlauf der Krankheit verantwortlich und daher mit einer negativen Prognose verbunden. Mehr als 95% der MMK-Patienten zeigen zum Zeitpunkt der Detektion bzw. Entfernung des Primärtumors keinen Hinweis auf metastatische Erkrankung durch klinische, radiologische und biochemische Standarduntersuchungsmethoden (Slade et al. 1999). Dennoch erleidet ca. 1/3 der Patienten einen Rückfall durch Metastasenbildung (Pantel et al. 2004). Dies macht ein erweitertes Tumorstaging durch sensitive immuncytochemische und molekulare Methoden notwendig, die in der Lage sind, einzelne DTZ in Indikatororganen, wie z.B. dem Knochenmark oder dem Blut, nachzuweisen. In den letzten Jahren sind vor allem molekulare Verfahren zur Anreicherung und zum Nachweis von DTZ entwickelt worden (Zehentner 2002, Pantel et al. 2003). Häufig werden epitheliale Differenzierungsmarker, wie die Cytokeratinexpression oder zellspezifische Marker, wie das prostata-spezifische-Antigen (PSA) als molekulare Marker für die Detektion von Tumorzellen mittels RT – PCR eingesetzt (Schuster et al. 2004, Schrader et al. 2004, Guo et al. 2005).

Die Anwesenheit maligner Zellen im Blut wurde bereits vor mehreren Jahrzehnten beschrieben (Zeidmann et al. 1961, Fidler et al. 1970). Für Tumorzellen ist das Blut lediglich ein temporärer Aufenthaltsort. Die klinische Relevanz disseminierter Tumorzellen im Blut ist nach wie vor umstritten. Durch die alleinige Detektion zirkulierender Zellen kann keine Aussage getroffen werden über das Potential dieser Zellen, z.B. Metastasen zu bilden, oder ihrer Fähigkeit das Immunsystem zu umgehen (Heiss et al. 2002). Neben einer pathomorphologischen Phänotypisierung sollte eine molekulargenetische Charakterisierung der disseminierten epithelialen Zellen erfolgen, um die Tumorrelevanz der gefundenen Zellen zu unterstützen. Der Nachweis von DTZ in Blutproben könnte zudem die Möglichkeit einer Therapiekontrolle liefern. Das Ansprechen einer Chemotherapie kann durch regelmäßige Blutkontrollen überwacht werden. Systemische adjuvante Behandlung, wie Chemotherapie oder Immuntherapie zeigen in vielen Fällen einen limitierten Erfolg. Dies ist möglicherweise dadurch begründet, dass viele Analysen und darauf aufbauende Behandlungsstrategien auf der Charakterisierung des Primärtumors oder von Metastasen ausgehenden Zelllinien basieren (Klein 2000). Die Eigenschaften disseminierter Tumorzellen können zu denen des Primärtumors jedoch sehr stark variieren. Das Ansprechen einer Behandlung kann meist erst beurteilt werden, nachdem sich Metastasen entwickelt haben. Der Nachweis disseminierter Tumorzellen im Blut bietet auch hier die Möglichkeit der zeitnahen Therapiekontrolle.

5.1. Charakterisierung der disseminierten Tumorzellen

In der Literatur sind hauptsächlich Arbeiten über den qualitativen Nachweis einzelner DTZ epithelialen Ursprungs im Knochenmark, in Lymphknoten und im peripheren Blut zu finden. Durch Kombination und Variation bisher bekannter Verfahren zum Nachweis von DTZ (Zellseparation mittels Dichtegradienten, Immunzytochemie) ist es uns gelungen, eine Methode (magnetische Zellseparation, MACS-System; vgl. Martin et al. 1998, Racila et al. 1998) in unserem Labor zu etablieren, mit der Karzinomzellen im peripheren Blut in geringsten Konzentrationen und mit einer hohen Wiederfindungsrate reproduzierbar nachgewiesen werden können (Bilkenroth et al. 2001). Die Methode ist weiterhin als halbautomatisiertes Verfahren eingehend in zwei verschiedenen Laborbereichen (Halle bzw. Dresden) validiert worden (Blümke et al. 2005). Die Methodik basiert auf einem Leukozyten-Depletierungsverfahren und erfordert – im Gegensatz zu diversen Positiv-Selektionsverfahren – nicht die Expression eines spezifischen Tumor-assoziierten Antigens. Deshalb ist eine Übertragbarkeit auf andere Tumorarten epithelialen Ursprungs geeignet, wie wir in einer Studie für Patientinnen mit MMK unter Chemotherapie belegen konnten (Taubert et al. 2004). Die angereicherten Tumorzellen wurden bei der Negativselektion mit epithelzellspezifischen Antikörpern gegen Zytokeratine (CK8/18) nachgewiesen bzw. sind an ihrer roten Farbe zu detektieren.

Eine weitere Methode ist die positive Selektion von Tumorzellen. Tumorzellen werden spezifisch, z.B. mit anti-HEA 125 markiert und anschließend selektiert (Krüger et al. 1999). HEA 125-Antigen wird hauptsächlich von Zellen epithelialen Ursprungs exprimiert, jedoch nicht ausschließlich. Zigeuner et al. (2000) testeten sowohl die positive als auch die negative Selektionsmethode. Bei der Positiv-Selektions-Methode wurden die Tumorzellen mit dem antiepithelialen Antikörper BER-EP₄ isoliert. In dieser Studie erwies sich die positive Selektionsmethode als sensitiver im Vergleich zur negativen. Dieser Befund steht im Gegensatz zu Studien in unserer Arbeitsgruppe (Bilkenroth et al. 2001), wo einerseits die Tumorzellen mit HEA 125-Antigen oder Zytokeratin-Markern (CK 7-8) angereichert wurden und andererseits eine Negativ-Selektion durch eine Depletion der Lymphozyten mit CD45-Microbeads erfolgte. Hier erwies sich die Negativ-Selektion als effektiver. Ursache dafür könnte sein, dass Tumorzellen aufgrund von Differenzierungsprozessen Oberflächenantigene verlieren oder das CK-Expressionsmuster sich ändern könnte. Dies würde zu einer Verringerung der Bindungsstellen für magnetische Beads führen und damit zu falsch-negativen Ergebnissen. Eine Anreicherung der Tumorzellen unabhängig vom Oberflächenexpressionsmuster ist aus unserer Sicht deshalb vorzuziehen. Über diese Methode der negativen Selektion von Tumorzellen, ist uns auch die Isolierung der Zytokeratin-negativen großen blauen Zellen (BI+) gelungen. Der Nachweis dieser Zellen wäre durch eine positive Selektion von Tumorzellen über spezifische Oberflächenantigene

wahrscheinlich nicht möglich gewesen. Eine Verbesserung der positiven Selektion kann eventuell durch die Verwendung von mehreren Antikörpern (AK – Cocktail) erreicht werden.

Die in dieser Arbeit charakterisierten BI+-DTZ wurden bisher nur durch uns und durch die Arbeitsgruppe von PD Dr. Axel Meye (Klinik für Urologie, Technische Universität Dresden) beschrieben (Meye et al. 2002). Die Präparation der Proben erfolgte dabei nach der gleichen Methode wie in Halle. Die Ergebnisse dieser zwei Zentren-Studie sind in einer Publikation zusammengefasst (Blümke et al. 2005). Bei den BI+-Zellen handelt es sich nicht um Zellen des Blutsystems, da dies durch zusätzliche immunhistochemische Färbungen ausgeschlossen werden konnte. Die BI+-Zellen sind somit nicht mesodermalen Ursprungs und entstammen nicht dem Blutsystem. Sie konnten auch in keiner der Kontrollproben von gesunden Personen gefunden werden. Durch ihre typische tumorzellähnliche Morphologie wurden sie damit als Tumorzellen eingeschätzt. Für die Auswertung der detektierten DTZ wurden in der vorliegenden Arbeit sowohl die CK8/18-markierten (roten) als auch die unmarkierten (großen blauen) Tumorzellen berücksichtigt.

5.2. Die Detektion disseminierter Tumorzellen im peripheren Blut der Karzinompatienten

5.2.1. Analyse der Blutproben bei den Mammakarzinom-Patientinnen

5.2.1.1. Auftreten und Anreicherung von disseminierten Tumorzellen

Das Vorhandensein von DTZ ist beim MMK vor allem im Knochenmark beschrieben worden. Dabei zeigte sich, dass das Auftreten von DTZ signifikant mit einem kürzeren, rezidivfreien Überleben und kürzerem Gesamtüberleben korreliert ist (Mansi et al. 1999). Der Nachteil von Knochenmark als Untersuchungsmaterial ist die Aufwendigkeit der Probengewinnung und das Risiko für die Patienten. Dagegen sind Blutproben relativ leicht zu gewinnen und die Blutabnahme ist für den Patienten fast ohne Risiko. Zudem können diese Proben im Rahmen von Routineblutentnahmen gewonnen werden. Gelingt der Nachweis der prognostischen Relevanz von Tumorzellen im Blut, so wie dies für das Knochenmark bereits bewiesen ist (Pantel et al. 2003, Schindlbeck et al. 2005), könnte der Tumorzellnachweis im Blut für MMK-Patienten in Entscheidungen über Therapien und Nachfolgebehandlungen mit einbezogen werden. Neuere Studien berichten von einer geringeren Frequenz an DTZ im Blut im Vergleich zum Knochenmark (Übersicht bei Müller et al. 2006). Ein Großteil der Arbeiten weist jedoch vergleichbare Positivraten von 25 bis 40% auf (Braun et al. 2000, Schmidt-Kittler et al. 2003, Pantel et al. 2003, Schindlbeck et al. 2005, Wolfle et al. 2006).

Für MMK ist eine relativ häufige Tumorzellaussaat im Blut mit verschiedenen Nachweismethoden beschrieben worden (Hoon et al. 1996, Hildebrandt et al. 1997, Mapara et al. 1997). Die Sensitivität und die Spezifität des Nachweises lassen sich mittels immunmagnetischer Methoden erhöhen (Rostagno et al. 1997, Naume et al. 2001). Beim

metastasierten MMK fand sich eine gute Korrelation zwischen dem Krankheitsstadium bzw. der Tumoraktivität und der Anzahl der gefundenen Tumorzellen im peripheren Blut (Terstappen et al. 2000). Intraoperativ erfolgt eine vermehrte Tumorzellaussaat ins Blut, deren Bedeutung für das Risiko einer Metastasierung unklar ist (Mori et al. 1996). Hu und Kollegen (2003) führten vergleichende Analysen zur Detektion von DTZ bei Brustkrebspatienten durch. Die positive Rate für Immunhistochemie ohne vorherige Anreicherung der Tumorzellen betrug dabei nur 5,6% im Vergleich zur zweiten Methode (38,9%), bei welcher die Tumorzellen mittels der MACS-Methode angereichert und anschließend immunhistochemisch angefärbt wurden.

Innerhalb der vorliegenden Arbeit sind von 173 MMK-Patientinnen in einem Zeitraum von vier Jahren 375 Blutproben untersucht worden. Die Untersuchungen der entnommenen Blutproben führten zum Nachweis von DTZ bei 83 von 173 (48,0%) Patientinnen. Den Hauptanteil machen dabei die Bl⁺-Zellen aus (36,4% der Patientinnen). Werden die untersuchten Blutproben getrennt von der Patientenzahl betrachtet, so konnten in 132 von 375 (35,2%) Blutproben DTZ nachgewiesen werden. In der Literatur sind zahlreiche Publikationen zum Nachweis von DTZ im Blut von MMK-Patienten zu finden. Allerdings enthalten nur sehr wenige Daten zum Überleben oder Korrelationen zu anderen Parametern, wie z.B. dem Lymphknotenstatus oder der Tumorgröße. Die Detektionsrate von DTZ im Blut liegt bei einem Großteil der Publikationen zwischen 25% und 32% (Zach et al. 1999, Schröder et al. 2003, Giatromanolaki et al. 2004). In die Analysen dieser Arbeiten wurden keine fortgeschrittenen MMK-Patienten mit einbezogen. Das heißt Patienten mit nachgewiesenen Fernmetastasen zum Zeitpunkt der Diagnose sind von den Auswertungen ausgeschlossen worden. Dadurch sind die Detektionsraten niedriger als unsere. In die Auswertungen der vorliegenden Arbeit sind auch die Daten von Patienten mit diagnostizierten Metastasen integriert. Vergleichbare Ergebnisse lieferten die Arbeiten von Stathopoulou et al. (2003). In dieser Arbeit wurden bei 42,6% der MMK-Patienten DTZ im Blut nachgewiesen. Ähnliche Daten lieferten auch die Analysen von Cremoux und Kollegen (2000) zum fortgeschrittenen MMK. Sie detektierten bei 45% der Patienten Tumorzellen im Blut. In einer früheren Arbeit unserer Arbeitsgruppe konnten wir bei 26% der MMK-Patienten DTZ in den Blutproben finden (Taubert et al. 2004). Eine höhere Anzahl an positiven Blutproben in der vorliegenden Arbeit im Vergleich zu der früheren Studie steht nicht im Widerspruch, da in unserer vorangegangenen Arbeit (Taubert et al. 2004) die Bl⁺-DTZ nicht mit einbezogen wurden. Es ist also festzustellen, dass eine erhöhte Anzahl positiver Blutproben in dieser Arbeit durch die Miteinbeziehung der Bl⁺-Zellen in die Auswertung bedingt ist. In unseren Analysen wurden die Bl⁺-Zellen und die CK⁺-Zellen zusammengefasst. In anderen publizierten Arbeiten zum MMK wurde immer nur von CK⁺-Zellen berichtet.

5.2.1.2. Nachweis disseminierter Tumorzellen – Beziehung zur Prognose

Innerhalb der Zeitspanne (vier Jahre) unserer Untersuchungen sind 17 (9,8%) von 173 MMK-Patientinnen tumorbedingt verstorben. Unter den 17 verstorbenen Patientinnen sind sieben (41,2%) mit BI+-DTZ im Blut und drei (17,6%) Patientinnen mit CK+-DTZ. Bezogen auf die DTZ sind fünf (7,9%) von 63 Patientinnen mit BI+-Zellen und neun (10%) von 90 Patientinnen ohne BI+-Zellen verstorben. Von 156 zum jetzigen Zeitpunkt lebender Patienten sind 70 Patienten mit BI+-Zellen (44,9 %) und 81 (51,9%) Patienten ohne Nachweis von Tumorzellen im Blut. Weiterhin sind drei (15%) Patientinnen von 20 Patientinnen mit CK+-Zellen verstorben und 17 (85%) Patientinnen am Leben. Es lässt sich einschätzen, dass bisher keine klare Aussage über die Bedeutung des Auftretens von BI+-Zellen und CK+-Zellen für das Überleben der MMK-Patientinnen getroffen werden kann. Wir konnten eine Korrelation des Gesamtüberlebens zum Auftreten von CK+-Zellen nach der Operation nachweisen (Kaplan-Meier: $P = 0,024$). Aufgrund der geringen Patientenzahl (4/93) ist dies jedoch als Trend zu werten. Eine längere Nachbeobachtungszeit ist erforderlich, um zu sehen, ob BI+- und CK+-Zellen Prognose relevant sind. Möglicherweise sind die BI+-DTZ weniger aggressiv in ihrem Verhalten oder z.T. ein Zeichen für Entzündungsreaktionen, bzw. verweilen länger in der Blutbahn oder in Geweben (Dormanz) bis sie in andere Organe eindringen und Metastasen bilden. Es ist bekannt, dass Tumorzellen viele Jahre (bis zu 20 Jahre) in der mitotisch nicht aktiven G₀-Phase verharren können, bis sie aktiv werden und nachweisbare Metastasen bilden (Pantel et al. 1997). Eine längere Beobachtungszeit der Patientinnen mit BI+-Zellen in ihrem Blut könnte hier sehr interessant und aufschlussreich sein, inwieweit BI+-Zellen für das Überleben der Patientinnen verantwortlich sind. Unsere Ergebnisse sind etwas zwiespältig, zum einen sind am häufigsten Patientinnen mit BI+-Zellen verstorben und zum anderen überleben mehr Patientinnen mit diesen Zellen im Vergleich zu Patienten ohne DTZ im Blut.

Die Detektion von Tumorzellen im Knochenmark ist ein unabhängiger prognostischer Faktor für das krankheitsfreie Überleben und das Gesamtüberleben von MMK-Patienten (Solomayer et al. 2001, Braun et al. 2001, Schindlbeck et al. 2005). Univariate Überlebensanalysen von Benoy et al. (2006) zeigten ein 2,87fach erhöhtes Risiko für MMK-Patienten an ihrem Tumor zu versterben, wenn in den Knochenmarkproben CK+-Zellen nachgewiesen werden konnten. Die Arbeitsgruppe um Braun (2005) demonstrierten ebenfalls, dass die Anwesenheit von DTZ im Knochenmark einen starken signifikanten Einfluss auf das Überleben der Patienten hat. Von 199 Patienten mit DTZ verstarben 49 (24,6%), während von 353 Patienten ohne DTZ nur 22 (6,2%) verstarben. Für das Knochenmark ist somit ausreichend bewiesen worden, dass der Nachweis von DTZ ein unabhängiger prognostischer Faktor für das krankheitsfreie Überleben und das Gesamtüberleben von Patienten mit malignen Brusttumoren ist. Dies konnte bisher für die Detektion von DTZ im Blut noch nicht ausreichend belegt werden. In verschiedenen Studien

schien die Frequenz der DTZ im Blut geringer zu sein, als im Knochenmark. Konventionelle Ficollgradienten-Zentrifugation könnte durch eine nicht effektive Anreicherung der malignen Zellen dafür verantwortlich sein (Müller et al. 2006). Dies wäre eine Erklärung für das Fehlen der klinischen Relevanz von detektierten DTZ im Blut in früheren Arbeiten. Die Anwesenheit von CK 19-positiven Tumorzellen im peripheren Blut war in einer Studie von Giatromanolaki et al. (2004) eine signifikante und unabhängige Variable, die mit einem kürzeren krankheitsfreien Überleben assoziiert war. Kataoka und Kollegen (2005) untersuchten Blut- und Knochenmarkproben zum Zeitpunkt der Operation auf die Anwesenheit von Tumorzellen. Das Vorhandensein von DTZ im Blut korrelierte dabei mit einem kürzeren metastasenfremigen Überleben. In einer multivariaten Analyse war die Existenz von DTZ ein unabhängiger prognostischer Faktor in Lymphknoten-negativen Patienten. Diese Daten sind in Übereinstimmung mit den in der vorliegenden Arbeit erzielten Resultaten. Wir konnten eine Korrelation für das Auftreten von CK+-Zellen im Blut nach der Entfernung des Primärtumors zum Überleben nachweisen (Chi²-Test, P = 0,024, Tab. 4-5). Dies bestätigte sich auch in der Kaplan-Meier-Analyse (P = 0,024, Tab. 4-6). Die mediane Nachbeobachtungszeit betrug für die MMK-Patientinnen 30 Monate (Zeitspanne: drei bis 78 Monate). Der Nachweis von CK+-Zellen im Blut nach Entfernung des Primärtumors ist somit ein prognostischer Faktor für das Gesamtüberleben der Patientinnen. Für die Blutproben, die vor der Operation entnommen wurden, konnte dies nicht bestätigt werden. Dies ist aber kein Widerspruch, da vor der Entfernung des Tumors, dieser noch Zellen ausstreuen kann. Méhes et al. (2001) zeigten in ihren Studien, dass Tumorzellen im Blut zu einem Großteil apoptotisch sind. Apoptose dieser Zellen wird zum einen durch den Verlust der Zell-Matrix-Adhärenz ausgelöst oder durch zytotoxische Therapien oder operative Eingriffe. Tumorzellen, die auch noch nach der Tumorsektion detektiert werden, scheinen dagegen die potentiell metastasenbildenden zu sein. Sie sind überlebensfähig und in der Lage, die Blutbahn wieder zu verlassen und in entfernte Organe einzudringen.

5.2.1.3. Nachweis disseminierter Tumorzellen – Beziehung zum Tumorgrad und Tumorstadium

In den statistischen Analysen korrelierte der Nachweis von DTZ (CK+/Bl+) in den Blutproben, die vor der Primärtumoroperation entnommen wurden mit dem Auftreten von Metastasen und dem Tumorgrad. Je weniger ein Tumor differenziert war, umso häufiger traten in den Blutproben der Patienten Tumorzellen auf (CK+/Bl+). Dies konnte besonders für die CK+-Zellen nachgewiesen werden. Bei Tumorgrad 1 wiesen 4,2% (1/24) der Patientinnen CK+-Zellen auf. Dies steigerte sich von Tumorgrad 2 (11,6%, 11/95) über Tumorgrad 3 (18,1%, 8/44) auf 33,3% (1/3) bei Grad 4. Das spricht dafür, dass es sich bei den CK+-Zellen um wenig differenzierte Tumorzellen handelt, die verstärkt von nicht differenzierten Tumoren ausgehen. Dagegen traten große blaue Zellen bereits zu 37,5% (9/24) bei Tumorgrad 1 auf. Tumore mit Tumorgrad 2 wiesen ebenso häufig Bl+-Zellen auf (40,0%, 38/95). Dies

verringerte sich jedoch bei Tumorgrad 3 auf nur noch 20,4% (9/44). Somit ergeben sich für die BI+-Zellen andere Eigenschaften als für die CK+-Zellen. Die BI+-Zellen werden wahrscheinlich bereits von gut differenzierten Tumoren verstärkt ins Blut abgegeben im Vergleich zu den wenig differenzierten Tumoren, was für eine sehr frühe Disseminierung der BI+-Zellen spricht. Das morphologische Aussehen der BI+-DTZ spricht aber für relativ undifferenzierte Zellen (Abb. 4-1).

Das Auftreten der BI+-Zellen in der Nachsorge der Patienten korrelierte auch zur Operationsmethode. Je radikaler die Methode der Tumorentfernung war, umso häufiger traten auch noch nach Monaten BI+-Zellen in der Blutbahn auf. Die Patienten galten zu diesem Zeitpunkt als geheilt und alle Therapien (mit Ausnahme der Hormontherapie) waren beendet. Frauen, denen die ganze Brust abgenommen wurde, wiesen auch Monate später noch BI+-Zellen auf. Dies spricht ebenfalls dafür, dass diese Zellen sehr lange in der Blutbahn zirkulieren können. Sie können aber auch Entzündungen anzeigen, die wahrscheinlich relativ häufiger auftreten, wenn radikaler operiert wurde. Die Wahl der Operationsmethode hing nicht nur von der Tumorgröße, sondern auch vom Befall der Lymphknoten ab. In diesen Untersuchungen wurden zu gleichen Teilen Patienten einbezogen, die pT1-Tumoren und pT2-Tumoren aufwiesen. Von vier Patientinnen mit pT1 und pN0, denen die ganze Brust abgenommen wurde, wiesen zwei BI+-Zellen in der Nachsorge auf. Alle vier Patientinnen sind bisher rezidivfrei und zeigen keine Anzeichen für eine Metastasierung. In der Literatur gibt es zu den BI+-Zellen bisher keine Daten. Jedoch ist auch in anderen Arbeitsgruppen dieses Phänomen bekannt (persönliche Mitteilung von C. Klein; Institut für Immunologie, Ludwig-Maximilians-Universität München).

5.2.1.4. Nachweis disseminierter Tumorzellen – Beziehung zur Tumorgröße und Lymphknotenbefall

Es galt die Frage zu klären, ob das Vorhandensein von CK+-Zellen mit etablierten Risikofaktoren bei Brusttumoren, wie Tumorgröße und dem Befall von Lymphknoten korreliert. Dafür waren längere Nachbeobachtungen der Patienten notwendig. Mansi et al. (1999) wiesen in 25% der von ihnen untersuchten Knochenmarkproben DTZ nach. In ihrer Analyse nach sechs Jahren, zeigten univariate Statistiken eine höhere Metastasenbildungsrate im Knochenmark und in anderen Organen bei den Patienten mit detektierten Tumorzellen. Diel et al. (1996) fanden eine signifikante Korrelation zwischen dem Auftreten von CK+-Zellen im Knochenmark und der Tumorgröße, dem Lymphknotenstatus, dem Tumorgrad und dem postmenopausalen Status. Die mediane Beobachtungszeit nach der Primärtumorentfernung betrug dabei 36 Monate (Bereich von drei bis 108 Monaten). Andere Studien wiesen ebenfalls eine Korrelation zwischen Tumorzellen im Knochenmark und dem Lymphknotenstatus, der Tumorgröße und dem Tumorgrad nach (Braun et al. 2000). Der Nachweis von DTZ im Knochenmark ist somit ein

unabhängiger prognostischer Indikator für sowohl ein metastasenfreies Überleben als auch für das allgemeine Überleben der Patienten mit MMK. In Studien zu MMK konnte gezeigt werden, dass das Vorhandensein von DTZ im Blut mit dem Tumorstadium und dem Krankheitsverlauf (frühere Metastasierung, Rezidivbildung) korreliert (Terstappen et al. 2000, Smith et al. 2000, Braun et al. 2000). In unseren Analysen korrelierte das Auftreten von DTZ im Blut nicht mit dem Lymphknotenstatus. Patienten ohne LKM wiesen genauso häufig DTZ in ihrem Blut auf wie Patienten mit LKM. Dies wurde auch von anderen Arbeitsgruppen für das Auftreten von DTZ im Knochenmark gefunden (Gerber et al. 2001, Braun et al. 2001). Das Auftreten von LKM korreliert demnach nicht notwendigerweise mit dem Auftreten von DTZ im Blut. Diese Tatsache kann durch die zwei existierenden Hauptmetastasierungswege für MMK erklärt werden. Die Ausbreitung von Tumorzellen kann zum einen lymphogen erfolgen und zum anderen hämatogen über die Blutbahnen (Siehe Abb. 1-1).

5.2.2. Analyse der Blutproben bei Patientinnen mit benignen Brusterkrankungen

In weiteren Analysen wurden parallel von 78 Patientinnen mit benignen Brusterkrankungen Blutproben untersucht. In 38,5% (32/83) der vor der Operation entnommenen Blutproben konnten DTZ nachgewiesen werden. Dies betraf meist Patientinnen (20/28) nach der Menopause. Dies zeigten auch Diel et al. (1996) für Knochenmarkproben. Wahrscheinlich ist hier der Hormonhaushalt der Frauen entscheidend. Kurz vor oder nach der Menopause ist die Östrogenkonzentration im Körper relativ hoch. Östrogen stimuliert das Wachstum von hormonempfindlichen Tumoren. Treten nun vermehrt abnorme, veränderte Zellen im Körper auf, was mit zunehmenden Alter durch Fehler in der Zellteilung oder Versagen der DNA-Reparaturmechanismen vorkommen kann, werden diese durch das Östrogen zum Wachstum angeregt. CK⁺-DTZ wurden bei zwei Patientinnen mit Mastopathie nachgewiesen. Eine dieser Patientinnen entwickelte innerhalb von zwei Jahren ein MMK. Möglicherweise waren bei dieser Patientin bereits kleine, nicht nachweisbare Tumorherde vorhanden, die bereits DTZ ausstreteten. Es wird auch die Progression von gutartigen zu malignen Veränderungen diskutiert (Simpson et al. 2001). BI⁺-Zellen wurden in unserer Studie am häufigsten bei Patientinnen mit einer Entzündung der Brustdrüse (Mastitis) und Patientinnen mit einer ADH nachgewiesen. Sowohl bei einer Entzündung als auch bei einer ADH entstehen atypische unimorphe Zellen, die bereits Veränderungen aufweisen. Page et al. (1992) und Tavassoli et al. (1990) wiesen ein erhöhtes Risiko für eine MMK-Entwicklung nach, wenn bereits eine ADH diagnostiziert wurde. Musca et al. (2003) bestätigten das erhöhte Risiko in ihren Studien. Somit zeigt dies auch, dass BI⁺-Zellen bereits Veränderungen aufweisen, die für einen neoplastischen Prozess sprechen. Sie können damit schon sehr früh einen Hinweis auf möglicherweise maligne Veränderungen geben. Aber auch bei Entzündungen entstehen atypische Zellen, die dann ins Blut abgegeben werden können. Beweise für die Entstehung von Tumoren aus früheren Entzündungen sind nicht bekannt.

5.2.3. Analyse der Blutproben bei den Nierenzellkarzinom-Patienten

5.2.3.1. Nachweis disseminierter Tumorzellen – Beziehung zu klinischen Parametern

Innerhalb dieser Arbeit wurden von 154 NZK-Patienten Blutproben untersucht. Die mediane Nachbeobachtungszeit der Patienten betrug 15 Monate (Bereich von einem bis 56 Monaten). Eine beobachtete 1:2 Verteilung der Geschlechter entspricht den Veröffentlichungen anderer Arbeitsgruppen (Hermanek et al. 1990, Bostwick et al. 1997, Pesch et al. 2000). Die geschlechtsspezifische Verteilung lässt sich teilweise durch den Nikotinkonsum erklären. Männer rauchen doppelt so häufig wie Frauen und der Nikotinkonsum wird als einer der stärksten Einflussfaktoren auf die Entstehung von Nierentumoren betrachtet (Whitemore 1989, Pesch et al. 2000). Der Großteil der Blutproben (140/233) sind vor der Nephrektomie entnommen worden. Unsere Analyse der Blutproben ergab den Nachweis von DTZ bei 52,6% (81/154) der NZK-Patienten. Die erhöhte Positivrate in den postoperativen Blutproben (45,4%) könnte sich durch eine vermehrte Ausstreuung von Tumorzellen ins Blut während der Operation erklären lassen. Bereits Oefelein und Kollegen (1996) konnten nachweisen, dass operative Eingriffe eine geringe hämatogene Disseminierung von Tumorzellen verursachen. Ähnlich wie bei den MMK-Patientinnen konnten auch in den Blutproben der NZK-Patienten große BI+-DTZ detektiert werden. In 41,2% (96/233) der Blutproben wurden DTZ (CK+ und BI+) nachgewiesen. Die Positivitätsrate (52,6%) bei den NZK-Patienten ist damit höher im Vergleich zu den MMK-Patienten (48,0%). In einer früheren Arbeit unserer Arbeitsgruppe wiesen 32% der NZK-Patienten CK+-Zellen in ihrem Blut auf (Bilkenroth et al. 2001). In einer weiteren Studie unserer Arbeitsgruppe und der Arbeitsgruppe von PD Dr. A. Meye (Dresden) wurden bei 42% der Patienten DTZ detektiert (Meye et al. 2002). Dabei wurden erstmals auch Patienten berücksichtigt, deren Tumorzellen kein Zytokeratin exprimierten (BI+). Die Fortsetzung dieser Arbeiten führten zu einer Zwei-Zentren-Studie in der Ergebnisse dieser Promotionsarbeit zum Teil bereits veröffentlicht wurden (Blümke et al. 2005).

Das Auftreten von Tumorzellen im Blut korrelierte weder mit der Tumorgroße noch mit dem Tumorgrad. In allen vier Größenstadien (pT1 – pT4) und in allen Tumorgradstufen (G1 – G4) wiesen ca. 50% der Patienten Tumorzellen in ihrem Blut auf. Der Nachweis von sowohl BI+ - Zellen allein als auch aller Tumorzellen (CK+ und BI+) insgesamt korrelierte signifikant mit dem Auftreten von LKM ($P < 0,001$) und von Fernmetastasen ($P = 0,014$). Die BI+-Zellen hatten dabei den Hauptanteil, da ihr Nachweis allein bereits signifikant mit dem Lymphknotenstatus und dem Metastasenstatus korrelierte. Wenige Studien zum Nachweis von DTZ im Blut von NZK-Patienten erlauben keine gesicherten Aussagen zur prognostischen Relevanz dieser Zellen. Zwei Studien zur Detektion von DTZ im Blut von NZK-Patienten zeigten eine Positivitätsrate von 47% und 49% auf (Hioki et al. 1999, McKiernan et al. 1999). Dies entspricht der Detektionsrate der vorliegenden Studie. Sie

konnten ebenfalls keine Korrelationen zum Tumorgrad oder der TumorgroÙe feststellen. Shimazui und Kollegen (2003) wiesen in 45% der untersuchten NZK-Patienten Tumorzellen durch RT-PCR nach. Es wurden dabei keine Korrelationen zum Tumorgrad, zur TumorgroÙe oder zum Metastatenstatus festgestellt. In weiteren Publikationen zum Nachweis von DTZ im peripheren Blut von NZK-Patienten wurden bei 37,5% und 45,7% der Patienten DTZ im Blut nachgewiesen (Ashida et al. 2000, Li et al. 2005). Es wurden jedoch keine Aussagen zur prognostischen Relevanz dieser Tumorzellen gemacht.

Buchner und Kollegen (2003) führten Analysen an Knochenmarkproben von NZK-Patienten durch. Sie fanden Tumorzellen bei 25% der untersuchten Patienten. Eine Tumorprogression während der Nachbeobachtungszeit (Median: 40 Monate) trat bei 14% der Patienten mit CK+-Zellen und bei 11% der Patienten ohne CK+-Zellen im Knochenmark auf. Tumorprogression wurde in dieser Studie als tumorassoziierter Tod, Rezidivbildung oder Bildung neuer Metastasen definiert. Die Detektion von CK+-Zellen im Knochenmark von NZK-Patienten hatte damit keine prognostische Signifikanz. Weiterführende Studien der Arbeitsgruppe von Buchner an metastasierten NZK zeigten eine Tumorzell-detektionsrate von 42% im Knochenmark (Buchner et al. 2006). In multivariaten Analysen war die Detektion von drei oder mehr Tumorzellen im Knochenmark ein unabhängiger Prognosefaktor für ein kürzeres Gesamtüberleben. In der vorliegenden Arbeit korrelierte das Auftreten von CK+-Zellen vor der Operation mit dem Gesamtüberleben der NZK-Patienten. Dies konnte sowohl in Kaplan-Meier-Analysen ($P = 0,033$) als auch in der multivariaten Cox-Regressions-Analyse ($P = 0,049$) bestätigt werden. Von zehn Patienten, die CK+-Zellen in den präoperativen Blutproben aufwiesen, sind bereits fünf verstorben. Insgesamt verstarben von 81 Patienten mit disseminierten Tumorzellen (CK+/Bl+) 23 (28,4%). Detailliert betrachtet sind von 59 NZK-Patienten mit Bl+-Zellen 14 verstorben (23,7%) und von 22 Patienten mit CK+-Zellen sind neun (40,9%) Patienten verstorben. Im Gegensatz dazu sind von 73 Patienten ohne DTZ 13 (17,8%) Patienten verstorben. Der Nachweis von DTZ im Blut ist nach unseren Studien ein prognostischer Faktor für das Gesamtüberleben von NZK-Patienten.

5.2.4. Analyse der Blutproben bei den Prostatakarzinom-Patienten

In dieser Arbeit wurden von 175 Patienten mit PCA Blutproben auf das Vorhandensein von DTZ untersucht. Die Beobachtungszeit nach der Primärtumorresektion betrug im Median 13 Monate (Bereich: ein bis 52 Monate). Bei 52,6% der untersuchten Patienten wurden DTZ in den Blutproben detektiert. Es wurde ebenfalls das Vorhandensein von sowohl CK+-Zellen als auch Bl+-Zellen zusammengefasst. Die Auswertung der Resultate ergab eine signifikante Korrelation der TumorgroÙe (pT) mit dem Auftreten von CK+-Zellen im Blut sowohl vor der Operation als auch insgesamt. Ähnliche Detektionsraten von 62,3%, 37% und 40,2% (Israeli et al. 1994, Meye et al. 2002, Weckermann et al. 2001) wurden von anderen Arbeitsgruppen gefunden. Zwei Arbeitsgruppen zeigten, dass die Anwesenheit von DTZ im Blut (durch RT-

PCR detektiert) sowohl mit der Kapseldurchbrechung des Tumors als auch mit einem Tumorrest nach der Operation korreliert ist (Katz et al. 1994, Grasso et al. 1998). Sie wiesen weiterhin eine Korrelation zwischen dem Auftreten von DTZ und dem Erkrankungsstadium nach. Andere Studien fanden keine statistisch signifikante Korrelation zwischen dem Nachweis von DTZ im Blut und dem Erkrankungsstadium (Sokoloff et al. 1996, Gao et al. 1999, Ilanes et al. 2000). Weckermann und Kollegen (2001) konnten eine signifikante Korrelation zwischen dem Auftreten von CK+-Zellen in präoperativen Knochenmarkproben und einer früheren Tumorprogression (Metastasen, Rezidive) beobachten. Von 82 untersuchten PCA-Patienten wiesen 33 Patienten DTZ im Knochenmark auf. Wir konnten in unseren Analysen keine Korrelation zum Lymphknotenstatus oder zum Metastasenstatus feststellen. Für weitere signifikante Korrelationen z.B. zum Metastasenstatus war die Beobachtungszeit nach der Primärtumoroperation zu kurz (Median: 13 Monate). Larson et al. (2004) berichtet darüber, dass nur sehr wenige Tumorzellen im Blut von PCA Patienten intakt sind. Ein Großteil der DTZ ist zerstört oder nur als Fragmente von Zellen vorhanden.

5.2.5. Zusammenfassung der DTZ-Detektion in den Blutproben der Karzinompatienten

In dieser Arbeit wurden die Blutproben von verschiedenen Karzinompatienten auf das Vorhandensein von DTZ untersucht. Wir konnten sowohl in Blutproben von MMK-, NZK-, als auch PCA-Patienten DTZ detektieren. Der Nachweis von CK+-Zellen korrelierte für das MMK und das NZK mit dem Metastasenstatus. Eine signifikante Korrelation des Auftretens von CK+-Zellen zum Lymphknotenstatus konnte nur für das NZK nachgewiesen werden. In einer früheren Studie konnten wir bereits beweisen, dass das Vorhandensein von CK+-Zellen im Blut von NZK-Patienten mit einem aggressiveren NZK-Phänotyp und dem Auftreten von Fernmetastasen assoziiert ist (Blümke et al. 2005). Ein ganz wesentliches Ergebnis meiner Promotionsarbeit ist, dass für zwei der drei untersuchten Karzinomtypen eine signifikante Korrelation zwischen dem Auftreten von CK+-DTZ und dem Gesamtüberleben der Tumorpatienten gefunden wurde. Der Nachweis von CK+-Zellen im Blut ist somit ein prognostischer Faktor für MMK, und NZK. Für MMK galt bisher nur der Nachweis von Tumorzellen im Knochenmark als Prognosefaktor (Schindlbeck et al. 2005, Weckermann et al. 2001).

5.3. Molekulargenetische DNA-Analysen

5.3.1. MSI- und LOH-Analysen

Der Nachweis von DTZ als prognostischer Faktor rückt immer mehr in den Vordergrund, da sie als Auslöser von Metastasen angesehen werden. Es sind jedoch nicht alle zirkulierenden Tumorzellen in der Lage, Metastasen auszubilden. Die Unterscheidung potentieller Metastasenbildender Tumorzellen von solchen, die dazu nicht fähig sind, ist essentiell. Die

Detektion von MSI und LOH in DTZ bietet eine Möglichkeit der Charakterisierung dieser Zellen.

5.3.1.1. MSI- und LOH-Analysen beim Mammakarzinom

Für die DNA-Analysen stand von 17 MMK-Patientinnen Gefriergewebematerial vom Primärtumor, wenigen LKM (n=6) und dem autologen Normalgewebe (n=17) zur Verfügung. Die Isolierung der DNA der DTZ gelang bei drei dieser Patientinnen. Es konnten keine Unterschiede zwischen dem Normalgewebe und dem Tumorgewebe bzw. den LKM bei 15 der untersuchten Patientinnen nachgewiesen werden. Genetische Veränderungen wiesen nur zwei der drei Patientinnen in der DNA der untersuchten DTZ auf (Tab. 8-5). Es waren dabei die Mikrosatellitenmarker Rb und myc-L1 betroffen. Veränderungen im Rb-Marker waren für beide Patientinnen Heterozygotieverluste (Abb. 4-7 und 4-8). Für einen Fall (Abb. 4-7 im Ergebnisteil) traten interessanterweise bereits Veränderungen in der DNA des Normalgewebes auf. Das „Normalgewebe“ erwies sich bei einer routinemäßigen Begutachtung durch den erfahrenen Pathologen Herrn Prof. Dr. Holzhausen, als apokrine Metaplasie. Unter Metaplasie wird die Umwandlung bzw. der Ersatz eines bestimmten differenzierten Gewebes durch ein Gewebe ähnlicher Bauart bezeichnet (Blümcke 1995). Auf molekularer Ebene ist bei der Metaplasie eine Freilegung bzw. Aktivierung von Genorten zu postulieren, die bei der für die jeweilige Organstruktur regelrechten Zelldifferenzierung nicht oder nur wenig aktiv waren (Blümcke 1995). Ausgereifte Plattenepithelmetaplasien können sich zu Dysplasien entwickeln, die als Vorläufer eines Bronchialkarzinoms vom Typ des Plattenepithelkarzinoms gelten. Dysplasien bezeichnen Fehldifferenzierungen von Organen und Organteilen als auch Veränderungen in epithelialen Strukturen. Sie gehen mit atypischen Zellformen, fehlerhaftem DNA-Gehalt und Vermehrung von Mitosen einher (Blümcke 1995). Möglicherweise ist die Metaplasie auch in diesem Fall der Vorläufer eines Karzinoms. Die DNA des metaplastische Gewebes weist die gleichen Heterozygotieverluste wie die DNA des Tumorgewebes auf (Abb. 4-7). Maitra et al. (2001) stellten in 29% apokriner Metaplasien LOH auf Chromosom 3p fest. Dies scheint die Vermutung zu unterstützen, dass bereits präneoplastisches Gewebe Alterationen aufweist. Auffallend bei diesem Fall sind die Unterschiede zwischen Lymphozyten-DNA, Tumorgewebe und den DTZ auf dem Rb-Locus. Die Lymphozyten-DNA weist sieben Banden auf. Die DNA des metaplastischen Gewebes und die Tumor-DNA zeigen nur vier Banden im Gel und die DTZ sechs Banden. Die DTZ haben sich zu einem frühen Zeitpunkt vom Primärtumor gelöst. Sie entstammen vermutlich einem anderen Zelltyp als die untersuchten Zellen des Primärtumors. Während des Prozesses der Tumorentstehung können verschiedene Zelltypen koexistieren (Klein et al. 2002, Schmidt-Kittler et al. 2003). Möglicherweise vereinte der Zelltyp der DTZ wichtige Eigenschaften in sich. Die Zellen mussten z.B. zur Ablösung vom Primärtumor fähig sein und zur Invasion von Blutgefäßen. Diese Ergebnisse weisen auf sehr frühe Disseminierungsprozesse hin. Die Zellen lösten sich vermutlich noch vom Primärtumor,

bevor dieser durch Standardmethoden nachweisbar war. Klein et al. (2002) weist darauf hin, dass die DTZ sich deutlich früher absiedeln und deshalb häufig nichts mehr mit dem operierten Primärtumor zu tun haben. Weiterhin wurden im myc-L1-Marker ein LOH in der DNA der DTZ bei Patientin FI180836 (Abb. 4-9) und ein „shift“ in der DTZ-DNA bei Patientin KH181139 gefunden. Die Tumorgöße beider Patientinnen war identisch. Jedoch zeigte die Patientin KH181139 ein fortgeschrittenes Stadium an LKM. Es handelte sich hierbei bereits um eine Makrometastasierung (> 0,2 cm) in mindestens 4 Lymphknoten. Unterstützt wird dieser Befund durch eine Arbeit von Contegiacomo et al. (1995), welche ebenfalls eine Korrelation zwischen Mikrosatelliteninstabilität und dem Lymphknotenstatus nachwies.

In zahlreichen Studien wurden MMK auf LOH analysiert. Shen et al. (2000) untersuchten 100 MMK. Sie führten diese Analysen mit 400 Mikrosatellitenmarkern durch. 36 dieser getesteten Marker repräsentierten $\geq 25\%$ der gefundenen Heterozygotieverluste. Diese Bereiche scheinen wichtige Gene der Tumorentstehung und -progression zu enthalten. Die höchste Frequenz an LOH wurde in dieser Studie auf Chromosom 17p12-13 detektiert. In dieser Region liegt das TSG p53. Ebenfalls häufig von LOH betroffen, waren in der Studie von Shen et al. (2000) die Regionen 16q22 und 11q22. Auf Chromosom 16q in der Region 22 liegt das Gen für E-cadherin, einem calcium-abhängigen interzellulären Adhäsionsmolekül. Das Gen ATM (11q22-23) kodiert für eine PI-3'-Kinase, die in der Signaltransduktion, der meiotischen Rekombination und der Zellzykluskontrolle involviert ist (Gentile et al. 2001). Die Heterozygotieverluste (17p12-13, 11q22, 16q22) wurden von Shen et al. (2000) sowohl in Tumoren mit geringer Differenzierung als auch in Tumoren mit hoher Differenzierung gefunden. Dies scheint darauf hinzudeuten, dass die Gene dieser Regionen an frühen Ereignissen der Tumorentstehung beteiligt sind. Weiterhin scheinen die Proto-Onkogene *myc* (8q24) und *erbB2* (17q11-12) in entscheidendem Maße in die Entwicklung von Tumoren der Brust involviert zu sein, da Heterozygotieverluste auch auf diesen Loci auftreten (Shen et al. 2000). Verschiedene Studien wiesen LOH in wenigstens drei distinkten Regionen auf Chromosom 17q nach (Larson et al. 2002, Zudaire et al. 2002, Regitnig et al. 2002), die mit der Entwicklung und/oder der Progression von MMK assoziiert sind. LOH auf Chromosom 17q korrelierten zudem mit einer schlechten Prognose (Watatani et al. (2000).

Siah und Kollegen (2000) zeigten MSI-Raten von 2,9% und 7,5% für die auch von uns untersuchten Mikrosatellitenmarker myc-L1 und tp53. Diese Veränderungshäufigkeiten für die Brusttumore konnten wir bestätigen. Die Wahl der Mikrosatellitenmarker, die analysiert werden sollen, spielt aber eine entscheidende Rolle bei der Rate der Detektion von MSI. Von Aldaz und Kollegen (1995) sind in lobulären MMK höhere Frequenzen an MSI gefunden worden als bei dukalen Karzinomen. Dies könnte eine mögliche Ursache der geringeren Nachweisrate von genetischen Aberrationen in den von uns untersuchten Tumoren sein. Die 17 untersuchten Patientinnen hatten alle duktale Karzinome. Zum anderen sind Tumore sehr heterogen. In einer Studie untersuchten Wild et al. (2000) 39 primäre Brusttumore auf MSI

und LOH in 15 Mikrosatellitenmarkern. Von 30 Patienten wurden verschiedene Tumorareale mittels Lasermikrodissektion isoliert. 29 der 30 untersuchten Tumore wiesen Heterogenität in den genetischen Veränderungen bezüglich der verschiedenen Tumorregionen auf. Es ist also nicht auszuschließen, dass aufgrund der Isolationsmethode in der vorliegenden Arbeit genetische Aberrationen in den Mikrosatellitenmarkern zum Teil nicht identifiziert wurden. Es wurde zwar eindeutig Tumorgewebe (bestätigt durch erfahrene Pathologen) untersucht, aber keine verschiedenen Areale in die Analysen mit einbezogen. Möglicherweise wiesen einige Tumore in anderen Regionen MSI oder LOH in den untersuchten Markern auf.

In der DNA der untersuchten DTZ konnten dagegen häufig Veränderungen in den Mikrosatellitenmarkern festgestellt werden. Von drei Patientinnen wurde die DNA der DTZ charakterisiert und bei zwei Patientinnen auch Veränderungen beobachtet. Die DTZ-DNA beider Patientinnen waren sowohl im Marker myc-L1, als auch im Marker Rb auffällig. Studien zur Charakterisierung einzelner DTZ aus dem Knochenmark von MMK-Patienten mit der komparativen genomischen Hybridisierung (CGH, Klein et al. 1999, 2002b, Schmidt-Kittler et al. 2003) führten häufig zum Nachweis charakteristischer chromosomaler Imbalancen in den Einzeltumorzellen. Schmidt-Kittler und Kollegen (2003) zeigten, dass bei Brusttumoren Tumorzellen sich viel früher vom Primärtumor lösen, als bisher angenommen. Die genomischen Aberrationen waren typische Veränderungen, die auch später die Zellen der Metastasen aufwiesen. Die Veränderungen in der DNA der DTZ aus dem Blut der Patientinnen in der vorliegenden Arbeit sprechen ebenso für eine sehr frühe Disseminierung der Zellen vom Primärtumor. Abb. 4 – 7 zeigt die Auffälligkeiten für den Mikrosatellitenmarker Rb für eine der untersuchten MMK-Patientinnen. Die DTZ ähneln in ihren genetischen Veränderungen eher den Lymphozyten als dem Tumorgewebe. Ein Großteil der Zellen des Primärtumors hat sich wahrscheinlich noch weiterentwickelt und weitere chromosomale Imbalancen entwickelt nachdem sich bereits Zellen gelöst haben und in die Blutbahn eingedrungen sind. Die verschiedenen genetischen Veränderungen in der DNA der DTZ im Vergleich zur DNA des Primärtumorgewebes erschweren somit adjuvante Therapieerfolge. Die adjuvante Therapie wird mit einer Vielzahl an unterschiedlichen Zellen konfrontiert von denen auch einige Resistenzen entwickelt haben (Klein et al. 2002). Die Heterogenität der DTZ wurde bisher für Zellen aus dem Knochenmark gezeigt. Studien zur Analyse von DTZ aus dem Blut sind nicht bekannt. Die vorliegende Arbeit gibt somit erste Hinweise auf eine ebenso große Heterogenität der Tumorzellen, die in die Blutbahn gelangt sind. Weiterhin sprechen die Ergebnisse für eine sehr frühe Disseminierung beim MMK.

5.3.1.2. MSI- und LOH-Analysen beim Nierenzellkarzinom

An Gewebeproben von NZK-Patienten wurden ebenfalls DNA-Analysen durchgeführt. Heterozygotieverluste auf 3p werden sehr häufig bei verschiedenen epithelialen Tumoren, einschließlich Nieren-, Lungen- und Brusttumoren gefunden (Braga et al. 1999).

Zytogenetische Analysen und Alleltypisierung des Chromosomenarms 3p in primären, metastatischen und benignen Tumoren, sowie in präinvasiven Neoplasien zeigten, dass Deletionen auf 3p sehr frühe Ereignisse in der Pathogenese von verschiedenen epithelialen Karzinomen sind (Braga et al. 1999). Wir konnten für die auf dem Chromosomenarm 3p lokalisierten Mikrosatellitenmarker RH66312, WI-19554, D3S3118, RH91127 und STS-N24898 keine genetischen Veränderungen in Form von LOH oder MSI in den 27 NZK-Proben finden. Es wurden diese Marker weiterhin ausgewählt, da sie in der Nähe des *RASSF1A*-Gens liegen (3p21). Das *RASSF1A*-Gen ist in Tumoren relativ häufig methyliert. Durch diese Methylierung erfolgt eine transkriptionelle Inaktivierung des Gens. Unser Ziel war es zu überprüfen, ob dieser Bereich möglicherweise auch häufig genetische Veränderungen in Form von Deletionen oder MSI aufweist. Für den Mikrosatellitenmarker D3S3118 wiesen Braga und Kollegen (1999) in 78% (14/18) der untersuchten Nierenzellkarzinome Deletionen (LOH) nach. Diese hohe Frequenz konnten wir nicht nachvollziehen.

LOH auf 3p detektierten auch Presti und Kollegen (2002) in 94% (60/64) der untersuchten fortgeschrittenen NZK. Junker und Kollegen (2002) wiesen in allen untersuchten primären klarzelligen NZK (19/19) LOH in mindestens einem von sechs Mikrosatellitenmarkern auf 3p nach. All diese Studien machen deutlich, dass chromosomale Veränderungen auf 3p in NZK die häufigsten genetischen Alterationen sind (van den Berg et al. 1996, Bernues et al. 1998, Kok et al. 2000, Junker et al. 2002). Dies betrifft insbesondere klarzellige Karzinome (Dieser Tumortyp wurde in der vorliegenden Arbeit fast ausschließlich auf LOH und MSI untersucht). Im Chromosomenbereich 3p müssen mehrere TSG liegen, die in der Entwicklung von NZK eine entscheidende Rolle spielen. Aufgrund dieser Literaturberichte verwundert es ein wenig, dass wir in der vorliegenden Arbeit in keinem dieser Mikrosatellitenmarker Veränderungen feststellen konnten. Es ist möglich, dass diese Marker zu nah am *RASSF1A*-Gen liegen und in dieser Region selten Mikrosatelliteninstabilitäten vorliegen und dagegen eine Inaktivierung der Genregion durch Hypermethylierung stattfindet. Die Untersuchungen mit diesen Mikrosatellitenmarkern wurden aufgrund der Ergebnisse nicht auf das Paraffinmaterial ausgedehnt.

Die Durchführung weiterer LOH- und MSI-Analysen erfolgte für die Mikrosatellitenmarker p53 Alu, Rb und myc-L1. Für diese Genregionen konnten wir sowohl LOH als auch MSI nachweisen (Tab. 8-4 im Anhang). Die häufigsten genetischen Alterationen in den drei Mikrosatellitenmarkern waren LOH, welche bei 13 von 22 (59,1%) mit Veränderungen in der untersuchten Tumorgewebe-DNA auftraten. MSI konnten für acht von 22 (36,4) der NZK-Patienten mit Veränderungen in der DNA des Tumorgewebes nachgewiesen werden. Die häufigsten Veränderungen traten im Marker Rb auf. Bei 9,4% (8/85) der NZK-Patienten konnten in der Tumo-DNA LOH und bei 3,6% (3/85) der Patienten MSI gefunden werden. Für den Marker p53 Alu wurde bei 7,0% (4/57) der Patienten LOH und bei 5,3% (3/57) der

Patienten MSI in der Tumor-DNA detektiert. Der Mikrosatellitenmarker myc-L1 wies in den seltensten Fällen genetische Alterationen auf (4,4% LOH, 3/68; 2,9% MSI, 2/68). Obwohl einige Studien zu MSI- und LOH-Analysen beim NZK existieren, ist die Signifikanz dieser Instabilitäten für die Tumorprogression weitgehend unbekannt. Die Charakterisierung von sechs NZK-Zelllinien durch Feil und Kollegen (1999) zeigten den Verlust ganzer Chromosomen im Vergleich mit dem normalen Nierenparenchym. Insbesondere das Fehlen der Chromosomen 6, 9, 16 und 20 für klarzellige NZK fiel auf. Charakteristische chromosomale Veränderungen beim klarzelligem NZK wurden auch durch andere Arbeitsgruppen mittels comparativer genomischer Hybridisierung (CGH) und Fluoreszenz in situ Hybridisierung (FISH) nachgewiesen. Typisch waren Verluste in den chromosomalen Regionen 3p, 4q, 6q, 8p, 9q, 14 und Zugewinne auf 5q und 7 (Junker et al. 2003, Sanjmyatav et al. 2005). Die Regionen mit den Verlusten scheinen wichtige TSG zu beinhalten, die in der Pathogenese von sporadischen NZK involviert sind. Verluste auf den Chromosomen 9, 10, 14 sind mit einer Metastasierung assoziiert (Junker et al. 2003). Die Häufigkeit von Deletionen auf dem Chromosom 9 wurde auch von Grady und Kollegen (2001) bestätigt. Sie untersuchten 16 verschiedene Mikrosatellitenmarker auf Chromosom 9 und beobachteten dabei eine hohe Inzidenz für Heterozygotieverluste bei NZKn. Insbesondere die Region 9p21 wies in 57% der untersuchten Fälle Deletionen auf. Die Frequenz von Mikrosatelliteninstabilitäten auf dem Chromosom 9 war bei fortgeschrittenen Tumoren höher (Grady et al. 2001). Von Verlusten auf 9p wurde durch Kimura und Kollegen (1996) ebenfalls für Pankreaskarzinome berichtet. Sie wiesen in 50% der untersuchten Tumore LOH nach. Weiterhin beobachteten Kimura und Kollegen (1996) LOH in 32% der Fälle auf 1p und in 59% der Fälle auf 17p. Auf dem Chromosom 1p befindet sich das myc-L1-Gen und auf 17p das p53-Gen, welche wir in der vorliegenden Arbeit ebenfalls auf Mikrosatelliteninstabilitäten untersucht haben. Die Wahl dieser Marker hat sich als richtig erwiesen, da wir bei 7,0% der Patienten p53 Alu und bei 9,4% der Patienten myc-L1 Heterozygotieverluste für NZK nachweisen konnten. Nur allein ein Mikrosatellitenmarker jeweils auf dem entsprechenden Chromosom ergab relativ häufig genetische Veränderungen. Sugimura und Kollegen (1997) konnten ebenfalls LOH in 6% (2/35) der untersuchten NZK auf 17p (p53 Genlokus) detektieren. Unsere Ergebnisse zeigen, dass genetische Instabilität ein nachweisbares Phänomen in NZK ist und wahrscheinlich mit der Entwicklung der Erkrankung assoziiert ist.

In der vorliegenden Arbeit gelang von neun NZK-Patienten die Isolation der DNA aus DTZ mit anschließenden MSI- und LOH-Analysen. Es konnte festgestellt werden, dass relativ häufig DNA-Veränderungen in den untersuchten Mikrosatellitenmarkern bei den DTZ auftraten. Dies spricht für eine genetische Instabilität dieser Zellen. Nur zwei Patienten wiesen keine Veränderungen in der DNA der untersuchten DTZ auf. In den meisten Fällen handelte es sich um MSI (5/7). LOH waren weniger häufig vorhanden (2/7). Besonders der Marker myc-L1 wies mit vier MSI und einem LOH mehrfach Alterationen in der DTZ-DNA auf.

Im Marker *Rb* konnte in der DTZ-DNA von zwei Patienten Veränderungen nachgewiesen werden (ein Patient mit einem LOH und ein Patient mit MSI). Die genetischen Veränderungen betrafen jeweils ausschließlich die DNA der DTZ. Im Normal- oder Tumorgewebe dieser Patienten wurden keine Alterationen beobachtet. Die DNA der DTZ mit Auffälligkeiten im Mikrosatellitenmarker *Rb* wiesen auch im Marker *myc-L1* Veränderungen auf. Humane Tumore akkumulieren zum Teil multiple Mutationen, die nicht durch geringe Raten spontaner Mutationen (2-3/Zelle) in normalen Zellen erklärt werden kann (Hussein and Wood 2002). Mathematische Modelle schätzen, dass für die Entwicklung solider Tumore ca. sechs bis zwölf Mutationen in jeder Tumorzelle notwendig sind (Levinson et al. 1987, Kunkel et al. 1992). Mikrosatelliteninstabilität ist von mehreren Parametern abhängig, wie der Anzahl der Wiederholungen, der Sequenz und chromosomaler Lokalisation der Instabilität und der Reparaturfähigkeit der Zellen (Hussein and Wood 2002). Daten zu MSI und LOH in DTZ von NZK-Patienten sind bisher nicht bekannt. Unsere Studien an wenigen Patienten sprechen für eine hohe Instabilitätsrate in den DTZ, da sieben von neun der untersuchten Patienten Veränderungen in den DTZ aufwiesen.

5.3.2. Methylierungsanalysen

Die DNA-Proben wurden weiterhin in Methylierungsanalysen untersucht. Das Stilllegen von Genen, wie *Rb* und *p16* durch abnorme Promotormethylierung in Zusammenhang mit der Inaktivierung anderer Allele durch klassische Ereignisse z.B. LOH werden in humanen Tumoren häufig gefunden (Yang et al. 2002). Die Daten von Yang et al. (2002) zeigen, dass in Brusttumoren ein Allel durch Deletion verloren ging und das andere Allel durch aberrante Methylierung inaktiviert wurde. Beide Ereignisse führen gleichzeitig zu einer biallelen Inaktivierung und kompletten Funktionsverlust des Gens. In der vorliegenden Arbeit wurden die Promotorregionen der Gene *RASSF1A*, *p16*, *rar-β* und *FHIT* näher charakterisiert. Die Wahl fiel auf diese Gene, da sie als wichtige TSG eingeschätzt werden.

5.3.2.1 RASSF1A-Promotormethylierung

Insgesamt lässt sich sagen, dass die *RASSF1A*-Promotorregion sehr häufig im Tumor methyliert ist. Dies wurde sowohl bei MMK als auch bei NZK beobachtet. Besonders MMK wiesen in nahezu allen untersuchten Tumoren-DNA-Proben *RASSF1A*-Methylierungen auf. Die Klonierung und Charakterisierung des humanen *RASSF1*-Gens wurde im Jahr 2000 zum ersten Mal beschrieben (Dammann et al. 2000). Es konnten drei Transkripte A, B und C identifiziert werden. Die Transkripte A und C werden in allen normalen Geweben exprimiert. Das Transkript A fehlte in allen untersuchten Lungenkarzinomzelllinien und in verschiedenen anderen Tumorzelllinien. Der Verlust der Expression korrelierte mit der Methylierung der CpG-Inseln in der Promotorsequenz von *RASSF1A*. Der Promotor war in 40% (24/60) primärer Lungentumore methyliert. Re-Expression des Transkriptes A in

Lungenkarzinomzelllinien führte zu einer Reduktion der Koloniebildung und inhibierte die Tumorbildung in Nacktmäusen (Dammann et al. 2000). In weiteren Arbeiten dieser Arbeitsgruppe waren bei 71% (37/52) der untersuchten primären PCA und 64% (29/45) der Pankreaskarzinome die RASSF1A-Promotorregion methyliert (Liu et al. 2002, Dammann et al. 2003). In aggressiveren Tumoren war die Methylierungsfrequenz höher als in weniger malignen Tumoren (Liu et al. 2002). In Ovarialtumoren betrug die Methylierungsrate von RASSF1A 50% (25/50) (de Caceres et al. 2004). Eine Methylierung des RASSF1A-Promotors in Weichteilsarkomen konnte ebenfalls in Kooperation mit unserer Arbeitsgruppe nachgewiesen werden (Seidel et al. 2005). Die Hypermethylierungsrate betrug 20% (17/84). Wobei die Leiomyosarkome als Unterklasse der Weichteilsarkome mit 39% (7/18) die höchste Rate an Hypermethylierung im RASSF1A-Gen zeigten. Unsere Arbeit über Weichteilsarkome berichtet auch über ein signifikant erhöhtes Risiko der Patienten mit einer RASSF1A-Hypermethylierung am Tumor zu versterben, im Vergleich zu Patienten ohne Hypermethylierung dieses Gens (Seidel et al. 2005). Dammann und Kollegen (2001) berichteten in einer Arbeit von einer Hypermethylierung des RASSF1A-Gens in 62% (28/45) der untersuchten primären MMK. Die Methylierungsfrequenz war in den verschiedenen Differenzierungsgraden bei den MMK-DNA-Proben relativ konstant. Dies zeigt, dass RASSF1A-Methylierung vermutlich ein frühes Ereignis bei der Brustkrebsentwicklung ist (Dammann et al. 2001). Ähnliche Ergebnisse fanden auch Dulaimi und Kollegen (2004). Sie wiesen in 65% (22/34) der untersuchten MMK-Patienten eine Hypermethylierung der RASSF1A-Promotorregion nach. Die Analysen wurden dabei nicht am Primärtumor durchgeführt, sondern an präoperativen Serumproben. In den Serumproben von gesunden Frauen und Patientinnen mit entzündlichen Brusterkrankungen beobachteten Dulaimi und Kollegen keine Hypermethylierung des RASSF1A-Gens. In NZK sind ebenfalls Hypermethylierungen der Promotorregion des RASSF1A-Gens nachgewiesen worden (Yoon et al. 2001, Morrissey et al. 2001, Tokinaga et al. 2004, Gonzalgo et al. 2004). Die Methylierungsraten lagen dabei zwischen 56% und 79%. Die Methylierungsrate in der vorliegenden Arbeit betrug 60,2% und ist damit vergleichbar mit den Werten in den publizierten Arbeiten. In unserer Arbeit wiesen wir auch in 44,9% der Normalgewebe-DNA der NZK-Patienten eine leichte Methylierung des RASSF1A-Gens nach. Tokinaga et al. (2004) konnten ebenfalls in den meisten untersuchten Normalgeweben eine leichte Methylierung feststellen. Yoon und Kollegen (2001) beobachteten in keinem untersuchten Normalgewebe eine Methylierung der RASSF1A-Promotorregion. Normalgewebe ist Gewebe, das dem Tumor benachbart ist und normal erscheint, aber altersabhängig ist und auch Veränderungen der Genexpression zeigen kann.

Insgesamt lässt sich feststellen, dass in der DNA der von uns untersuchten Tumorarten eine hohe Frequenz an Hypermethylierung des RASSF1A-Gens auftritt. Diese Ergebnisse bestätigen die publizierte Literatur. Methylierung scheint ein Hauptereignis für den Funktionsverlust des RASSF1A-Gens zu sein, da somatische Mutationen für dieses Gen

selten sind (Dammann et al. 2000). Zum Beispiel fanden Liang und Kollegen (1998), dass das RASSF1A-Gen in Kolon-, Blasen- und PCA sehr häufig hypermethyliert sind. Vergleichbare Daten lieferten Huang et al. (1999) zum MMK und Shiraishi et al. (1999) zu Lungentumoren. Diese Daten weisen auch darauf hin, dass Methylierung von Genen möglicherweise durch Alterungsprozesse bedingt sind. Altersabhängige Methylierungsveränderungen sind bei der Entwicklung von neurologischen Erkrankungen und Autoimmunerkrankungen beteiligt (Richardson 2003). Die Entwicklung von Tumoren bei älteren Personen wird ebenfalls mit Methylierungsveränderungen in Zusammenhang gebracht. Methylierungsveränderungen, die altersbedingt sind, können auch die Inaktivierung von tumorassoziierten Genen betreffen. In einigen Geweben wird die Anzahl der methylierten Cytosine in alternden Zellen verringert und diese Demethylierung unterstützt möglicherweise chromosomale Instabilität, was das Risiko für Neoplasien erhöht (Richardson 2003). In anderen Geweben, z.B. Interstitial-Krypten wird die Methylierung von Genen erhöht, was ein erhöhtes Risiko für Kolonkarzinome bei fortgeschrittenem Alter der Personen bewirkt (Rashid and Issa 2004). Waki und Kollegen (2003) untersuchten Zellen verschiedener gesunder Gewebe (von Autopsien) auf Promotormethylierung verschiedener Gene, unter anderem auch RASSF1A. Tumorsuppressor- und tumorassoziierte Gene, wie *RASSF1A* waren bei Personen jünger als 32 Jahre generell unmethyliert. In den Proben der Personen über 42 Jahre waren Promotormethylierungen in verschiedenen Frequenzen nachweisbar. Die Theorie der Hypermethylierung von Genen im Alter wird auch durch die vorliegende Arbeit gestützt. Die NZK-Patienten waren nicht jünger als 35 Jahre. Der Großteil der Patienten, die eine Methylierung in der DNA des Tumorgewebes aufwiesen war über 60 Jahre alt (45/59, 76,3%). Die untersuchten MMK-Patientinnen waren nahezu alle älter als 50 Jahre, wenn sie eine RASSF1A-Hypermethylierung in der DNA des Tumorgewebes hatten (15/16, 93,8%).

5.3.2.2. p16-Methylierung

Das TSG *p16* liegt auf dem kurzen Arm von Chromosom 9 (9p21). Es wird berichtet, dass dieses Gen in vielen Tumorzelllinien homozygot deletiert vorliegt, unter anderem auch in NZK-Zelllinien. In humanen Neoplasien, wie z.B. Melanomen und Leukämien ist die p16-Expression entweder durch homozygote Deletion oder durch Hypermethylierung der CpG-Inseln in der Promotorregion verloren, während mutationsbedingte Inaktivierung eher selten ist. In der vorliegenden Arbeit wurde bei den MMK-Patientinnen in 17,6% (3/17) der untersuchten Primärtumor-DNA-Proben eine Methylierung des p16-Promotors nachgewiesen. Untersuchte Normalgewebe-DNA (n=17) und Metastasen-DNA (n=6) wiesen keine Hypermethylierung auf. Lehmann et al. (2002) detektierten p16-Promotor-Hypermethylierungen sowohl in intraduktalen als auch in invasiven Karzinomen in vergleichbaren Frequenzen (6 – 10%). Dies spricht dafür, dass eine epigenetische Inaktivierung in den meisten Fällen passiert, bevor sich invasives Wachstum entwickelt. Bei

den von uns untersuchten NZK waren 10,2% (10/98) der untersuchten Tumor-DNA-Proben in der p16-Promotorregion methyliert. Die DNA der Metastasen zeigte zu 19,4% (7/36) eine p16-Promotormethylierung. Bei 6,1% (6/98) der Normalgewebe-DNA konnte ebenfalls eine Methylierung beobachtet werden. Sanz-Casla und Kollegen (2003) fanden in 20% (8/40) der untersuchten NZK eine Methylierung der Promotorregion. Weitere Studien lieferten Methylierungsraten von 14% (2/14) und 10% (5/50) für NZK (Kawakami et al. 2003, Cairns 2004). Die publizierten Daten zum NZK zeigen vergleichbare Detektionsraten zu der vorliegenden Arbeit. P16-Hypermethylierung wurde weiterhin von Nuovo und Kollegen (1999) für Lungen- und Zervixtumore beschrieben. Sie wiesen die Hypermethylierung von p16 nur in neoplastischen Zellen nach und nicht im Normalgewebe. Die Geninaktivierung durch Methylierung war mit einem Verlust der p16-Proteinexpression assoziiert (Nuovo et al. 1999). Hypermethylierungsanalysen an der p16-Promotorregion von Pankreaskarzinomen, neuroendokrinen Tumoren und bei Patienten mit Pankreatitis zeigten Methylierungsraten von 43% (19/44), 17% (2/12) und 18% (3/17) (Dammann et al. 2003). Für Weichteilsarkome konnten wir eine Methylierungsrate von 27% (22/82) nachweisen (Seidel et al. 2005). In einigen Publikationen wurden auch p16-Hypermethylierungen im Normalgewebe gefunden, was vergleichbar zum RASSF1A-Gen für Alterungsprozesse in den Geweben spricht (Toyota et al. 1999, Waki et al. 2003, Belinsky et al. 2006). Weiterhin ist eine Methylierung von p16 ein sehr frühes epigenetisches Ereignis, was z.B. an den Lungen von Rauchern nachgewiesen wurde (Belinsky et al. 2006). *p16* wurde dabei ebenfalls in histologisch normalen Bronchialepithelien von einigen Rauchern detektiert.

5.3.2.3. rar- β -Methylierung

Studien zur DNA-Hypermethylierung bei MMK führten zur Identifizierung bestimmter Schlüsselgene als Ziel für eine epigenetisches „silencing“. Unter anderem wurde der Retinsäure-Rezeptor rar- β entdeckt (Ueki et al. 2000). Das TSG liegt auf 3p24. *Rar- β* ist an der Regulation der zellulären Wachstumsinhibierung und an der Apoptose beteiligt. Die Mechanismen dieser Regulation sind jedoch bisher unbekannt. Die DNA des Tumorgewebes der MMK-Patientinnen wies mit 58,8% (10/17) sehr häufig eine Methylierung der rar- β -Promotorregion auf. Die DNA der Metastasen war zu 33,3% (2/6) methyliert. Diese hohen Methylierungsraten für das rar- β -Gen wurden in den NZK nicht gefunden. Methylierungsstudien an verschiedenen Tumorarten wiesen Detektionsraten von 73% für Ösophaguskarzinome und 45% für Lungentumore nach (Kuroki et al. 2003, Guo et al. 2004). Eine ähnlich häufige Methylierung der rar- β -Promotorregion in MMK wie in der vorliegenden Arbeit wurde auch von Fackler et al. (2003) gefunden. Sie detektierten in 48% der primären Tumore eine rar- β -Gen-Methylierung. *Rar- β* ist epigenetisch in vielen Tumorarten stillgelegt, wie in Tumoren der Brust, Prostata und Lunge (Fackler et al. 2003). In der vorliegenden Arbeit ist in 4,1% der NZK eine Methylierung beobachtet wurden. Im Vergleich zu anderen Tumorarten scheint dies sehr gering, aber eine Arbeit von Dulaimi et al. (2004) berichtet

ebenfalls über geringe Detektionsraten von 8% (4/50) in klarzelligen NZK. Die Methylierung der Promotorregion des rar- β -Gens scheint ebenso in die Progression von MMK involviert zu sein, da das Vorhandensein von CK⁺-Zellen mit der Methylierung des rar- β -Promotors korrelierte.

5.3.2.4. FHIT-Methylierung

Basierend auf der Fähigkeit des FHIT-Proteins Tumorgenität von Tumorzellen in Nacktmäusen zu eliminieren bzw. zu reduzieren, wurde das *FHIT*-Gen (Lokalisierung auf 3p14.2) als Tumorsuppressor beschrieben (Dumon et al. 2001). Eine aberrante FHIT-Expression ist mit der Pathogenese und Prognose verschiedener Tumore assoziiert (Yang et al. 2001, Lee et al. 2001). Der Mechanismus der FHIT-Suppression ist aber immer noch ungeklärt. Die Methylierung der FHIT-Promotorregion in der DNA der Tumore korrelierte signifikant mit einer schlechteren Prognose für die MMK-Patientinnen. Von 17 untersuchten Patienten wiesen zwei eine FHIT-Methylierung in der Tumor-DNA auf und beide sind bereits verstorben. In univariaten Cox-Regressions-Analysen war das Risiko am Tumor zu versterben 10fach erhöht bei Patienten mit einer FHIT-Promotormethylierung im Vergleich zu Patienten, die keine Methylierung der FHIT-Promotorregion in der DNA der Tumore aufwiesen. Auch in multivariaten Cox-Regressions-Analysen betrug dieses Risiko immer noch 6,8. Daten zum Überleben der Patienten bzw. der Prognose für MMK-Patienten mit einer FHIT-Methylierung in der DNA der Tumore sind bisher in der Literatur nicht bekannt.

LOH in der Region des FHIT-Gens wurden bei 25 – 45% der MMK detektiert (Maitra et al. 2001, Ahmadian et al. 1997). Yang et al. (2002) wiesen in ihren Analysen zum MMK in 48% (22/46) der Tumore eine FHIT-Hypermethylierung nach. Sie führten ebenfalls zusätzlich LOH-Studien durch und fanden bei 20% (8/40) Verluste in diesem Gen. Patienten mit gleichzeitigem LOH und Hypermethylierung der FHIT-Region zeigten einen kompletten Verlust der FHIT-Proteinexpression. Die Rate der Hypermethylierung ist höher als der Prozentsatz an LOH auf dem FHIT-Lokus. Die FHIT-Hypermethylierung wird als ein Hauptmechanismus bei der Brustkrebsentstehung angesehen (Yang et al. 2002). Kuroki und Kollegen (2003) fanden in 45% der untersuchten Ösophaguskarzinome eine FHIT-Hypermethylierung in der DNA der Tumoren. Die entsprechende DNA der Normalgewebe wies in 30% der Fälle eine Methylierung der Promoterregion auf. Die klinischen Stadien I und II fielen dabei besonders auf, da in 78% der Fälle eine Hypermethylierung nachweisbar war. Das *FHIT*-Gen scheint demnach eine wichtige Rolle in der frühen Tumorprogression von Ösophaguskarzinomen zu spielen. Der Nachweis von Hypermethylierung in der DNA von Normalgewebe weist möglicherweise auf die Anwesenheit prämaligener Läsionen hin (Kuroki et al. 2003). In hepatischen Cholangiokarzinomen konnte in 42% der Tumore eine Methylierung des *FHIT*-Gens beobachtet werden (Foja et al. 2005). Diese Arbeitsgruppe wies zusätzlich Verluste der Heterozygotie (LOH) in diesem Gen in 18% der Fälle nach.

Für Tumorthapien wird diskutiert demethylierende Agenzien einzusetzen. Diese könnten bei der Tumorprävention für Personen eine Rolle spielen, die ein erhöhtes Krebsrisiko haben, da in frühen neoplastischen Veränderungen z.B. eine FHIT-Hypermethylierung nachgewiesen wurde. Fang und Kollegen (2005) führten in vitro Experimente mit Genistein durch. Durch Demethylierung und damit Reaktivierung von *p16* und *rar-β* wurde das Zellwachstum inhibiert. Genistein ist in der Lage DNA-Methyltransferasen zu inhibieren und durch Methylierung stillgelegte Gene zu reaktivieren. In einigen Studien wurden mehrere TSG gleichzeitig auf Methylierung untersucht. Dabei sind häufig mehrere Gene in den Tumoren der Patienten mit fortgeschrittenen Tumorerkrankungen methyliert (Kuroki et al. 2003, Guo et al. 2004). Diese Daten weisen auf eine Akkumulation von Hypermethylierung in TSG während der Tumorentwicklung hin.

5.3.3. Der SNP 309-Polymorphismus

Als Antwort auf zellulären Stress wird das p53 Protein stabilisiert und die Konzentration erhöht. P53 wird zu einem aktiven Transkriptionsfaktor und initiiert ein Programm, welches zu DNA-Reparatur, Zellzyklusarrest, zellulärem Altern oder Apoptose führt (Lain und Lane 2003). Genetische und biochemische Studien zeigten, dass das *mdm2* Onkogen ein negativer Hauptregulator des p53-Proteins ist (Bond et al. 2004). Im p53-abhängigen-P2-Promotor des *mdm2*-Gens wurde ein Polymorphismus (SNP309) gefunden, der ein einzelnes Nukleotid betrifft (T → G). Der SNP309-Polymorphismus konnte sowohl bei hereditären als auch sporadischen Tumoren nachgewiesen werden. Bond et al. (2004, 2007) zeigten, dass Personen mit dem G/G-Polymorphismus mindestens neun Jahre (abhängig von der Tumorart) früher an sowohl hereditären als auch sporadischen Tumoren, erkranken, im Vergleich zu Personen mit der Wildtyp T/T-Variante.

Die Sequenzierung der DNA für den Bereich des SNP309-Polymorphismus von 95 MMK-Patientinnen führte zu folgendem Ergebnis: 28,4% (27/95) mit T/T-Genotyp, 54,7% (52/95) mit T/G-Genotyp und 16,8% (16/95) mit dem G/G-Genotyp. Eine signifikante Korrelation zum Erkrankungsalter konnten wir nicht feststellen. Es zeigten sich aber Tendenzen. So erkrankten Patientinnen mit dem T/T-Wildtyp durchschnittlich mit 53 Jahren, Patientinnen mit dem T/G-Genotyp mit 57 Jahren und Patientinnen mit dem G/G-Genotyp mit 61 Jahren. Nach unseren Ergebnissen erkrankten also Patientinnen mit dem Wildtyp-SNP309 acht Jahre früher als Patientinnen mit einem G/G-Polymorphismus. Dies steht im Gegensatz zu den Daten von Bond et al. (2004, 2007), welche von einem zehn Jahre früheren Erkranken an Brustkrebs berichten bei Patienten mit dem G/G-SNP309-Polymorphismus im Vergleich zu Patienten mit dem T/T-Wildtyp. Ähnliche Daten wie Bond fanden auch Wasielewski und Kollegen (2007) zu familiären Brustkrebserkrankungen. Sie wiesen in 16% (43/271) der Patienten, die vor dem 52. Lebensjahr erkrankten den G/G-Polymorphismus nach. Dagegen hatten nur 4% (3/72) der Patienten, die später familiären Brustkrebs entwickelten einen G/G-

SNP309-Polymorphismus. Vier weitere Studien zum MMK konnten kein signifikant erhöhtes Risiko für Patienten mit dem Polymorphismus gegenüber denen mit dem Wildtyp SNP309 feststellen (Ma et al. 2006, Petenkaya et al. 2006, Campbell et al. 2006, Boersma et al. 2006). Möglicherweise ist der Ursprung der untersuchten Populationen entscheidend für die Ergebnisse.

Für die NZK wurde der SNP309-Status ebenfalls bestimmt. Das Auftreten des SNP309-Polymorphismus korrelierte signifikant mit dem Erkrankungsalter. Patienten mit dem T/T-Wildtyp sind nicht vor dem 61. Lebensjahr an NZK erkrankt. Demgegenüber sind 31,1% (14/45) der Patienten mit dem T/G-Polymorphismus bereits vor dem 61. Lebensjahr erkrankt. Da nur ein Patient den G/G-Genotyp aufwies, kann keine Aussage getroffen werden, ob Patienten mit diesem Polymorphismus noch früher erkranken, als Patienten mit dem T/G-Genotyp. Die Korrelation mit dem Erkrankungsalter zeigte sich besonders deutlich bei den männlichen NZK-Patienten. Die weiblichen NZK-Patienten wiesen keine Korrelation zwischen dem SNP309-Polymorphismus und dem Erkrankungsalter auf. Die männlichen Patienten mit dem T/G-Genotyp (61 Jahre) erkrankten dagegen durchschnittlich zehn Jahre früher im Vergleich zu den Patienten mit dem T/T-Genotyp (71 Jahre). Bisher sind keine Publikationen zur Untersuchung des SNP309-Polymorphismus beim NZK bekannt. Die Daten der vorliegenden Arbeit zeigen aber für das NZK ein signifikant erhöhtes Risiko für Personen mit dem T/G-SNP309-Polymorphismus früher an NZK zu erkranken, als Personen mit dem T/T-Wildtyp. Diese Daten stehen im Einklang mit Studien zu anderen Tumorarten wie Weichteilsarkomen (Bond et al. 2004), Kolorektalkarzinome (Menin et al. 2006), Li-Fraumeni Syndromen (Bougeard et al. 2006, Ruijs et al. 2007) und Endometrixtumoren (Walsh et al. 2006). Dharel und Kollegen (2006) wiesen ein erhöhtes Auftreten des G/G-Polymorphismus (33%) bei Patienten mit hepatozellulärem Karzinom nach. Patienten ohne Lebertumore hatten in nur 23% der untersuchten Fälle den Polymorphismus.

Viele Publikationen berichteten von erhöhten mdm2-mRNA und Protein-Werten in Brusttumoren, die den Östrogenrezeptor α (ER) exprimieren (Gudas et al. 1995, Bueso-Ramos et al. 1996, Okumura et al. 2002). Der Östrogenrezeptor ist eine kritische Komponente des Östrogen-signalweges. Tatsächlich konnte auch bewiesen werden, dass die Expression des Östrogenrezeptors α (ER α) die Transkription von mdm2 induziert (Phelps et al. 2003). Die Regulation der MDM2-Expression durch Östrogen, genauso wie durch das Thyroidhormon wird auch zum Teil durch die gut charakterisierte Region des mdm2-P2-Promotors vermittelt (Okumura et al. 2002, Phelps et al. 2003). Beide der ER α und der Thyroidhormonrezeptor können an diese Region des Promotors binden und die Transkription des mdm2-Gens aktivieren (Kinyamu et al. 2003). Interessanterweise liegt der SNP309 genau in dieser Promotorregion. Das G-Allel von SNP309 erhöht die Affinität des mdm2-Promotors für Sp1, was ein gut charakterisierter kotranskriptioneller Aktivator für verschiedene Hormonrezeptoren ist, unter anderem auch für den ER (Petz et al 2004, Stoner

et al. 2004). Diese Beobachtungen führen zu der Hypothese, dass der SNP309-Lokus die Effekte von Hormonen ändern könnte, wie bei Östrogenen während der Tumorgenese. Das könnte zu geschlechtsspezifischen Unterschieden beitragen, wie sie in vielen verschiedenen Krebsarten (Brusttumore, Weichteilsarkome, Ashkenazi Lymphome) gefunden wurden (Bond et al. 2006). Wenn der Östrogenspiegel zusammen mit dem G-Allel von SNP309 eine frühere Tumorbildung bei Frauen fördert, so sollten die Unterschiede zwischen G/G-Genotyp-Frauen und T/T-Genotyp-Frauen im Alter vor der Menopause (bis ca. 51 Jahre) am größten sein, wenn spezifische weibliche Hormonlevel wie für Östrogen am höchsten sind. Bond und Kollegen (2006) konnten diesen hormonabhängigen Unterschied bei Weichteilsarkomen und Brusttumoren feststellen. Sie wiesen nach, dass 67% der Frauen mit einem G/G-Genotyp bis zum Alter von 51 Jahren Weichteilsarkome entwickelten, aber nur 27% der Frauen mit dem T/T-Genotyp. Frauen mit einem T/T-Genotyp bildeten wesentlich später Weichteilsarkome. Für Patienten mit Brusttumoren konnte ebenfalls ein früheres Auftreten von Tumoren bei Frauen mit dem G/G-Genotyp im Vergleich zu Frauen mit T/T-Genotyp beobachtet werden. Diese Daten wurden an Patientinnen erhoben, die eine starke ER-Expression in den Tumoren aufwiesen. Frauen mit dem G/G-Genotyp entwickelten durchschnittlich mit 53 Jahren einen Brusttumor und Frauen mit dem T/T-Genotyp mit 60 Jahren. Für Patientinnen mit ER-negativen Tumoren wurde dies nicht gefunden. Diese Unterschiede in der Entwicklung von Brusttumoren bei ER-positiven Frauen konnten wir in der vorliegenden Studie nicht nachweisen. Frauen mit dem G/G-Genotyp erkrankten nicht früher an Brustkrebs im Vergleich zu Frauen mit dem T/T-Genotyp.

5.4. Protein-Analysen

5.4.1. uPA, uPAR, PAI-1 und Survivin

Es konnte gezeigt werden, dass die Blockierung von bestimmten Proteinasen eine Invasion von Tumorzellen bei verschiedenen humanen Tumorzelllinien *in vitro* und *in vivo* verhindert (Ossowski 1988, Evans et al. 1997). Basierend auf diesen Effekten wird vermutet, dass uPA und uPAR sich auf die Tumorentwicklung und maligner Aggressivität auswirken. Die Funktion von uPA und uPAR wird durch den Plasminogen Aktivator Inhibitor (PAI-I und PAI-II) reguliert. PAI ist ein Glykoprotein und kontrolliert uPA und uPAR durch Bindung an die aktive Seite des Rezeptors oder durch Bindung an freies uPA und uPA/uPAR Komplexe (Ellis et al. 1990). Es wird angenommen, dass PAI die Invasion und die Metastasierung inhibiert und damit mit einer guten Prognose assoziiert ist. Jedoch konnten einige Arbeitsgruppen eine höhere PAI-Expression in Tumorzellen als in normalen Zellen feststellen. Die Proteinmenge war negativ assoziiert mit dem Überleben der Patienten bei verschiedenen Tumorarten (Nekarda et al. 1994, Costantini et al. 1996, Robert et al 1999). Ob es sich hier möglicherweise um Splice-Varianten des PAI-Proteins handelte oder Veränderungen in der Sequenz des Proteins durch Mutationen in der Gensequenz auftraten, wurde in den Publikationen nicht untersucht.

In der vorliegenden Studie wurde das Gesamtprotein aus den Tumoren von 36 MMK-Patientinnen isoliert und mittels ELISA-Assay die Proteinlevel für uPAR, uPA und PAI-1 bestimmt. Dies wurde jeweils für das korrespondierende Tumor- und Normalgewebe durchgeführt. In den statistischen Analysen konnte in Chi²-Tests eine signifikante Korrelation zwischen einer Überexpression an uPA im Tumor und dem Auftreten von Bl⁺-Zellen vor der Entfernung des Primärtumors gefunden werden ($P = 0,006$). Dies spricht dafür, dass die Bl⁺-Zellen an der Progression des Tumors beteiligt sein könnten, da uPA als proteolytischer Faktor bei der Tumorzellinvasion und Metastasierung mitwirkt. Anders sah es bei der Expression von uPAR aus, d.h. uPAR war mit einem schlechteren Überleben assoziiert, wenn die Konzentration im Tumor ähnlich der Konzentration im Normalgewebe war. Die 3-Jahresüberlebensrate betrug für Patientinnen mit „normalen“ uPAR-Expressionslevel 51,8% gegenüber 82,6% bei Patientinnen mit einer hohen uPAR-Proteinkonzentration im Tumor. Eine höhere Konzentration an uPAR im Tumor war somit für das Überleben der Patienten günstiger. Der Rezeptor für den Urokinase-Typ Plasminogen Aktivator kommt im Tumorgewebe in verschiedenen molekularen Formen vor. Funktionell aktives uPAR ist stark glykosyliert, was sich in der starken Heterogenität der Molekularmasse von uPAR zeigt (Behrendt et al. 1990). uPAR interagiert zudem mit verschiedenen anderen Proteinen wie (pro-)uPA, uPA/PAI-1 oder uPA/PAI-2-Komplexen, mit dem extrazellulären Matrixprotein Vitronektin und mit bestimmten Integrinen (Behrendt und Stephens 1998, Wei et al. 1999). Möglicherweise haben diese verschiedenen uPAR-Formen oder auch Splice-Varianten tumorassoziierte biologische Funktionen, die in unterschiedlichem Maß für das Überleben verantwortlich sind. Bei den Patientinnen mit „normalen“ uPAR-Konzentrationen im Tumor fehlt eventuell eine bestimmte uPAR-Form, die schützend wirkt. Weiterhin ist es auch möglich, dass Tumorzellen zusätzliche Formen und Varianten von uPAR produzieren, die nicht durch Antikörper detektiert werden, die in der vorliegenden Studie verwendet wurden. Die Überexpression zweier Splice-Varianten von uPAR (uPAR-del4/5) war bei einer Studie von Luther und Mitarbeitern (2003) mit einem kürzeren krebsfreien Überleben bei MMK-Patienten assoziiert. Diese Ergebnisse wurden durch Kotzsch et al. (2005) bestätigt. In mehreren Studien wurde eine sehr gute Prognose für Brustkrebspatienten nachgewiesen, die keine LKM und geringe Proteinmengen an uPA und PAI-1 im Tumor aufwiesen (Harbeck et al. 2002, 2004a und b). Dagegen hatten lymphknotennegative Patienten mit hohen Expressionsraten an uPA und PAI-1 ein erhöhtes Risiko einer Tumorerkrankung, vergleichbar zu Patienten mit drei oder mehr axillären LKM (Harbeck et al. 2004a und b). Erste Ergebnisse einer Studie mit lymphknotennegativen MMK-Patienten zeigen, dass es durch Chemotherapie zu einer deutlichen Reduktion der Tumorerkrankung bei Patienten mit hohen uPA- und PAI-1-Expressionsleveln kam (Harbeck et al. 2004b). Die zusätzliche Bestimmung der uPA, PAI-1 und uPAR-Konzentration könnte somit ein wichtiger Prognosefaktor bei Patienten mit MMK sein. Lymphknotennegative Patienten mit hohen uPA- und PAI-Konzentrationen können damit von einer Chemotherapie profitieren. Eine Studie von Meijer-van Gelder et al. (2004) zeigte eine geringere Effizienz einer

Hormontherapie mit Tamoxifen bei Patienten mit hohen Tumorkonzentrationen an uPA, uPAR und PAI-1. Diese Daten könnten für weitere Behandlungen bei lymphknotennegativen MMK-Patienten entscheidend sein, da diese oft keine weitere Therapie nach der Entfernung des Tumors erhalten bzw. ausschließlich mit einer Hormontherapie behandelt werden.

Proteinanalysen wurden auch an den NZK-Gewebeproben durchgeführt. Dafür wurde von 39 Patienten das Gesamtprotein sowohl des Tumors als auch des autologen Normalgewebes isoliert. Kaplan-Meier-Analysen zeigten ein erhöhtes Risiko für Patienten mit einer hohen uPAR-Konzentration im Tumor an ihrer Erkrankung zu versterben, im Vergleich zu Patienten mit einer normalen uPAR-Konzentration im Tumor. Diese Daten waren nicht signifikant aber der Unterschied deutlich sichtbar. Bei den Patienten mit hohen uPAR-Werten betrug die 3-Jahresüberlebensrate 53,5% und bei den Patienten mit normalen uPAR-Werten 83,3%. Das erhöhte Risiko zeigte sich auch in der Cox-Regression. In einer univariaten Analyse lag das relative Risiko bei 2,8 ($P = 0,137$). Patienten mit hohen uPAR-Werten im Tumor wiesen demnach ein deutlich erhöhtes Risiko auf, an ihrem Tumor zu versterben gegenüber Patienten, die keine erhöhten uPAR-Werte im Tumor hatten. Für den Inhibitor PAI-1 konnten wir keine Zusammenhänge mit den klinischen Parametern nachweisen. Aus der Literatur sind jedoch Korrelationen zwischen erhöhten PAI-1-Konzentrationen und einer schlechten Prognose bekannt (Hofmann et al. 1996, Ohba et al. 2005). Andreasen et al. (1986) beschrieben, dass PAI-1 eine Rolle bei der Tumordinvasion spielt, indem es das Tumorgewebe gegen uPA-vermittelte Zerstörung schützt. Korrelationen zwischen erhöhten uPA- und uPAR-Konzentrationen im Tumor und dem Tumorgrad G und dem Metastasenstatus konnten auch von anderen Arbeitsgruppen dokumentiert werden (Swiercz et al. 1998, Ohba et al. 2005, Bhuvaramurthy et al. 2005). Die hohen endogenen Konzentrationen an uPA in normalem Nierengewebe, könnten die Veränderungen an uPA im Tumor maskieren. Für eine signifikante Korrelation von erhöhtem uPA im Tumor und dem Überleben ist eine Reevaluierung eines größeren Patientenkollektivs notwendig, um eindeutige Aussagen treffen zu können. Die Hochregulierung von uPAR in NZK-Zellen kann als Interaktionsfaktor zwischen den neoplastischen Zellen und ihrem umgebenden Gewebe dienen. Dieser Prozess führt zu einer Initiierung lokalen proteolytischen Abbaus extrazellulärer Matrix und wird als essentiell für Tumorverbreitung und tumorassoziierter Angiogenese angesehen (Liotta et al. 1991). Unsere Ergebnisse weisen darauf hin, dass erhöhte uPAR-Werte möglicherweise zu Tumorzellinvasion und Endothelzellmigration beitragen.

Für die NZK wurde auch die Proteinexpression des Apoptoseinhibitors Survivin untersucht. Literaturdaten zeigen, dass Tumorzellen zu einem fetalen Muster der Survivinexpression zurückkehren, um die Zellebensfähigkeit zu erhöhen und möglicherweise auch um zytotoxische Effekte von Chemotherapeutika zu überstehen (Mahotka et al. 1999). Eine Überexpression von Survivin in den untersuchten Tumoren ergab für unsere Studien keine

Korrelationen zum Überleben oder anderen Parametern wie Tumorgröße oder Tumorgrad. Survivin konnte sowohl im Tumorgewebe, als auch im Normalgewebe nachgewiesen werden. Mehrere Studien berichten davon, dass Survivin in proliferierenden Zellen (z.B. Tumorzellen) im Zellkern nachgewiesen wurde, während es bei normalem Gewebe im Zytoplasma nachweisbar war (Okada et al. 2001, Grabowski et al. 2003). Diese Ergebnisse zeigen, dass es wahrscheinlich entscheidend ist, wo in der Zelle Survivin exprimiert wird. Byun und Mitarbeiter (2007) zeigten eine signifikante Assoziation der Überexpression von Survivin in NZK mit dem Tumorstadium, dem Tumorgrad und einem kürzeren Rezidivfreien Überleben. Die Expression von Survivin im Zellkern korrelierte mit einer günstigeren Prognose bei Patienten mit Ösophaguskarzinomen (Grabowski et al. 2003). Okada und Kollegen (2001) fanden dies bei Darmkrebs und ähnliche Daten erzielten Kennedy et al. (2003) bei Brusttumoren. Bei MMK wurde auch gezeigt, dass Survivin ein unabhängiger Prognosefaktor für ein kürzeres Überleben ist (Hinnis et al. 2007). Durch die Isolierung des Gesamtproteins konnten wir in der vorliegenden Studie nicht feststellen, ob es sich um zytoplasmatisches Survivin oder um Survivin aus dem Zellkern handelt. Weiterhin sind vier Splice-Varianten von Survivin bekannt (Survivin-2B, Survivin-ΔEx3, Survivin 2α und Survivin-3B), welche verschiedene Rollen, unter anderem auch in NZK und MMK, in der Progression und dem klinischen Verhalten von Tumoren einnehmen können (Mahotka et al. 1999 und 2002, Badran et al. 2004, Caldas et al. 2005). Studien in unserer Arbeitsgruppe an Weichteilsarkomen zeigten eine Korrelation zwischen einer Survivin-Überexpression und einem schlechteren Überleben dieser Patienten. Es konnte sowohl auf mRNA-Ebene als auch auf Proteinebene nachgewiesen werden (Kappler et al. 2001, 2003). Eine Korrelation zwischen dem Tumorgrad und bestimmten Splice-Varianten wurde ebenfalls beobachtet (Taubert et al. 2005). In multivariaten Cox-Regressions-Analysen war das Risiko eines Tumorbedingten Todes 7,3-fach erhöht für Patienten mit einer Überexpression der Survivin-ΔEx3 Splice-Variante. Das Wildtyp-Survivin und die Splice-Variante Survivin-2B wiesen ebenfalls ein signifikant erhöhtes Risiko auf (2,2- und 1,9-fach).

5.4.2. Das „Cancer Antigen“ (CA 15-3) beim Mammakarzinom

Tumorzellen können Abweichungen in ihrem Stoffwechsel sowie im Enzymmuster aufweisen. Im Zuge der Entdifferenzierung werden einige Proteine gebildet, die für den erwachsenen Organismus untypisch sind. Sie geben, wenn sie in die Blutbahn abgegeben werden, einen diagnostischen Hinweis auf das Vorliegen eines Tumors. Studien haben gezeigt, dass die Expression verschiedener Proteine in malignen Tumoren verändert sind (Mathelin et al. 2006). Dies kann zu messbaren Änderungen in der Sezernierung von Markerproteinen in Körperflüssigkeiten führen. Von den verfügbaren Serummarkern wird die Bestimmung des „Cancer Antigen“ CA 15-3 neben dem CEA (carcino-embryonales Antigen) am häufigsten durchgeführt. Es ist ein Mucin Glykoprotein-Produkt des *MUC-1* Gens. Im Rahmen der Diagnosesicherung wurden von 39 Patientinnen die Konzentration des „Cancer

Antigen“ CA 15-3 im Serum bestimmt. In der vorliegenden Arbeit korrelierte das Auftreten Bl⁺-Zellen mit einer erhöhten Konzentration an CA 15-3 im Serum ($P=0,049$). In den Überlebensanalysen wurde eine schlechtere Prognose für Patientinnen mit hoher CA 15-3-Konzentration nachgewiesen. Die 4-Jahresüberlebensrate betrug für Patientinnen mit einem hohen CA 15-3 Wert 68,6% und für Patientinnen mit einem normalen CA 15-3 Wert 95,4%. Diese Daten der Kaplan-Meier-Analyse waren signifikant ($P = 0,034$; $n = 39$). Die schlechtere Prognose für Patientinnen mit hohen CA 15-3 Konzentrationen vor der Entfernung des Primärtumors konnte auch in der Cox-Regression bestätigt werden. In univariaten Analysen hatten Patientinnen mit den erhöhten Proteinkonzentrationen ein 15,9fach erhöhtes Risiko an ihrem Tumor zu versterben. Die Verbindung zwischen dem Auftreten von Bl⁺-Zellen und einer erhöhten CA 15-3-Expression wurde bisher in der Literatur nicht beschrieben. Es bleibt noch zu klären, inwieweit undifferenzierte große blaue Zellen im Tumor zur Erhöhung des CA 15-3-Spiegels beitragen können, und welche Rolle sie bei der Tumorzell dissemination spielen. Eine ungünstige Prognose für Patienten mit einer erhöhten präoperativen Expression an CA 15-3 wiesen auch Molina et al. (2005) nach. In weiteren Arbeiten wurde eine Korrelation zwischen der vermehrten Expression von CA 15-3 und fortgeschrittenen Tumoren der Brust gefunden (Mathelin et al. 2006, Sliwowska et al. 2006, Vrdoljak et al. 2006). Vrdoljak und Kollegen (2006) beschrieben eine höhere Expression an CA 15-3 im Serum bei MMK-Patientinnen (27,3%), die interpektorale LKM aufwiesen gegenüber Patientinnen ohne Befall der Lymphknoten (9,0%). Mathelin et al. (2006) stellten einen Zusammenhang zwischen dem Auftreten regionärer LKM, Metastasen und einer erhöhten CA 15-3-Expression fest. Je weiter fortgeschritten eine Tumorerkrankung ist, umso häufiger treten demnach erhöhte Serumwerte für CA 15-3 auf. Eine Korrelation mit einem Lymphknotenbefall oder Fernmetastasen konnten wir in unseren Analysen nicht belegen. In mehreren Studien wurden die Serumkonzentrationen an CA 15-3 während verschiedener Chemotherapien bestimmt (Bartsch et al. 2006, Tampellini et al. 2006, Al-azawi et al. 2006). Bartsch und Kollegen zeigten, dass Patienten mit einem Tumorprogress während der Chemotherapie erhöhte CA 15-3-Serumwerte aufwiesen. Dies war jedoch auch bei einigen Patienten der Fall, deren Erkrankung sich während der Therapie stabilisierte. Das zeigt, dass eine CA 15-3-Erhöhung nicht immer mit einer schlechteren Prognose verbunden ist, was ebenfalls in Untersuchungen von Tampellini und Kollegen (2006) und Al-azawi et al. (2006) gezeigt wurde.

5.5. HLA-Typisierung

Eine allgemeine Verringerung in der Expression von HLA-Antigenen ist charakteristisch für die Tumorprogression. Meist ist die HLA Klasse I – Expression auf Metastasen reduziert (Jager et al. 2002). Tumorzellen, die ihre HLA Klasse I – Antigene verlieren, werden seltener durch spezifische T-Zellen lysiert. Sie werden aber möglicherweise durch den Antigen-Verlust gegenüber natürlichen Killerzellen sensitiviert. Der Verlust der HLA Klasse I –

Antigene kann in verschiedenen Stufen auftreten, z.B. ein totaler Verlust aller Klasse I – Antigene, der Verlust der Expression von einem Locus oder eines Haplotyps, oder eines spezifischen Allels (Jager et al. 2002). Im Rahmen der vorliegenden Promotionsarbeit wurden von 91 NZK-Patienten der HLA-Typ bestimmt. Diese Charakterisierung wurde im HLA-Labor des Institutes für Medizinische Immunologie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg (Leiter: DM Altermann) vorgenommen. Es ließen sich eindeutige Unterschiede zwischen den Patienten und den Kontrollen feststellen. Die HLA-Merkmale HLA-B*27 (15,4% vs. 6,9%), HLA-Cw12 (10% vs. 4,4%), DRB1*06 (44% vs. 31,5%) und DQB1*01 (92,3% vs. 79,7%) waren bei den NZK-Patienten deutlich häufiger vertreten im Vergleich zu der Kontrollgruppe. Dagegen waren die Merkmale HLA-Cw*07 (50% vs. 66,8%) und DRB1*04 (17,6% vs. 30%) signifikant seltener bei den NZK-Patienten zu finden. Personen mit dem HLA-Merkmal HLA-Cw*07 erkrankten demnach seltener an NZK (RR = 0,7). Das Auftreten des HLA-Merkmals HLA-Cw*07 ist bei Autoimmunerkrankungen bekannt. Es könnte einen gewissen Schutz gegenüber der Entstehung von malignen Tumoren bewirken, da es zu überschießenden Immunreaktionen im Körper kommt, die auch maligne Tumorzellen schon frühzeitig beseitigen könnten. Eine vergleichbare immunologische Ursache könnte für das Merkmal HLA-DRB1*04 vorliegen. Das relative Risiko für Personen mit diesem HLA-Merkmal an NZK zu erkranken beträgt 0,5. HLA-DRB1*04 ist als ein typisches HLA-Merkmal bei rheumatischen Erkrankungen bekannt. Diese führen im Körper zu verstärkten Immunreaktionen, die ebenfalls einen gewissen Schutz gegenüber einer Tumorentstehung bieten könnten. Die HLA-Merkmale, die bei den NZK-Patienten häufiger auftraten, waren nicht signifikant erhöht. Das Risiko war jedoch deutlich höher. Kojima et al. (2000) konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen dem Auftreten der Merkmale HLA-DRB3, DRB4 oder DRB5 bei NZK-Patienten oder Kontrollpersonen feststellen. Diese Daten korrelieren mit den Daten der vorliegenden Studie. Auch wir konnten keine signifikanten Unterschiede in diesen HLA-Merkmalen nachweisen. Kojima und Kollegen (2000) beobachteten weiterhin ein signifikant häufigeres Auftreten der Allele HLA-DRB1*03 und DRB1*12 bei den Patienten mit NZK. Hillig (2001) wies ein häufigeres Auftreten der Merkmale HLA-DRB1*01 und HLA-DQB1*01 nach. Diese Daten zeigen, dass bei der HLA-Typisierung von NZK mehrere Merkmale als signifikant erhöht gefunden wurden. Eine Erklärungsmöglichkeit ist, dass die HLA-Merkmale auf den verschiedenen Kontinenten bzw. Ländern auch verschieden verteilt sind. Eine Rolle spielt auch, welche Personen als Kontrollgruppe verwendet werden. Diese haben möglicherweise Entzündungen oder andere Erkrankungen wie Diabetes, Rheuma oder Stoffwechselerkrankungen bzw. benigne Erkrankungen der Niere. In unserer Studie wurden Blutspender als Kontrollen verwendet. Das heißt, sie haben keine akuten Erkrankungen. Jedoch ist nicht auszuschließen, dass sie Tumorerkrankungen entwickeln werden oder ruhende Erkrankungen in sich tragen.

In der vorliegenden Studie korrelierte kein spezifischer HLA-Phänotyp im Blut mit einer Fernmetastasierung. Hillig (2001) beobachtete eine seltenerer Fernmetastasierung beim NZK, wenn das HLA-Merkmal DRB1*01 vorlag. Demgegenüber zeigte sich in seiner Studie

eine häufigere Metastasierung, wenn das Merkmal HLA-DQB1*05 vorhanden war. Für das HLA-Merkmal Cw*12 stellte er einen gewissen Schutz für die Patienten gegenüber einer Metastasierung fest. Im Gegensatz dazu wiesen in unserer Studie Patienten mit HLA-Cw*12 ein schlechteres Gesamtüberleben auf. Von neun Patienten mit diesem Allel sind bereits vier (44,4%) verstorben. Weiterhin war in der vorliegenden Arbeit das HLA-Cw*04 Merkmal mit einer besseren Prognose verbunden. Von 34 Patienten mit diesem Allel sind bisher nur zwei (5,9%) verstorben. Im Gegensatz hierzu, wies Hillig (2001) in seiner Arbeit eine häufigere Metastasierung bei Patienten auf, die dieses Merkmal aufwiesen.

Bei der Untersuchung von Melanomen wird sehr häufig auch der HLA-Typ bestimmt. So waren Melanome der Aderhaut bei Patienten mit dem Merkmal HLA-B40 mit einer schlechten Prognose assoziiert (Jager et al. 1992). Mitchell und Kollegen (1992) fanden eine Assoziation zwischen dem Auftreten der HLA-Merkmale A*02, B*12 und C*03 und einer klinischen Remission. Mendez et al. (2001) charakterisierten die HLA Klasse I – Alterationen in fünf Metastasen von zwei Patienten mit Melanomen. Beide Patienten wiesen Verluste im HLA-Muster auf. Die Verluste einzelner Antigene waren für alle Metastasen des jeweiligen Patienten identisch. Diese Tatsachen unterstützen die Hypothese, dass multiple Metastasen, die vom gleichen Ursprung abstammen auch identische Veränderungen im HLA Klasse I – Phänotyp besitzen. Die HLA-Charakterisierung von Pankreaskarzinompatienten ergab ein signifikant höheres Auftreten der HLA-Merkmale A*30, A*31, B*18 und Cw*07 (Kouerinis et al. 2004). Das Allel Cw*07 war in unserer Studie dagegen seltener bei den Patienten mit NZK vertreten. Eine Studie von De Petris et al. (2004) berichtet von der Überrepräsentation des HLA-A*02 – Phänotyps bei Ovarial- und PCA-Patienten. Diese Ergebnisse sind in Übereinstimmung mit den Befunden der vorliegenden Arbeit. In unserer Studie konnten wir ein schlechteres Überleben der Patienten feststellen, wenn sie das Merkmal A*02 oder A*24 aufwiesen. Von den 13 Verstorbenen wiesen zehn HLA-A*02 oder HLA-A*24 auf (77%). Eine Publikation zum Thyroidkarzinom referiert über eine beobachtete geringere Frequenz des HLA-Cw7 Allels und der Entwicklung von Thyroidkarzinomen (Rios et al. 2004). Dementsprechend konnten in den Kontrollen häufiger das HLA-Cw*07-Allel im Vergleich zu den Patienten gefunden werden. Diese Beobachtung haben wir ebenfalls gemacht.

Ziel der Auswertung des HLA-Typs war auch die Häufigkeiten für das Auftreten von HLA-Merkmalen mit denen für die Disseminierung von Tumorzellen bei NZK zu untersuchen. In unserer Studie konnten wir keine Korrelation zwischen dem Auftreten von DTZ im Blut und bestimmten HLA-Merkmalen feststellen. Zia und Kollegen (2001) untersuchten in einer Studie an MMK-Patienten das Auftreten von DTZ im Knochenmark. Die Tumore der Patienten waren alle im Gesunden (R0) entfernt, und sie wiesen keine nachweisbaren Fernmetastasen (M0) auf. Bei 53,3% (16/30) der Patienten wiesen die DTZ HLA Klasse I – Antigene auf der Zelloberfläche auf. Bei 26,7% (8/30) fehlten die Antigene ganz und bei 20% (6/30) war ein teilweiser Verlust der HLA Klasse I – Antigene auf der Oberfläche der DTZ zu beobachten. Die DTZ ohne HLA Klasse I – Antigenen oder nur wenigen stammten fast

ausschließlich von schlecht differenzierten Karzinomen (G3). Ähnliche Ergebnisse publizierten auch Andratschke und Kollegen (2003) für Kopf- und Halstumore. Der Verlust von HLA Klasse I – Antigenen auf den DTZ aus dem Knochenmark der Patienten korrelierte mit dem Grad der Tumordifferenzierung. Dieser Phänotyp war weiterhin mit einem kürzeren Überleben der Patienten assoziiert. Gudmundsdottir und Kollegen (2000) klassifizierten die HLA Klasse I – Expression auf den primären Tumoren von MMK-Patienten. Sie fanden einen Großteil der Tumore HLA Klasse I negativ, viele zum Teil positiv und die wenigsten Tumore waren HLA Klasse I positiv. Zu den üblichen klinischen Parametern, wie Tumorgröße, LKM, Tumorgrad und dem Hormonrezeptorstatus wies die HLA-Typisierung keine Korrelationen auf. Aber Patienten mit gemischten Tumoren (teilweiser Verlust der HLA Klasse I – Antigene) hatten eine signifikant höhere Wahrscheinlichkeit einer Wiederkehr der Erkrankung (Gudmundsdottir et al. 2000). Ryu et al. (2001) verglichen die HLA-Expressionsmuster der primären Tumore von Zervixkarzinompatienten mit den Metastasen. Sie wiesen dabei eine signifikant geringere Expression von HLA Klasse I und Klasse II – Antigenen in den Metastasen nach. Diese Daten zeigen, dass Veränderungen der HLA Klasse I und Klasse II – Expression scheinbar ein Teilschritt in der Progression von Zervixkarzinomen ist.

Insgesamt lässt sich sagen, dass die HLA-Charakterisierung in Hinblick auf bestimmte HLA-Typen, die zu einer Tumorerkrankung führen, sehr komplex ist. Publierte Daten sind oft sehr gegensätzlich in ihren Aussagen. Wahrscheinlich muss die Gruppenauswahl für diese statistischen Studien sehr eng gefasst werden. Die Gruppen sollten möglichst viele Patienten umfassen, die ähnliche Stadien, Tumorgrößen und Tumorgrade umfassen. Nur so sind eindeutige Aussagen möglich, inwieweit ein bestimmter HLA-Typ eher zu einer spezifischen Tumorerkrankung führt bzw. diese begünstigt als andere HLA-Typen.

5.6. Ausblick

In weiteren Arbeiten sollten weitere molekulare Untersuchungen von DTZ folgen, da diese in der vorliegenden Arbeit nur exemplarisch möglich waren. In dieser Arbeit wurden zunächst prä- und postoperative Proben auf das Vorhandensein von DTZ untersucht. Dies sollte fortgesetzt werden, da wir zu wenige postoperative Blutproben zur Verfügung hatten. Weiterhin stellt sich die Frage, ob der Nachweis von DTZ im Blut zum Therapiemonitoring geeignet ist. Hierfür sollten vor, während und im Anschluss an verschiedene Therapien das Blut der Patienten auf das Vorhandensein von DTZ kontrolliert werden. Die Charakterisierung und der Nachweis von DTZ könnte zur Unterstützung von Therapieentscheidungen herangezogen werden. Ebenso ist eine gezielte Überwachung bestimmter Patientengruppen mit CK+ Zellen möglicherweise für die Prognose der Patienten entscheidend. Aktuelle Forschungen beschäftigen sich auch mit der Frage, ob unter den Tumorzellen Tumorstammzellen sind, welche eine besondere Bedeutung für die Tumorgenese und das Therapieansprechen hätten. Hinsichtlich dieser Fragestellung sollten

auch DTZ untersucht werden. Interessant wäre, ob DTZ Stammzellmarker tragen, wie z.B. CD133 oder CD 44?

In Studien, die über diese Arbeit hinausgehen, könnte die klinische Bedeutung des SNP309-Polymorphismus weiter untersucht werden. Bei den MMK traten in unserer Studie Unterschiede zu den publizierten Daten auf. Patienten mit dem T/T-Wildtyp erkrankten in unserer untersuchten Patientengruppe früher als Patienten mit dem G/G-Polymorphismus. Lässt sich das in einer größeren Patientengruppe bestätigen? Bei den untersuchten NZK konnte für die männlichen Patienten eine Korrelation zwischen dem Auftreten des T/G-Polymorphismus und einem ca. zehn Jahre früheren Erkranken an einem NZK nachgewiesen werden.

Ferner sollten die Methylierungsuntersuchungen zur Beantwortung der folgenden Fragen fortgeführt werden. Sind die häufigen RASSF1A-Methylierungen im Tumor und im Normalgewebe durch Alterungsprozesse bedingt? Welchen Zusammenhang gibt es zwischen dem Auftreten von CK⁺-Zellen und einer rar- β -Methylierung im Tumor bei den MMK-Patienten?

MSI- und LOH-Analysen an DTZ sind ebenfalls noch weiter zuführen. In der vorliegenden Arbeit wurden sie nur exemplarisch an wenigen Zellen durchgeführt. Jedoch konnten wir bereits sehr viele genetische Veränderungen in diesen Tumorzellen nachweisen. Wichtig ist es jetzt, Patienten über viele Jahre zu kontrollieren. Treten nach Jahren Metastasen auf, so können diese mit den DTZ aus vorangegangenen Proben hinsichtlich genetischer Veränderungen verglichen werden. Von Interesse ist, ob die Metastasen die gleichen Veränderungen, wie die DTZ aus dem Blut aufweisen?

Einen weiteren Ansatzpunkt für fortführende Studien bietet auch die HLA-Typisierung. Können über eine HLA-Typisierung Risikogruppen für die Entstehung von Tumoren bestimmt werden? Erste Ergebnisse unserer Arbeit für NZK weisen auf einige HLA-Merkmale hin, die bei NZK-Patienten häufiger auftreten. Weiterhin konnten wir eine schlechtere Überlebensprognose für NZK-Patienten mit bestimmten HLA-Merkmalen in der vorliegenden Arbeit finden. Dies sind Befunde, die in weiteren Studien mit einem größeren Patientenkollektiv bestätigt werden sollten. Zum anderen könnte die Bestimmung des HLA-Typs bei anderen Tumorpatienten (z.B. MMK) zur Charakterisierung bestimmter Risikogruppen führen.

Zusammenfassend lässt sich einschätzen, dass durch eine weitere prospektive molekulare Charakterisierung von DTZ unter Einbeziehung der klinischen Daten ein Zugewinn für prognostische Aussagen und über das Therapiemonitoring für das Therapieansprechen für verschiedene Tumorarten zu erwarten ist.

6. Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit umfasste die Untersuchung von drei Tumorarten – das Nierenzellkarzinom (NZK), das Mammakarzinom (MMK) und das Prostatakarzinom (PCA). Aus Blutproben der Karzinompatienten wurden disseminierte DTZ magnetisch angereichert und durch immunhistochemische Nachweisreaktionen (Zytokeratin 8/18) detektiert. Insgesamt sind die Blutproben von 173 MMK-, 154 NZK- und 175 PCA-Patienten auf das Vorhandensein von DTZ untersucht worden. Dabei wurden bei 83/173 (48%) der MMK-Patientinnen, bei 81/154 (52,6%) der NZK-Patienten und bei 92/175 (52,6%) der PCA-Patienten DTZ im Blut nachgewiesen. Die Nachweisraten sind für alle drei Tumortypen mit ca. 50% vergleichbar. Bei der Auswertung der Zytospinpräparate wurden neben den Zytokeratin-positiven Zellen (CK+) auch große blaue Zytokeratin-negative Zellen (BI+) beobachtet. Aufgrund ihrer Morphologie wurden sie als Tumorzellen charakterisiert und mit in die Beurteilung einbezogen. Werden nur eindeutig CK+-Zellen betrachtet, so konnten bei 20/173 (11,6%) der MMK-Patienten, bei 22/154 (14,2%) der NZK-Patienten und bei 20/175 (11,4%) der PCA-Patienten CK+-Zellen im Blut detektiert werden. Das Auftreten von CK+- oder BI+-Zellen bzw. das Vorhandensein beider Zelltypen gleichzeitig korrelierte sowohl bei den MMK als auch bei den NZK signifikant mit dem Metastasenstatus ($P = 0,025$; $P = 0,014$). Patienten mit Metastasen weisen somit erwartungsgemäß häufiger Tumorzellen in ihrem Blut auf. Für die MMK-Patienten konnte weiterhin eine signifikante Korrelation zwischen dem Auftreten von Tumorzellen (CK+ und BI+) im Blut und dem Tumorgrad nachgewiesen werden ($P = 0,050$). Patienten mit wenig differenzierten Tumoren hatten häufiger Tumorzellen in der Blutbahn zirkulieren im Vergleich zu Patienten mit gut differenzierten Tumoren. Die NZK zeigten weiterhin eine Korrelation zwischen dem Vorhandensein von Tumorzellen (CK+ und BI+) und dem Lymphknotenstatus ($P < 0,001$). Bei den PCA-Patienten wurde lediglich eine Korrelation zwischen dem Auftreten von CK+-Zellen und der Tumorgröße gefunden ($P = 0,002$).

Der Nachweis von CK+-Zellen erwies sich als prognostischer Faktor für das Überleben sowohl der MMK-Patienten als auch der NZK-Patienten (Kaplan-Meier-Analysen ($P = 0,024$ nach OP; $P = 0,033$ vor OP) und Cox-Regressions-Analysen ($P = 0,042$ nach OP; $P = 0,042$ vor OP)). Besonders beim Auftreten von CK+-Zellen nach der Entfernung des Primärtumors war das Risiko für die Patienten an der Tumorerkrankung zu versterben, signifikant erhöht. Bei den NZK-Patienten war der Nachweis von CK+-Zellen nach der Primärtumorentfernung ebenso mit einem kürzeren Überleben assoziiert ($P = 0,036$ in der multivariaten Cox-Regressionsanalyse).

In weiteren Untersuchungen wurden von 17 MMK-Patienten aus dem Tumor und dem autologen Normalgewebe und sechs Metastasen DNA isoliert. Von drei dieser Patientinnen gelang auch die DNA-Isolation aus den DTZ. Bei den NZK-Patienten wurde von 98 Patienten DNA aus dem Tumor- und dem Normalgewebe isoliert. Von neun dieser Patienten gelang exemplarisch die DNA-Isolation aus den DTZ. Die DNA wurde für MSI- und LOH-Untersuchungen eingesetzt. Vor allem Gene auf Chromosom 3p sind häufig in MMK und NZK von chromosomalen Aberrationen betroffen und wurden in der vorliegenden Arbeit exemplarisch untersucht. Es konnte nachgewiesen werden, dass die DNA der untersuchten DTZ andere genetische Veränderungen aufweisen kann als die DNA des Tumorgewebes. Die DTZ haben sich demnach wahrscheinlich sehr früh vom Primärtumor gelöst und entstammen einem anderen Zelltyp als der Großteil der Zellen des Primärtumors. Während der Tumorentwicklung können verschiedene Zelltypen koexistieren. Weiterhin ist die Häufigkeit genetischer Alterationen in den DTZ sehr auffällig.

Die DNA der Tumor- und Normalgewebe sowie der Metastasen wurde weiterhin in Methylierungsanalysen untersucht. Für das RASSF1A-Gen konnte eine sehr hohe Promotormethylierungsrate in den MMK-DNA-Proben und den NZK-DNA-Proben nachgewiesen werden. Dies könnte möglicherweise durch Alterungsprozesse bedingt sein. Eine rar- β -Methylierung in der DNA der untersuchten Tumore korrelierte signifikant mit dem Auftreten von CK⁺-Zellen bei den MMK-Patientinnen. Patientinnen, die im Tumor eine rar- β -Promotormethylierung aufwiesen, hatten in ihrem Blut auch CK⁺-Zellen. Ferner korrelierte die Methylierung der FHIT-Promotorregion in der Tumor-DNA der MMK-Patientinnen mit einem kürzeren Überleben der Patienten. Multivariate Cox-Regressionsanalysen ergaben ein 6,8fach erhöhtes Risiko für die Patienten mit einer FHIT-Promotormethylierung in der DNA des Tumorgewebes, an ihrer Tumorerkrankung zu versterben.

In weiteren Untersuchungen der MMK und NZK wurde die Sequenz des SNP309-Polymorphismus im *mdm2*-Gen bestimmt. In unserer Arbeit erkrankten die MMK-Patientinnen mit dem G/G-Polymorphismus durchschnittlich mit 61 Jahren und die Patientinnen mit dem T/T-Wildtyp mit 53 Jahren. Diese Daten stehen im Widerspruch zu den publizierten Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen. Bei den NZK-Patienten erkrankten Personen mit dem T/T-Wildtyp durchschnittlich erst mit 71 Jahren, während Patienten mit dem T/G-Polymorphismus bereits mit durchschnittlich 63 Jahren erkrankten. Für die männlichen NZK-Patienten konnte eine signifikante Korrelation zwischen dem T/G-Polymorphismus und einem früheren Erkranken an einem NZK nachgewiesen werden ($P = 0,024$).

In weiterführenden Analysen untersuchten wir die Proteinexpression von Komponenten des Matrix-Protease-Systems (uPA, uPAR, PAI-1) und des Inhibitors der Apoptose (Survivin). Für 36 MMK-Patienten und 39 NZK-Patienten. Es wurde jeweils die Expression im Normalgewebe mit der Proteinexpression im Tumorgewebe verglichen. Für das MMK konnten eine signifikante Korrelation zwischen einer Erhöhung der uPA-Konzentration im Tumor und dem Auftreten von BI+-Zellen vor der Primärtumorentfernung nachgewiesen werden ($P = 0,006$). Dies spricht für die Beteiligung von BI+-Zellen an der Progression des Tumors. Bei den NZK konnten für erhöhte uPA- und uPAR-Expressionslevel signifikante Korrelationen zur TumorgroÙe ($P = 0,020$; $P = 0,028$), Metastasenstatus ($P = 0,043$; $P = 0,007$) und dem Tumorgrad ($P = 0,038$; $P = 0,041$) gezeigt werden. Für die uPAR-Expression im Tumor ergab sich zusätzlich eine Korrelation zum Auftreten von BI+-Zellen ($P = 0,051$). Hohe uPAR-Konzentrationen im Tumor waren weiterhin mit einer schlechteren Prognose für die NZK-Patienten assoziiert.

Für die NZK-Patienten wurde zusätzlich eine immunologische Genotypisierung des HLA-Typs vorgenommen (Labor DM Altermann). Das HLA-Merkmal Cw*12 war bei den NZK-Patienten häufiger vertreten als in der Kontrollgruppe. Personen mit diesem HLA-Merkmal haben ein 2,3fach erhöhtes Risiko ein NZK zu entwickeln, gegenüber Personen, die dieses HLA-Merkmal nicht aufweisen. Patienten mit dem Allel HLA-Cw*12 hatten in unserer Studie ein schlechteres Gesamtüberleben. Von neun Patienten mit diesem HLA-Merkmal sind bereits vier verstorben (44,4%). Die HLA-Merkmale Cw*07 und DRB1*04 waren dagegen bei den NZK-Patienten signifikant seltener vorzufinden als in der Kontrollgruppe.

Zusammenfassend lässt sich einschätzen, dass der Nachweis von DTZ im Blut von NZK-, PCA- und MMK-Patienten mit klinischen Parametern, wie der TumorgroÙe, dem Metastasenstatus und dem Tumorgrad assoziiert ist. Für NZK- und MMK-Patienten konnte zusätzlich gezeigt werden, dass die Detektion von DTZ im Blut als prognostischer Faktor angesehen werden kann. Ob sich der DTZ-Nachweis auch für ein Therapiemonitoring eignet, sollte an einem größeren Patientenkollektiv eruiert werden. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die Expressionslevel der Proteine uPA und uPAR in den Tumoren mit klinischen Parametern, wie der TumorgroÙe, dem Metastasenstatus und dem Tumorgrad korrelieren.

7. Literaturverzeichnis

- Al-azawi D, Kelly G, Myers E et al. CA 15-3 is predictive of response and disease recurrence following treatment in locally advanced breast cancer. *BMC Cancer*, **6**, 220 (2006)
- Aldaz CM, Chen T, Sahin A et al. Comparative allelotype of in situ and invasive human breast cancer: high frequency of microsatellite instability in lobular breast carcinomas. *Cancer Res*, **55**, 3976 – 3981 (1995)
- Altieri DC. Targeted therapy by disabling crossroad signaling networks: the survivin paradigm. *Mol Cancer Ther*, **5**, 478 – 482 (2006)
- Ambrosini G, Adida C, Sirugo G, Altieri DC. Induction of apoptosis and inhibition of cell proliferation by survivin gene targeting. *J Biol Chem*, **273**, 11177 – 11182 (1998)
- American Public Health Association. Compendium of methods for the microbiological examination of foods. 3rd ed. Washington, DC. *American Public Health Association* (1992)
- Andratschke M, Pauli C, Stein M et al. MHC-class I antigen expression on micrometastases in bone marrow of patients with head and neck squamous cell cancer. *Anticancer Res*, **23**, 1467 – 1471 (2003)
- Andreasen PA, Nielsen LS, Kristensen P et al. Plasminogen activator inhibitor from human fibrosarcoma cells binds urokinase-type plasminogen activator, but not its proenzyme. *J Biol Chem*, **261**, 7644 (1986)
- Ashida S, Okuda H, Chikazawa M et al. Detection of circulating cancer cells with von hippel-lindau gene mutation in peripheral blood of patients with renal cell carcinoma. *Clin Cancer Res*, **6**, 3817 – 3822 (2000)
- Badran A, Yoshida A, Ishikawa K et al. Identifikation of a novel splice variant of the human anti-apoptosis gene survivin. *Biochem Biophys Res Commun*, **314**, 902 – 907 (2004)
- Bartsch R, Wenzel C, Pluschnig U et al. Prognostic value of monitoring tumour markers CA 15-3 and CEA during fulvestrant treatment. *BMC Cancer*, **6**, 81 – 88 (2006)
- Baylin SB, Herman JG, Graff JR et al. Alterations in DNA methylation: a fundamental aspect of neoplasia. *Adv Cancer Res*, **72**, 141 – 196 (1998)
- Behrendt N, Rønne E, Ploug M et al. The human receptor for urokinase plasminogen activator. *J Biol Chem*, **265**, 6453 – 6460 (1990)
- Behrendt N and Stephens RW. The urokinase receptor. *Fibrinol Proteol*, **12**, 191 – 204 (1998)
- Belinsky SA, Liechty KC, Gentry FD et al. Promotor Hypermethylation of multiple genes in sputum precedes lung cancer incidence in a high-risk cohort. *Cancer Res*, **66**, 3338 – 3344 (2006)
- Benoy ICH, Elst H, Philips M et al. Prognostic significance of disseminated tumor cells as detected by quantitative real-time reverse-transcriptase polymerase chain reaction in patients with breast cancer. *Clin Breast Cancer*, **7**, 146 – 152 (2006)
- Berns EMJJ, Klijn JGM, Putten WLJ et al. C-myc amplification is a better prognostic factor than Her2/neu amplification in primary breast cancer. *Cancer Res*, **52**, 1107 – 1113 (1992)
- Bernues M, Casadevall C, Miro R et al. Analysis of 3p allelic losses in renal cell carcinomas: comparison with cytogenetic results. *Cancer Genet Cytogenet*, **107**, 121 – 124 (1998)
- Bhuvaramurthy V, Schroeder J, Kristiansen G et al. Differential gene expression of urokinase-type plasminogen activator and its receptor in human renal cell carcinoma. *Oncology Reports*, **14**, 777 – 782 (2005)

- Bilkenroth U, Taubert H, Riemann D et al. Detection and enrichment of disseminated renal carcinoma cells from peripheral blood by immunomagnetic cell separation. *Int. J. Cancer*, **92**, 577-582 (2001)
- Blümcke S. Pathologie. Walter de Gruyter-Verlag, Berlin; New York, Seite 200 – 229 (1995)
- Blümcke K, Bilkenroth U, Schmidt U et al. Detection of circulating tumor cells from renal carcinoma patients: Experiences of a two-center study, *Oncol, Rep*, **14**, 895 – 899 (2005)
- Boersma BJ, Howe TM, Goodman JE et al. Association of breast cancer outcome with status of p53 and mdm2 SNP309. *J Natl Cancer Inst.* **98**, 911 – 919 (2006)
- Bond GL and Levine AJ. A single nucleotide polymorphism in the p53 pathway interacts with gender, environmental stresses and tumor genetics to influence cancer in humand. *Oncogene*, **26**, 1317 – 1323 (2007)
- Bond GL, Hu W, Bond EE et al. A single nucleotide polymorphism in the MDM2 Promotor attenuates the p53 tumor suppressor pathway and accelerates tumor formation in humans. *Cell*, **119**, 591 – 602 (2004)
- Bond GL, Hirshfield KM, Kirchhoff T et al. MDM2 SNP309 accelerates tumor formation in a gender-specific and hormone-dependent manner. *Cancer Res*, **66**, 5104 – 5110 (2006)
- Bostwick DG, Eble JN, Murphy GP: Conference summary. Diagnosis and prognosis of renal cell carcinoma. *Cancer*, **80**, 975 – 976 (1997)
- Bougeard G, Baert-Desurmont S, Tournier I et al. Impact of the MDM2 SNP309 and p53 Arg72Pro polymorphism on age of tumour onset in Li-Fraumeni syndrome. *J Med Genet*, **43**, 531 – 533 (2006)
- Braga E, Pugacheva E, Bazov I et al. Comparative allelotyping of the short arm of human chromosome 3 in epithelial tumors of four different types. *FEBS Letters*, **454**, 215 – 219 (1999)
- Braun S, Pantel K, Müller P et al. Cytokeratin-positive cells in the bone marrow and survival of patients with stage I, II, or III breast cancer. *N Engl J Med*, **342**, 525 – 533 (2000)
- Braun S, Schlimok G, Heumos I et al. erbB2 overexpression on occult metastatic cells in bone marrow predicts poor clinical outcome of stage I-III breast cancer patients. *Cancer Research*, **61**, 1890-1895 (2001)
- Braun S, Vogl FD, Naume B et al. International pooled analysis of prognostic significance of bone marrow micrometastasis in patients with stage I, II, or III breast cancer. *N Engl J Med*, **353**, 793 – 802 (2005)
- Buchner A, Riesenberger R, Kotter I et al. Detection and prognostic value of cytoceratin positive tumor cells in bone marrow of patients with renal cell carcinoma. *J Urol*, **170**, 1747 – 1751 (2003)
- Buchner A, Riesenberger R, Kotter I et al. Frequency and prognostic relevance of disseminated tumor cells in bone marrow of patients with metastatic renal cell carcinoma. *Cancer*, **106**, 1514 – 1520 (2006)
- Bueso-Ramos CE, Manshouri T, Haidar MA et al. Abnormal expression of MDM2 in breast carcinomas. *Breast Cancer Res Treat*, **37**, 179 – 188 (1996)
- Byun SS, Yeo WG, Lee SE, and Lee E. Expression of survivin in renal cell carcinomas: association with pathologic features and clinical outcome. *Urology*, **69**, 34 – 37 (2007)
- Caldas D, Jiang Y, Holloway MP et al. Survivin splice variants regulate the balance between proliferation and cell death. *Oncogene*, **24**, 1994 – 2007 (2005)
- Cairns P. Detection of Promotor hypermethylation of tumor suppressor genes in urine from kidney cancer patients. *Ann NY Acad Sci*, **1022**, 40 – 43 (2004)

- Campbell IG, Eccles DM, Choong DYH. No association of the MDM2 SNP309 polymorphism with risk of breast cancer. *Cancer Letters*, **240**, 195 – 197 (2006)
- Chambers AF et al. Critical Steps in hematogenous metastasis: an overview. *Surg. Oncol. Clin. N. Am*, **10**, 243 – 255 (2001)
- Chambers AF, Groom AC and MacDonald IC. Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites. *Nature Reviews Cancer*, **2**, 563 – 572 (2002)
- Chow WH, Devesa SS, Warren JL. Rising incidence of renal cell cancer in the United States. *JAMA*, **281**, 1628 – 1631 (1999)
- Conteggiacomio A, Palmirotta R, De Marchis L et al. Microsatellite instability and pathological aspects of breast cancer. *Int J Cancer*, **22**, 264 – 268 (1995)
- Costantini V, Sidoni A, Devegilia R et al. Combined overexpression of urokinase, urokinase receptor, and plasminogen activator inhibitor-1 is associated with breast cancer progression: an immunohistochemical comparison of normal, benign, and malignant breast tissue. *Cancer*, **77**, 1079 (1996)
- Cremoux P, Extra JM, Denis MG et al. Detection of MUC1-expressing Mammary Carcinoma Cells in the peripheral blood of breast cancer patients by real-time polymerase chain reaction. *Clin Cancer Res*, **6**, 3117 – 3122 (2000)
- Dammann R, Li C, Yoon JH et al. Epigenetic inactivation of a RAS association domain family protein from the lung tumour suppressor locus 3p21.3. *Nature genetics*, **25**, 315 – 319 (2000)
- Dammann R, Yang G, and Pfeifer G. Hypermethylation of the CpG Island of Ras Association Domain Family 1A (RASSF1A), a putative tumor suppressor gene from the 3p21.3 Locus, occurs in a large percentage of human breast cancers. *Cancer Res*, **61**, 3105 – 3109 (2001)
- Dammann R, Schagdarsurengin U, Liu L et al. Frequent RASSF1A Promotor hypermethylation and K-ras mutations in pancreatic carcinoma. *Oncogene*, **22**, 3806 – 3812 (2003)
- De Caceras II, Battagli C, Esteller M et al. Tumor cell-specific BRC1 and RASSF1A Hypermethylation in serum, plasma, and peritoneal fluid from ovarian cancer patients. *Cancer Res*, **64**, 6476 – 6481 (2004)
- Denissenko MF, Pao A, Tang M, Pfeifer GP. Preferential formation of benzo(a)pyrene adducts at lung cancer mutational hot spots in P53. *Science*, **274**, 430 – 434 (1996)
- De Petris L, Bergfeldt K, Hising C et al. Correlation between HLA-A2 gene frequency, latitude, ovarian and prostate cancer mortality rates. *Med Oncol*, **21**, 49 – 52 (2004)
- Dharel N, Kato N, Muroyama R et al. Mdm2 Promotor SNP309 is associated with the risk of hepatocellular carcinoma in patients with chronic hepatitis c. *Clin Cancer Res*, **12**, 4867 – 4871 (2006)
- Diel IJ, Kaufmann M, Costa SD et al. Micrometastatic breast cancer cells in bone marrow at primary surgery: Prognostic value in comparison with nodal status. *J Natl Cancer Inst*, **88**, 1652 – 1658 (1996)
- Dietmaier W, Hartmann A, Wallinger S et al. Detection of circulating tumour cells in patients with breast or ovarian cancer by molecular cytogenetics. *British Journal of Cancer*, **81**, 1165-1173 (1999)
- Dumon KR, Ishii R, Fong LYY et al. FHIT gene therapy prevents tumor development in Fhit-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci*, **98**, 3346 – 3351 (2001)
- Dulaimi E, Hillinck J, Ibanaz de Caceres I et al. Tumor Suppressor Gene Promotor Hypermethylation in Serum of Breast Cancer Patients. *Clinical Cancer Research*, **10**, 6189 – 6193 (2004)
- Ellis V, Wun TC, Behrendt N et al. Inhibition of receptor-bound urokinase by plasminogen activator inhibitors, *J Biol Chem*, **265**, 9904, 1990

- Esteller M, Corn PG, Baylin SB. A gene hypermethylation profile of human cancer. *Cancer Res*, **61**, 3225 – 3229 (2001)
- Evans CP, Elfman F, Parangi S et al. Inhibition of prostate cancer neovascularization and growth by urokinase-plasminogen activator receptor blockade. *Cancer Res*, **57**, 3594 – 3599, 1997
- Fackler MJ, McVeigh M, Evron E et al. DNA methylation of RASSF1A, HIN-1, RAR- β , CYCLIN D2 and TWIST in in situ and invasive lobular breast carcinoma. *Int J Cancer*, **107**, 970 – 975 (2003)
- Fang MZ, Chen D, Sun Y et al. Reversal of hypermethylation and reactivation of p16^{INK4a}, rar β , and MGMT genes by genistein and other isoflavones from soy. *Clin Cancer Res*, **11**, 7033 – 7041 (2005)
- Feil G, Leipoldt M, Nelde HJ et al. Loss of chromosomes in clear cell renal cell carcinoma an in corresponding renal parenchym. *Anticancer Res*, **19**, 1477 – 1482 (1999)
- Fidler IJ. Metastasis: quantitative analysis of distribution and fate of tumor emboli labeled with ¹²⁵I-5-iodo-2'-deoxyuridine. *J. Natl. Cancer Inst.* **45**, 773 – 782 (1970)
- Fogh J and Trempe G. Human tumor cells in vitro. Plenum Press , New York, pp 115 – 159 (1975)
- Foja S, Goldberg M, Schagdarsurengin U et al. Promotor methylation and loss of coding exons of the fragile histidine triad (FHIT) gene in intrahepatic cholangiocarcinomas. *Liver international*, **25**, 1202 – 1208 (2005)
- Fossa SD. Interferon in metastatic renal cell carcinoma. *Sem Oncol*, **27**, 187 – 193 (2000)
- Fournier MV, Da Gloria Costa Carvalho M and Pardee AB. A strategy to identify genes associated with circulating solid tumor cell survival in peripheral blood. *Molecular medicine*, **5**, 313-319 (1999)
- Futreal PA, Barrett JC, Wisemann RW. An alu polymorphism intragenic to the TP53 gene. *Nucleic Acids Res*, **19**, 6977 (1991)
- Gao CL, Maheshwari S, Dean RC et al. Blinded evaluation of reverse transcriptase-polymerase chain reaction prostate-specific antigen peripheral blood assay for molecular staging of prostate cancer. *Urology*, **53**, 714 – 721 (1999)
- Gentile M, Ahnström M, Schön F and Wingren S. Candidate tumour suppressor genes at 11q23 – q24 in breast cancer: evidence of alterations in PIG8, a gene involved in p53-induced apoptosis. *Oncogene*, **20**, 7753 – 7760 (2001)
- Gerber B, Krause A, Muller H et. al. Simultaneous immunohistochemical detection of tumor cells in lymph nodes and bone marrow aspirates in breast cancer and ist correlation with other prognostic factors. *J.Clin. Oncol.* **19**, 960 – 971 (2001)
- Giatromanolaki A, Koukourakis MI, Kakolyris S et al. Assessment of highly angiogenic and disseminated in the peripheral blood disease in breast cancer patients predicts for resistance to adjuvant chemotherapy and early relapse. *Int J Cancer*, **108**, 620 – 627 (2004)
- Gohji K et al. Organ-site dependence fort he production of urokinase-type plasminogen activator and metastasis by human renal cell carcinoma cells. *Am J Pathol*, **151**, 1655 – 1661 (1997)
- Gonzalgo ML, Yegnasubramanian S, Yan G et al. Molecular profiling and classification of sporadic renal cell carcinoma by quantitative methylation analysis. *Clin Cancer Res*, **10**, 7276 – 7283 (2004)
- Gore M. European Union approval of tyrosine kinase receptor inhibitors brings new era in targeted therapy. *Kidney Cancer Journal International*, **1**, 6 – 14 (2007)
- Grabowski P, Kühnel T, Mühr-Wilkenshoff F et al. Prognostic value of nuclear survivin expression in oesophageal squamous cell carcinoma. *British J Cancer*, **88**, 115 – 119 (2003)
- Grady B, Goharderakhshan R, Chang J et al. Frequently deleted loci on chromosome 9 may harbor several tumor suppressor genes in human renal cell carcinoma. *J Urol*, **166**, 1088 – 1092 (2001)

- Grasso YZ, Gupta MK, Levin HS et al. Combined nested RT-PCR assay for prostate-specific membrane antigen in prostate cancer patients: correlation with pathological stage. *Cancer Res*, **58**, 1456 – 1459 (1998)
- Gudas JM, Ngyen H, Klein RC et al. Differential expression of multiple MDM2 messenger RNAs and proteins in normal and tumorigenic breast epithelial cells. *Clin Cancer Res*, **1**, 71 – 80 (1995)
- Gudmundsdottir I, Gunnlaugur j, Sigurdsson H et al. Altered expression of HLA class I antigens in breast cancer: association with prognosis. *Int J Cancer*, **89**, 500 – 505 (2000)
- Guo M, House MG, Hooker C et al. Promotor hypermethylation of resected bronchial margins: a field defect of changes? *Clin Cancer Res*, **10**, 5131 – 5136 (2004)
- Guo J, Xiao B, Jin Z et al. Detection of cytokeratin 20 mRNA in the peripheral blood of patients with colorectal cancer by immunomagnetic bead enrichment and real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, **20**, 1279 – 1284 (2005)
- Hagemann R. Allgemeine Genetik. Fischer Verlag, Jena, pp 107 – 178 (1984)
- Hamano K, Esumi M, Igarashi H et al. Biallelic inactivation of the von Hippel-Lindau tumor suppressor gene in sporadic renal cell carcinoma. *J Urol*, **167**, 713 – 717 (2002)
- Harbeck N, Schmitt M, Kates RE et al. Clinical utility of urokinase-type plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor-1 determination in primary breast cancer tissue for individualized therapy concepts. *Clin Breast Cancer*, **3**, 196 – 200 (2002)
- Harbeck N, Kates RE, Gauger K et al. Urokinase-type plasminogen activator (uPA) and its inhibitor PAI-1: novel tumor-derived factors with a high prognostic and predictive impact in breast cancer. *Thromb Haemost*, **91**, 450 – 456 (2004a)
- Harbeck N, Kates RE, Schmitt M et al. Urokinase-type plasminogen activator and its inhibitor type 1 predict disease outcome and therapy response in primary breast cancer. *Breast Cancer*, **5**, 348 – 352 (2004b)
- Hardingham JE, Kotasek D, Sage RE et al. Detection of circulating tumor cells in colorectal cancer by immunobead-PCR is a sensitive prognostic marker for relapse of disease. *Molecular Medicine*, **1**, 789 – 794 (1995)
- Heiss MM, Simon EH, Beyer BCM et al. Minimal residual disease in gastric cancer: Evidence of an independent prognostic relevance of urokinase receptor expression by disseminated tumor cells in the bone marrow. *Journal of Clinical Oncology*, **20**, 2005 – 2016 (2002)
- Hemminki K, Jiang Y, Ma X et al. Molecular epidemiology of VHL gene mutations in renal cell carcinoma patients: relation to dietary and other factors. *Carcinogenesis*, **23**, 809 – 815 (2002)
- Herman JG, Graff J, Myöhänen S et al. Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands. *Proc Natl Acad Sci*, **93**, 9821 – 9826 (1996)
- Hermanek P, Schrott KM: Evaluation of the new tumor, nodes and metastases classification of renal cell carcinoma. *J Urol*, **144**, 238 – 242 (1990)
- Hildebrandt M, Mapara MY, Korner U et al. Reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR)-controlled immunomagnetic purging of breast cancer cells using the magnetic cell separation (MACS) system: a sensitive method for monitoring purging efficiency. *Exp Hematol*, **25**, 57 – 65 (1997)
- Hillig JF, Untersuchungen zur Assoziation und dem klinischen Verlauf des NZKs mit Merkmalen des Haupthistokompatibilitätskomplexes des Menschen. Promotion an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Medizinische Fakultät (2001)
- Hinnis AR, Lockett JCA and Walker RA. Survivin is an independent predictor of short-term survival in poor prognostic breast cancer patients. *Brit J Cancer*, **96**, 639 – 645 (2007)

- Hioki T, Sugimura Y. Detection of circulating cancer cells by nested reverse transcriptase polymerase chain reaction of cytokeratin 19 in patients with renal cell carcinoma. (Abstract) *Acta Urol Jpn*, **45**, 577 – 581 (1999)
- Hofmann R, Lehmer A, Hartung R et al. Prognostic value of urokinase plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor-1 in renal cell cancer. *J Urol*, **155**, 858 – 862 (1996)
- Holmgren L, O'Reilly MS and Folkman J. Dormancy of micrometastases balanced proliferation and apoptosis in the presence of angiogenesis suppression. *Nature Med*, **1**, 149 – 153 (1995)
- Hollstein M, Sidransky D, Vogelstein B, Harris CC. *p53* mutation in human cancers. *Science*, **253**, 49 – 53 (1991)
- Hoon DS, Sarantoo T, Doi F et al. Detection of metastatic breast cancer by beta-hCG polymerase chain reaction. *Int J Cancer*, **69**, 369 – 374 (1996)
- Huang THM, Perry MR, Laux DE. Methylation profiling of CpG islands in human breast cancer cells. *Hum Mol Genet*, **8**, 459 – 470 (1999)
- Huang Y, Boynton RF, Blount PL, Silverstein RJ, Yin J, Tong Y, McDaniel TK, Newkirk C, Resau JH, Sridhara R. Loss of heterozygosity involves multiple tumor suppressor genes in human esophageal cancers. *Cancer Res*, **52**, 6525 – 6530 (1992)
- Hu XC, Wang Y, Shi DR et al. Immunomagnetic tumor cell enrichment is promising in detecting circulating breast cancer cells. *Oncology*, **64**, 160 – 165 (2003)
- Hussein MR and Wood GS. Microsatellite instability and its relevance to cutaneous tumorigenesis. *J Cutan Pathol*, **29**, 257 – 267 (2002)
- Ilanes L, Paez A, Ferruelo M, et al. Detecting circulating prostate cells in patients with clinically localized prostate cancer: clinical implications for molecular staging. *BJU Int*, **86**, 1023 – 1027 (2000)
- Israeli RS, Wilson HM, Miller Jr et al. Sensitive nested reverse transcription polymerase chain reaction detection of circulating prostatic tumor cells: comparison of prostate-specific membrane antigen and prostate-specific antigen-based assays. *Cancer Res*. **54**, 6306 – 6310 (1994)
- Jager MJ, Volker-Dieben HJ, de Wolff-Rouendaal D et al. Possible relation between HLA and ABO type and prognosis of uveal melanoma. *Doc Ophthalmol*, **82**, 43 – 47 (1992)
- Jager MJ, Hurks HMH, Levitskaya J, and Kiessling R. HLA expression in uveal melanoma: there is no rule without some exception. *Human Immunology*, **63**, 444 – 451 (2002)
- Johnson L, Greenbaum D, Cichowski K et al. *K-ras* is an essential gene in the mouse with partial functional overlap with *N-ras*. *Genes Dev*, **11**, 2478 – 2481 (1997)
- Junker K, Thrum K, Schlichter A et al. Clonal origin of multifocal renal cell carcinomas as determined by microsatellite analysis. *J Urol*, **168**, 2632 – 2636 (2002)
- Junker K, Weirich G, Amin MB et al. Genetic subtyping of renal cell carcinoma by comparative genomic hybridization. *Recent Results Cancer Res*, **162**, 169 – 175 (2003)
- Kalthoff H, Schmiegel W, Roeder C et al. *p53* and K-RAS alterations in pancreatic epithelial cell lesions. *Oncogene*, **8**, 289 – 298 (1993)
- Kappler M, Köhler T, Kampf C et al. Increases survivin transcript levels: an independent negative predictor of survival in soft tissue sarcoma patients. *Int J Cancer*, **95**, 360 – 363 (2001)
- Kappler M, Kotzsch M, Bartel F et al. Elevated expression level of survivin protein in soft-tissue sarcomas is a strong independent predictor of survival. *Clin Cancer Res*. **9**, 1098 – 1104 (2003)

- Kataoka A, Masuda T, Ohno S et al. Detection of circulating tumor cells in peripheral blood and bone marrow by quantitative RT-PCR assay for cytokeratin-7 mRNA in breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat*, **94**, 1020 – 1025 (2005)
- Katz AE, Olsson CA, Raffo AJ et al. Molecular staging of prostate cancer with the use of an enhanced reverse transcriptase-PCR assay. *Urology*, **43**, 765 – 775 (1994)
- Karrison TG, Ferguson DJ, Meier P. Dormancy of mammary carcinoma after mastectomy. *J Nat Cancer Institute*, **91**, 80 – 85 (1999)
- Kawakami T, Okamoto K, Ogawa O and Okada Y. Multipoint methylation and expression analysis of tumor suppressor genes in human renal cancer cells. *Urology*, **61**, 226 – 230 (2003)
- Kazazian HH Jr. Mobile elements: drivers of genome evolution. *Science*, **303**, 1626 – 1632 (2004)
- Kennedy SM, O'Driscoll L, Purcell R et al. Prognostic importance of survivin in breast cancer. *British J Cancer*, **88**, 1077 – 1083 (2003)
- Kelsey JL, Gammon MD, John EM: Reproductive factors and breast cancer. *Epidermiol Rev*, **15**, 36 – 47 (1993)
- Kimura M, Abe T, Sunamura M et al. Detailed deletion mapping on chromosome arm 12q in human pancreatic adenocarcinoma: identification of a I-cM region of common allelic loss. *Genes Chromosomes Cancer*, **17**, 88 – 93 (1996)
- Kinyamu HK, Archer TK. Estrogen receptor-dependent proteasomal degradation of the glucocorticoid receptor is coupled to an increase in mdm2 protein expression. *Mol Cell Biol*, **23**, 5867 – 5881 (2003)
- Kish JA, Wolf M, Crawford ED. Evaluation of low dose continuous infusion 5-fluorouracil in patients with advanced and recurrent renal cell carcinoma. A Southwest oncology group study. *Cancer*, **74**, 916 – 919 (1994)
- Klein CA, Schmidt-Kittler O, Schradl JA et al. Comparative genomic hybridization, loss of heterozygosity, and DNA sequence analysis of single cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**, 4494 – 4499 (1999)
- Klein CA, The biology and analysis of single disseminated tumour cells. *Trends in CELL BIOLOGY*, **10**, 489-493 (2000)
- Klein CA, Blankenstein TJF, Schmidt-Kittler O et al. Genetic heterogeneity of single disseminated tumour cells in minimal residual cancer. *Lancet*, **360**, 683 – 689 (2002)
- Knudson AG Jr. Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proc Natl Acad Sci USA*, **68**, 820 – 823 (1971)
- Knudson AG. Two genetic hits (more or less) to cancer. *Nat Rev Cancer*, **1**, 157 – 162 (2001)
- Kojima Y, Takahara S, Nonomura N et al. HLA-DRB genotypes in Japanese patients with renal cell carcinoma. *Oncology*, **59**, 57 – 62 (2000)
- Kok K, Draaijers TG, Mosselaar A et al. Inclusion of new microsatellite repeats in allelic loss analysis excludes retention of heterozygosity in the renal cell carcinoma critical region in 3p21. *Cancer Genet Cytogenet*, **116**, 40 – 43 (2000)
- Konishi N, Shimada K, Ishida E and Nakamura M. Molecular pathology of prostate cancer. *Pathology International*, **55**, 531 – 539 (2005)
- Kotzsch M, Farthmann J, Meye A et al. Prognostic relevance of uPAR-del4/5 and TIMP-3 mRNA expression levels in breast cancer. *Europ J Cancer*, **41**, 2760 – 2768 (2005)
- Krüger W, Tögel F, Rössing S et al. Improvement of breast cancer cell detection by immunomagnetic enrichment. *Cytotherapy*, **1**, 135-139 (1999)

- Kuerinis IA, Zografos G, Tarassi KE et al. Human leukocyte antigens as genetic markers in greek patients with sporadic pancreatic cancer. *Pancreas*, **29**, 41 – 44 (2004)
- Kunkel TA. Biological asymmetries and the fidelity of eukaryotic DNA replication. *Bioassays*, **14**, 303 (1992)
- Kuroki T, Trapasso F, Yendamuri S et al. Allele Loss and Promotor Hypermethylation of VHL, RAR- β , RASSF1A, and FHIT Tumor Suppressor Genes on Chromosome 3p in Esophageal Squamous Cell Carcinoma. *Cancer Research*, **63**, 3724 – 3728 (2003)
- Lain S, Lane D. Improving cancer therapy by nongenotoxic activation of p53. *Eur J Cancer*, **39**, 1053 – 1060 (2003)
- Lambe M, Hsieh C, Trichopoulos D et al. Transient increase in risk of breast cancer after giving birth. *N Engl J Med*, **331**, 5 – 9 (1994)
- Lam JS, Shvarts O, Leppert JT et al. Renal cell carcinoma 2005: New frontiers in staging, prognostication and targeted molecular therapy. *The Journal of Urology*, **173**, 1853 – 1862 (2005)
- Larson JL, Moreno JG, Kenneth JP et al. Apoptosis of circulating tumor cells in prostate cancer patients. *Cytometry Part A*, **62A**, 46 – 53 (2004)
- Larson PS, de las Morenas A, Bennett SR et al. Loss of heterozygosity or allele imbalance in histologically normal breast epithelium is distinct from loss of heterozygosity of allele imbalance in co-existing carcinomas. *Am J Pathol*, **161**, 283 – 290 (2002)
- Lee JL, Soria JC, Hassan K et al. Loss of Fhit expression is a predictor of poor outcome in tongue cancer. *Cancer Res*, **61**, 837 – 841 (2001)
- Lee WH, Morton RA, Epstein JI. Cytidine methylation of regulatory sequences near the pi-class glutathione S-transferase gene accompanies human prostatic carcinogenesis. *Proc Natl Acad Sci*, **91**, 733 – 737 (1994)
- Lehmann U, Länger F, Feist H et al. Quantitative assessment of Promotor hypermethylation during breast cancer development, *Am J Pathol*, **160**, 605 – 612 (2002)
- Levinson G, Gutmann GA. High frequencies of short frameshifts in poly-CA/TG tandem repeats borne by bacteriophage M13 in Escherichia coli K-12. *Nucl Acids Res*, **15**, 5323 (1987)
- Liang G, Salem CE, Yu MC et al. DNA methylation differences associated with tumor tissues identified by genome scanning analysis. *Genomics*, **53**, 260 – 268 (1998)
- Li G, Passebosco-Faure K, Gentil-Perret A et al. Cadherin-6 gene expression in conventional renal cell carcinoma: a useful marker to detect circulating tumor cells. *Anticancer Res*, **25**, 377 – 381 (2005)
- Liotta LA, Steeg PS and Stetler-Stevenson WG. Cancer metastasis and angiogenesis: an imbalance of positive and negative regulation. *Cell*, **64**, 327 – 336 (1991)
- Liu L, Yoon JH, Dammann R and Pfeifer GP. Frequent hypermethylation of the RASSF1A gene in prostate cancer. *Oncogene*, **21**, 6835 – 6840 (2002)
- Lowry DR and Willumsen BM. Function and regulation of Ras. *Ann Rev Biochem*, **62**, 851 – 891 (1993)
- Luther T, Kotsch M, Mexe A et al. Identification of a novel urokinase receptor splice variant and its prognostic relevance in breast cancer. *Thromb Haemost*, **89**, 705 – 717 (2003)
- Ma H, Hu Z, Zhai X et al. Polymorphisms in the MDM2 Promotor and risk of breast cancer: a case-control analysis in a Chinese population. *Cancer Letters*, **240**, 261 – 267 (2006)

- Mahotka C, Wenzel M, Springer E et al. Survivin- Δ Ex3 and Survivin-2B: Two novel splice variants of the apoptosis inhibitor survivin with different antiapoptotic properties. *Cancer Res*, **59**, 6097 – 6102 (1999)
- Mahotka C, Krieg T, Krieg A et al. Distinct in vivo expression patterns of survivin splice variants in renal cell carcinomas. *Int J Cancer*, **100**, 30 – 36 (2002)
- Maitra A, Wistuba II, Washington C et al. High-resolution chromosome 3p allelotyping of breast carcinomas and precursor lesions demonstrates frequent loss of heterozygosity and a discontinuous pattern of allele loss. *Am J Pathol*, **159**, 119 – 130 (2001)
- Makela TP, Hellsten E, Vesa J, Alitalo K, Peltonen L. An Alu variable polyA repeat polymorphism upstream of L-myc at 1p32. *Hum Mol Genet*, **1**, 217 (1992)
- Maniatis T, Fritsch EF, Sambrook J. Molecular cloning: A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York (1989)
- Mansi JL, Gogas H, Bliss JM et al. Outcome of primary-breast-cancer patients with micrometastases: a long-term follow-up study. *Lancet*, **354**, 197 – 202 (1999)
- Mapara MY, Korner U, Hildebrandt M et al. Monitoring of tumor cell purging after highly efficient immunomagnetic selection of CD34 cells from leukapheresis products in breast cancer patients: comparison of immunocytochemical tumor cell staining and reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *Blood*, **89**, 337 – 344 (1997)
- Martin VM et al. Immunomagnetic enrichment of disseminated epithelial tumor cells from peripheral blood by MACS. *Exp Hematol*, **26**, 252 – 264 (1998)
- Mason JB, Levesque T. Folate: effects on carcinogenesis and the potential for cancer chemoprevention. *Oncology*, **10**, 1727 – 1736 (1996)
- Mathelin C, Cromer A, Wendling C et al. Serum biomarkers for detection of breast cancers: a prospective study. *Breast Cancer Res Treat*, **96**, 83 – 90 (2006)
- McKiernan JM, Buttyan R, Bander NH et al. The detection of renal carcinoma cells in the peripheral blood with an enhanced reverse transcriptase-polymerase chain reaction assay for MN/CA9. *Cancer*, **86**, 492 – 497 (1999)
- McLeod K, Jacks T. The retinoblastoma gene and the control of apoptosis; in Martin SJ (ed): Apoptosis and Cancer. Karger Landes Systems, Basel, pp 141 – 163 (1997)
- Méhes G, Witt A, Kubista E and Ambros PF. Circulating breast cancer cells are frequently apoptotic. *American Journal of Pathology*, **159**, 17 – 20 (2001)
- Meijer-van Gelder ME, Look MP, Peters HA et al. Urokinase-type plasminogen activator system in breast cancer: association with tamoxifen therapy in recurrent disease. *Cancer Res*, **64**, 4563 – 4568 (2004)
- Mendez R, Serrano A, Jäger E et al. Analysis of HLA class I expression in different metastases from two melanoma patients undergoing peptide immunotherapy. *Tissue Antigens*, **57**, 508 – 519 (2001)
- Menin C, Scaini MC, De Salvo GL et al. Association between mdm2 SNP309 and age at colorectal cancer diagnosis according to p53 mutation status. *J Natl Cancer Inst*, **98**, 285 -288 (2006)
- Meye A, Bilkenroth U, Schmidt U et al. Isolation and enrichment of urologic tumor cells in blood samples by semi-automated CD45 depletion autoMACS protocol. *Int J Urol*, **21**, 521 – 530 (2002)
- Meye A und Taubert H. DNA-Reparatur und genomische Instabilität in „Weichteilsarkome des Erwachsenen: Standards, Molekularbiologie, Perspektiven“ Rath F-W und Schönfelder M (Hrsg.). Karger Verlag, Freiburg-Basel, Beiträge zur Onkologie, **56** (2002)

- Mitchell MS, Harel W, Groshen S. Association of HLA phenotype with response to active specific immunotherapy of melanoma. *J Clin Oncol*, **10**, 1158 – 1164 (1992)
- Molina R, Barak V, van Dalen A et al. Tumor markers in breast cancer – european group on tumor markers recommendations. *Tumor Biol*, **26**, 281 – 293 (2005)
- Mori M et al. Molecular detection of circulating solid carcinoma cells in the peripheral blood: the concept of early systemic disease. *Int J Cancer*, **68**, 739 – 743 (1996)
- Morrissey C, Martinez A, Zatyka M et al. Epigenetic inactivation of the RASSF1A 3p21.3 suppressor gene in both clear cell and papillary renal cell carcinoma. *Cancer Res*, **61**, 7277 – 7281 (2001)
- Motzer R, Rini B, Bukowski R et al. Sunitinib in patients with metastatic renal cell carcinoma. *JAMA*, **295**, 2516 – 2524 (2006)
- Motzer RJ, Hutson TE, Tomczak P et al. Sunitinib versus interferon alfa in metastatic renal cell carcinoma. *N Engl J Med*, **356**, 115 – 119 (2007)
- Müller V, Hayes DF and Pantel K. Recent translational research: circulating tumor cells in breast cancer patients. *Breast Cancer Res*, **8**, 1 – 4 (2006)
- Murphy GP. Models for prostate cancer. Alan R. Liss Inc., New York, pp 115 – 132 (1980)
- Musca S, Strat L, Maxim R et al. Malignancy risk in some benign mammary lesions. Article in Romanian, *Rev Med Chir Soc Med Nat Iasi*, **107**, Abstract (2003)
- Narayan A, Zhang XY, Marrogi A et al. Hypomethylation of pericentromeric DNA in breast adenocarcinomas. *Int J Cancer*, **77**, 833 – 838 (1998)
- Naume B, Borgen E, Kvalheim G et al. Detection of isolated tumor cells in bone marrow in early-stage breast carcinoma patients: comparison with preoperative clinical parameters and primary tumor characteristics. *Clinical Cancer Research*, **12**, 4122-4129 (2001)
- Nekarda H, Schmitt M, Ulm K et al. Prognostic impact of urokinase-type plasminogen activator and its inhibitor PAI-1 in completely resected gastric cancer. *Cancer Res*, **54**, 2900 (1994)
- Ngugen DX and Massagué J. Genetic determinants of cancer metastasis. *Nature Reviews*, **8**, 341 – 352 (2007)
- Nuovo G, Plaia TW, Belinsky SA et al. In situ detection of the hypermethylation-induced inactivation of the p16 gene as an early event in oncogenesis. *PNAS*, **22**, 12754 – 12759 (1999)
- Oefelein MG, Kaul K, Herz B et al. Molecular detection of prostate epithelial cells from the surgical field and peripheral circulation during radical prostatectomy. *The Journal of Urology*, **155**, 238 – 242 (1996)
- Offner S, Schmaus W, Witter K et al. p53 gene mutations are not required for early dissemination of cancer cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**, 6942-6946 (1999)
- Ohba K, Miyata Y, Kanda S et al. Expression of urokinase-type plasminogen activator, urokinase-type plasminogen activator receptor and plasminogen activator inhibitors in patients with renal cell carcinoma: correlation with tumor associated macrophage and prognosis. *J Urology*, **174**, 461 – 465 (2005)
- Ohtani-Fujita N, Fujita T, Aoike A et al. CpG methylation inactivates the Promotor activity of the human retinoblastoma tumor suppressor gene. *Oncogene*, **8**, 1063 – 1067 (1993)
- Okada E, Murai Y, Matsui K et al. Survivin expression in tumor cell nuclei is predictive of a favorable prognosis in gastric cancer patients. *Cancer Letters*, **163**, 109 – 116 (2001)
- Okumura N, Saji S, Eguchi H et al. Distinct Promotor usage of mdm2 gene in human breast cancer. *Oncol Rep*, **9**, 557 – 563 (2002)

- Ossowski L. In vivo invasion of modified choriallantoic membrane by tumor cells: the role of cell surface-bound urokinase. *J Cell Biol*, **107**, 2437 – 2445 (1988)
- Page DL, Rogers LW et al. Combined histologic and cytologic criteria for the diagnosis of mammary atypical ductal hyperplasia. *Hum Path*. **23**, 1095 – 1097 (1992)
- Pantel K, Müller V, Auer M et al. Detection and clinical implications of early systemic tumor cell dissemination in breast cancer. *Clinical Cancer Research*, **9**, 6326 – 6334 (2003)
- Pantel K and Brakenhoff RH. Dissecting the metastatic cascade. *Nature Reviews Cancer*, **4**, 448 – 456 (2004)
- Pantel K, Schlimok G, Kutter D et al. Frequent down-regulation of major histocompatibility class I antigen expression on individual micrometastatic carcinoma cells. *Cancer Res*, **51**, 4712 – 4715 (1991)
- Pantel K, Von Knebel Doeberitz M, Izbicki JR und Riethmüller G. Disseminierte Tumorzellen: Diagnostik, prognostische Relevanz, Phänotypisierung und therapeutische Strategien. *Chirurg*, **68**, 1241-1250 (1997)
- Peltomäki P, de la Chapelle A. Mutations predisposing to hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Adv Cancer Res*, **71**, 93 (1997)
- Pentenkaya A, Bozkurt B, Akilli-Ozturk O et al. Lack of association between the mdm2-SNP309 polymorphism and breast cancer risk. *Anticancer Res*, **26**, 4975 – 4977 (2006)
- Pesch B, Haertling J, Ranft U et al. Occupational risk factors for urothelial carcinoma: agent specific results from a case-control study in Germany. *Int J Epidemiol*, **29**, 238 – 247 (2000)
- Petz LN, Ziegler YS, Schultz JR et al. Differential regulation of the human progesterone receptor gene through an estrogen response element half site and sp2 sites. *J Steroid Biochem Mol Biol*, **88**, 113 – 122 (2004)
- Phelps M, Darley M, Primrose JN, Blaydes JP. P53-independent activation of the hdm2-2 Promotor though multiple transcription factor response elements results in elevated hdm2 expression in estrogen receptor α -positive breast cancer cells. *Cancer Res*, **63**, 2616 – 2623 (2003)
- Presti JC, Wilhelm , Reuter V et al. Allelic loss on chromosomes 8 and 9 correlates with clinical outcome in locally advanced clear cell carcinomas of the kidney. *J Urol*, **167**, 1464 – 1468 (2002)
- Racila E, Euhus D, Weiss AJ, et al. Detection and characterization of carcinoma cells in the blood. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**, 4589-4594 (1998)
- Rashid A, Issa JP. CpG island methylation in gastroenterologic neoplasia: a maturing field. *Gastroenterology*, **127**, 578 – 588 (2004)
- Rath FW, Holzhausen HJ, Kügler D. Allgemeine und klinische Pathologie in „Weichteilsarkome des Erwachsenen: Standards, Molekularbiologie, Perspektiven“ Rath F-W und Schönfelder M (Hrsg.). Karger Verlag, Freiburg-Basel, Beiträge zur Onkologie, **56** (2002)
- Regitnig P, Moser R, Thalhammer M et al. Microsatellite analysis of breast carcinoma and corresponding lical recurrences. *Journal of Pathology*, **198**, 190 – 197 (2002)
- Richardson B. Impact of aging on DNA methylation. *Ageing Res Rev*, **2**, 245 – 261 (2003)
- Rini BI, Vogelzang NJ, Dumas MC. Phase II trial of weekly intravenous gemcitabine with continuous infusion fluorouracil in patients with metastatic renal cell cancer. *J Clin Oncol*, **18**, 2419 – 2426 (2000)
- Rios A, Rodriguez JM, Moya MR et al. Frequency of HLA-C alleles in differentiated thyroid carcinoma in southeastern Spain. *Cancer*, **100**, 264 – 269 (2004)

- Robert C, Bolon I, Gazzeri S et al. Expression of plasminogen activator inhibitors 1 and 2 in lung cancer and their role in tumor progression. *Clin Cancer Res*, **5**, 2094 (1999)
- Rodenhiser D, Mann M. Epigenetics and human disease: translating basic biology into clinical applications. *CMAJ*, **174**, 341 – 148 (2006)
- Rostagno P et al. Detection of rare circulating breast cancer cells by filtration cytometry and identification by DNA content: sensitivity in an experimental model. *Anticancer Res*, **17**, 2481 – 2485 (1997)
- Ruijs MW, Schmidt MK, Nevanlinna H et al. The single-nucleotide polymorphism 309 in the MDM2 gene contributes to the Li-Fraumeni syndrome and related phenotypes. *Eur J Hum Genet*, **15**, 110 – 114 (2007)
- Ryu KS, Lee YS, Kim BK et al. Alterations of HLA class I and II antigen expression in preinvasive, invasive and metastatic cervical cancers. *Exp Mol Med*, **33**, 136 – 144 (2001)
- Sakai T, Toguchida J, Ohtani N et al. Allele-specific hypermethylation of the retinoblastoma tumor-suppressor gene. *Am J Hum Genet*, **48**, 880 – 888 (1991)
- Samuels BL, Hollis DR, Rosner GL. Modulation of vinblastine resistance in metastatic renal cell carcinoma with cyclosporine A or tamoxifen: a Cancer and Leukemia Group B study. *Clin Cancer Res*, **3**, 1977 – 1984 (1997)
- Sanjmyatav J, Schubert J and Junker K. Comparative study of renal cell carcinoma by CGH, multicolor-FISH and conventional cytogenetic banding analysis. *Oncology Reports*, **14**, 1183 – 1187 (2005)
- Sanz-Casla MT, Maestro ML, del Barco V, Zanna I, Moreno J. Loss of heterozygosity and methylation of p16 in renal cell carcinoma. *Urol Res*, **31**, 159 – 162 (2003)
- Schindlbeck C, Kampik T, Janni W et al. Prognostic relevance of disseminated tumor cells in the bone marrow and biological factors of 265 primary breast carcinomas. *Breast Cancer Research*, **7**, R1174 – R1185 (2005)
- Schmidt-Kittler O, Ragg T, Daskalakis A et al. From latent disseminated cells to overt metastasis: genetic analysis of systemic breast cancer progression. *PNAS*, **100**, 7737 – 7742 (2003)
- Schrader M, Weissbach L, Müller M et al. Detection of germ-cell-tumor-specific gene products in peripheral blood by immunomagnetic tumor cell enrichment followed by RT-PCR. *Int J Mol Med*, **13**, 685 – 690 (2004)
- Schröder CP, Ruiters MHJ, De Jong S et al. Detections of micrometastatic breast cancer by means of real time quantitative RT-PCR and immunostaining in perioperative blood samples and sentinel nodes. *Int J Cancer*, **106**, 611 – 618 (2003)
- Schuster R, Max N, Mann B et al. Quantitative Real-time RT-PCR for detection of disseminated tumor cells in peripheral blood of patients with colorectal cancer using different mRNA markers. *Int J Cancer*, **108**, 219 – 227 (2004)
- Seidel C, Bartel F, Rastetter M et al. Alterations of cancer-related genes in soft tissue sarcomas: hypermethylation of RASSF1A is frequently detected in leiomyosarcoma and associated with poor prognosis in sarcoma. *Int J Cancer*, **114**, 442 – 447 (2005)
- Shen C-Y, Yu J-C, Lo Y-L et al. Genome-wide search for loss of heterozygosity using laser capture microdissected tissue of breast carcinoma: An implication for mutator phenotype and breast cancer pathogenesis. *Cancer Res*, **60**, 3884 – 3892 (2000)
- Shiraishi M, Chuu YH, Sekiya T. Isolation of DNA fragments associated with methylated CpG islands in human adenocarcinomas of the lung using a methylated DNA binding column and denaturing gradient gel electrophoresis. *Proc Natl Acad Sci*, **96**, 2913 – 2918 (1999)

- Shimazui T, Yoshikawa K, Uemura H et al. Detection of cadherin-6 mRNA by nested RT-PCR as a potential marker for circulating cancer cells in renal cell carcinoma. *Int J Oncol*, **23**, 1049 – 1054 (2003)
- Siah SP, Quinn DM, Bennett GD et al. Microsatellite instability markers in breast cancer: A review and study showing MSI was not detected at „BAT 25“ and „BAT 26“ microsaellite markers in early-onset breast cancer. *Breast Cancer Research and Treatment*, **60**,135-142 (2000)
- Siebels M. Immuntherapie bei Nierenkrebs. Ratgeber für Patienten. *Georg-Thieme-Verlag*, Stuttgart (2005)
- Simpson JF, Page DL. Pathology of preinvasive and excellent prognosis breast cancer. *Oncology*, **13**, 426 – 430 (2001)
- Slade MJ, Smith BM, Sinnett HD, Cross NCP and Coomers RC. Quantitative polymerase chain reaction for the detection of micrometastases in patients with breast cancer. *Journal of Clinical Oncology*, **17**, 870-879 (1999)
- Sliwowska I, Kopczynski Z, Grodecka-Gazdecka S. Diagnostic value of measuring serum CA 15-3, TPA, and TPS in women with breast cancer. *Postepy Hig Med Dosw. (online)*, **60**, 295 – 299 (2006)
- Smith BM, Slade MJ, English J et al. Response of circulating tumor cells to systemic therapy in patients with metastatic breast cancer: comparison of quantitative polymerase chain reaction and immunocytochemical techniques. *J Clin Oncol*, **18**, 1432 – 1439 (2000)
- Sokoloff MH, Tso CL, Kaboo R, et al. Quantitative polymerase chain reaction does not improve preoperative prostate cancer staging: a clinicopathological molecular analysis of 121 patients. *J Urol*, **156**, 1560 – 1566 (1996)
- Solomayer EF, Diel I, Salanti G et al. Time independence of the prognostic impact of tumor cell detection in the bone marrow of primary breast cancer patients. *Clin Cancer Res*, **7**, 4102 – 4108 (2001)
- Sood AK and Buller RE. Genomic instabilities in ovarian cancer: A reassessment using arbitrary primed polymerase chain reaction. *Oncogene*, **13**, 2499 – 2504 (1996)
- Stadler WM. Targeted agents for the treatment of advanced renal cell carcinoma. *Cancer*, **104**, 2323 – 2333 (2005)
- Staehler und Pomer, Springer Verlag, Heidelberg (1997)
- Stathoupoulou A, Gizi A, Perraki M et al. Real-time quantification of CK-19 mRNA-positive cells in peripheral blood of breast cancer patients using the lightcycler system. *Clin Cancer Res*, **9**, 5145 – 5151 (2003)
- Stoner M, Wormke M, Saville B et al. Estrogen regulation of vascular endothelial growth factor gene expression in ZR-75 breast cancer cells through interaction of estrogen receptor α and SP proteins. *Oncogene*, **23**, 1052 – 1063 (2004)
- Storjohann HE. Immunhistologie in der täglichen Praxis. *mta*, **13**, 236 – 241 (1998)
- Stuehr DJ, Nathan CF. Nitric oxide. A macrophage product responsible for cytostasis and respiratory inhibition in tumor target cells. *J Exp Med*, **169**, 1543 – 1355 (1989)
- Surgman BJ et al. Recombinant human tumor necrosis factor-alpha: effects on proliferation of normal and transformed cells in vitro. *Science*, **230**, 943 – 945 (1985)
- Sugimura J, Tamura G, Suzuki Y, Fujioka T. allelic loss on chromosomes 3p, 5q and 17p in renal cell carcinomas. *Pathol Int*, **47**, 79 – 73 (1997)
- Swiercz R, Wolfe JD, Zaher A and Jankun J. Expression of the plasminogen activation system in kidney cancer correlates with its aggressive phenotype. *Clin Cancer Res*, **4**, 869 – 877 (1998)

- Tampellini M, Berruti A, Bitossi R et al. Prognostic significance of changes in CA 15-3 serum levels during chemotherapy in metastatic breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat*, **98**, 241 – 248 (2006)
- Taubert H. Molekularpathologische Untersuchungen von Tumorsuppressor-Genen und Onkogenen in Weichteilsarkomen. MLU Halle-Wittenberg, Habilitationsarbeit (1999)
- Taubert H. Onkogene und Tumorsuppressorgene, Apoptose in „Weichteilsarkome des Erwachsenen: Standards, Molekularbiologie, Perspektiven“ Rath F-W und Schönfelder M (Hrsg.). Karger Verlag, Freiburg-Basel, Beiträge zur Onkologie, **56** (2002)
- Taubert H, Blümke K, Bilkenroth U et al. Detection of disseminated tumor cells in peripheral blood of patients with breast cancer: correlation to nodal status and occurrence of metastases. *Gynecol Oncol*. **92**, 256 – 261 (2004)
- Taubert H, Kappler M, Bache M et al. Elevated expression of survivin-splice variants predicts a poor outcome for soft-tissue sarcomas patients. *Oncogene*, **24**, 5258 – 5261 (2005)
- Tavassoli FA, Norris HJ. A comparison of the results of long-term follow-up for atypical intraductal hyperplasia and intraductal hyperplasia of the breast. *Cancer*, **6**, 518 – 529 (1990)
- Terstappen LW, Rao C, Gross S and Weiss AJ. Peripheral blood tumor cell load reflects the clinical activity of the disease in patients with carcinoma of the breast. *Int. J. Oncol*. **17**, 573 – 578 (2000)
- TNM Classification of malignant tumors, 6th edition. *John Wiley & sons*, Hoboken, New Jersey, 2002
- Tokinaga K, Nomura O, Ashida S et al. Hypermethylation of the RASSF1A tumor suppressor gene in Japanese clear cell renal cell carcinoma. *Oncol Rep*, **12**, 805 – 810 (2004)
- Toyota M and Issa J-PJ. CpG island methylator phenotypes in aging and cancer. *Seminars in cancer biology*, **9**, 349 – 357 (1999)
- Trent RJ. Molekulare Medizin. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg; Berlin; Oxford, pp 208 – 223 (1994)
- Ueki T, Toyota M, Sohn T et al. Hypermethylation of multiple genes in pancreatic adenocarcinoma. *Cancer Res*, **60**, 1835 – 1839 (2000)
- Van den Berg A, Hulsbeek MF, de Jong D et al. Major role for 3p21 region and lack of involvement of the t(3;8) breakpoint region in the development of renal cell carcinoma suggested by loss of heterozygosity analysis. *Genes Chromosomes Cancer*, **15**, 64 – 72 (1996)
- Van den Tweel JG. Immunologie – Das menschliche Abwehrsystem. *Spektrum Akademischer Verlag*, Heidelberg (1999)
- Von Knebel-Doeberitz M and Lacroix J. Nucleic acid based techniques for the detection of rare cancer cells in clinical samples. *Cancer and Metastasis Reviews*, **18**, 43-64 (1999)
- Vrdoljak DV, Knezevic F, Ramljak V. The relation between tumor marker Ca 15-3 and metastases in interpectoral lymph nodes in breast cancer patients. *Saudi Med J*, **27**, 460 – 462 (2006)
- Wagener C. Molekulare Onkologie: Entstehung und Progression maligner Tumoren. Georg Thieme Verlag, Stuttgart-New York, 2. Auflage (1999)
- Wagner SN, Atkinson MJ, Thanner S et al. *J Pathol*, **179**, 95 – 99 (1996)
- Waki T, Tamura G, Sato M and Motoyama T. Age-related methylation of tumor suppressor and tumor-related genes: an analysis of autopsy samples. *Oncogene*, **22**, 4128 – 4133 (2003)

- Walsh CS, Miller CW, Karlan BY, Koeffler HP. Association between a functional single nucleotide polymorphism in the mdm2 gene and sporadic endometrial cancer risk. *Gynecologic Oncology*, **10**, 1016 – 1020 (2006)
- Wasielewski M, Nagel JHA, Brekelmans C et al. MDM2 SNP309 accelerates familial breast carcinogenesis independently of estrogen signaling. *Breast Cancer Res Treat*, DOI 10.1007/s10549-006-9407-5 (2007)
- Watatani M, Inui H, Nagayama K et al. Identification of high-risk breast cancer patients from genetic changes of their tumors. *Surg Today*, **30**, 516 – 522 (2000)
- Weckermann D, Müller P, Wawroschek F et al. Disseminated cytokeratin positive tumor cells in the bone marrow of patients with prostate cancer: detection and prognostic value. *J Urol*, **166**, 699 – 704 (2001)
- Wei Y, Yang X, Liu Q et al. A role for caveolin and the urokinase receptor in integrin-mediated adhesion and signaling. *J Cell Biol*, **22**, 1285 – 1294 (1999)
- Weinberg RA. The retinoblastoma protein and cell cycle control. *Cell*, **81**, 323 – 330 (1995)
- Whitmore WF. Renal cell carcinoma: *Overview*. *Semin Urol*, **7**, 271 – 273 (1989)
- Wild P, Knuechel R, Dietmaier W et al. Laser microdissection and microsatellite analyses of breast cancer reveal a high degree of tumor heterogeneity. *Pathology*, **68**, 180 – 190 (2000)
- Wolfle U, Müller V, Pantel K. Disseminated tumor cells in breast cancer: detection, characterization and clinical relevance. *Future Oncol*, **4**, 553 – 561 (2006)
- Wright DK and Manos MM. PCR protocols: A guide to methods and applications. Academic press, San Diego, pp 153 – 158 (1990)
- Yang Q, Yoshimura G, Suzuma T et al. Clinicopathological significance of fragile histidine triad transcription protein expression in breast carcinoma. *Clin Cancer Res*, **7**, 3869 – 3873 (2001)
- Yang Q, Nakamura M, Nakamura Y et al. Two-hit inactivation of FHIT by loss of heterozygosity and hypermethylation in breast cancer. *Clin Cancer Res*, **8**, 2890 – 2893 (2002)
- Yoon JH, Dammann R and Pfeifer GP. Hypermethylation of the CpG island of the RASSF1A gene in ovarian and renal cell carcinoma. *Int J Cancer*, **94**, 212 – 217 (2001)
- Zach O, Kasparu H, Krieger O et al. Detection of circulating mammary carcinoma cells in the peripheral blood of breast cancer patients via a nested reverse transcriptase polymerase chain reaction assay for mammaglobin mRNA. *J Clin Oncol*, **17**, 2015 – 2019 (1999)
- Zehentner BK. Detection of disseminated tumor cells: strategies and diagnostic implications. *Expert Rev Mol Diagn*, **2**, 41 – 48 (2002)
- Zeidmann I. The fate of circulating tumor cells. I. Passage of cells through capillaries. *Cancer Res*. **21**, 38 – 39 (1961)
- Zia A, Schildberg FW and Funke I. MHC class I negative phenotype of disseminated tumor cells in bone marrow is associated with poor survival in R0M0 breast cancer patients, *Int J Cancer*, **93**, 566 – 570 (2001)
- Zigeuner RE, Riesenberger R, Pohla H et al. Immunomagnetic cell enrichment detects more disseminated cancer cells than immunocytochemistry in vitro. *The Journal of Urology*, **164**, 1834-1837 (2000)
- Zingg JM, Jones PA. Genetic and epigenetic aspects of DNA methylation on genome expression, evolution, mutation and carcinogenesis. *Carcinogenesis*, **18**, 869 – 882 (1997)
- Zudaire I, Odero MD, Caballero C et al. *Histopathology*, **40**, 547 – 555 (2002)

8. Anhang

Tab. 8 – 1: pTNM – Klassifizierung von Mammakarzinomen.

Bezeichnung	Erläuterung der Abkürzungen
pT – Primärtumor	
pT0	Primärtumor nicht nachweisbar
pTis	Carcinoma in situ
pT1	Tumor ohne direkte Ausdehnung auf Brustwand oder Haut, Tumor ≤ 2 cm pT1a Tumor mit Durchmesser von 0,5 cm oder weniger pT1b Tumor > 0,5 cm bis 1,0 cm pT1c Tumor > 1,0 cm bis 2,0 cm
pT2	Tumor > 2,0 cm bis 5,0 cm
pT3	Tumor > 5,0 cm
pT4	Tumor jeder Größe mit direkter Ausdehnung auf Brustwand oder Haut pT4a Tumor irgendeiner Größe mit Fixierung an der Brustwand pT4b Tumor irgendeiner Größe mit Ödem, Infiltration oder Ulzeration der Brustdrüsenwand oder Satellitenknoten im Bereich der gleichen Brustdrüse pT4c Kombination von pT4a und pT4b pT4d Endzündliches (inflammatorisches) Karzinom
pTx	Das Ausmaß der Invasion kann nicht bestimmt werden
pN – Regionale Lymphknoten	
pN0	kein Nachweis einer Invasion regionärer Lymphknoten
pN1	Nachweis der Invasion von beweglichen homolateralen Achsellymphknoten pN1mic Mikrometastasen > 0,2 mm – 2 mm pN1a 1 – 3 axilläre Lymphknotenmetastasen pN1b A. mammaria interna Metastasen, klinisch nicht erkennbar pN1c Kombination von pN1a und pN1b
pN2	Nachweis der Invasion homolateraler Achsellymphknoten, die aneinander oder an andere Strukturen fixiert sind pN2a 4 – 9 axilläre Lymphknotenmetastasen pN2b A. mammaria interna Metastasen, klinisch erkennbar, keine axillären Lymphknotenmetastasen
pN3	Nachweis der Invasion homolateraler supraklavikulärer oder infraklavikulärer Lymphknoten pN3a ≥ 10 axilläre oder infraklavikuläre Lymphknotenmetastasen pN3b A. mammaria interna Metastasen, klinisch erkennbar oder > 3 klinisch nicht erkennbare axilläre und A. mammaria interna Lymphknotenmetastasen pN3c Supraklavikuläre Lymphknotenmetastasen
pNx	Das Ausmaß der Invasion kann nicht bestimmt werden

pM – Metastasen

pM0	kein Nachweis von Fernmetastasen
pM1	Nachweis von Fernmetastasen
pMx	Die Minimalanforderungen zur Bestimmung können nicht erfüllt werden

Tab. 8 – 2: pTNM-Klassifizierung von Nierenzellkarzinomen.**Bezeichnung Erläuterung der Abkürzungen****pT – Primärtumor**

pT0	Primärtumor nicht nachweisbar
pT1	Tumor ≤ 7 cm in der größten Ausdehnung, auf die Niere beschränkt pT1a Tumor ≤ 4 cm pT1b Tumor > 4 cm, aber ≤ 7 cm
pT2	Tumor > 7 cm in der größten Ausdehnung, auf die Niere beschränkt
pT3	Ausbreitung des Tumors in die Hauptvenen, Nebennieren oder das perirenale Fettgewebe pT3a Tumor invasiert direkt die Nebennieren oder das perirenale Gewebe pT3b Tumorausbreitung in die renalen Venen oder die Vena Cava unter dem Diaphragma pT3c Tumorausbreitung in die Vena Cava oder deren Wände oberhalb des Diaphragma
pT4	Nachweis der Ausbreitung in die umgebenden Organe oder in die Bauchwand
pTx	Die Minimalanforderungen zur Bestimmung des Primärtumors können nicht erfüllt werden.

pN – Regionäre Lymphknoten

pN0	kein Nachweis eines Befalls regionärer Lymphknoten
pN1	Nachweis des Befalls eines einzigen regionären Lymphknotens
pN2	Nachweis des Befalls mehr als ein regionärer Lymphknoten
pNx	Die Minimalanforderungen zur Bestimmung können nicht erfüllt werden

pM – Metastasen

pM0	kein Nachweis von Fernmetastasen
pM1	Nachweis von Fernmetastasen
pMx	Die Minimalanforderungen zur Bestimmung können nicht erfüllt werden

Tab. 8 – 3: pTNM-Klassifizierung von Prostatakarzinomen.

Bezeichnung	Erläuterung der Abkürzungen
pT	– Primärtumor
pT0	Primärtumor nicht nachweisbar
pT1	Klinisch inapparenter Tumor, der weder tastbar noch in bildgebenden Verfahren sichtbar ist
	pT1a zufälliger histologischer Befund in 5% oder weniger des resezierten Gewebes
	pT1b zufälliger histologischer Befund in mehr als 5% des resezierten Gewebes
	pT1c Tumor mittels Nadelbiopsie diagnostiziert (z.B. wegen hoher PSA-Werte)
pT2	Tumor begrenzt auf Prostata
	pT2a Tumor erfasst einen Seitenlappen mit weniger als 50%
	pT2b Tumor erfasst einen Seitenlappen mit mehr als 50%
	pT2c Tumor erfasst beide Seitenlappen
pT3	Tumor breitet sich durch die Prostatakapsel hindurch in extrakapsuläres Gewebe aus
	pT3a extrakapsuläre Ausbreitung
	pT3b Tumor infiltriert Samenblase(n)
	Tumor ist fixiert oder infiltriert andere benachbarte Strukturen als Samenblasen
pT4	
pTx	Primärtumors kann nicht beurteilt werden
pN	– Regionäre Lymphknoten
pN0	kein Nachweis eines Befalls regionärer Lymphknoten
pN1	regionärer Lymphknotenbefall
pNx	Die Minimalanforderungen zur Bestimmung können nicht erfüllt werden
pM	– Metastasen
pM0	kein Nachweis von Fernmetastasen
pM1	Nachweis von Fernmetastasen
	pM1a extraregionärer Lymphknotenbefall
	pM1b Knochenmetastasen
	pM1c andere Manifestation
pMx	Die Minimalanforderungen zur Bestimmung können nicht erfüllt werden

Tab. 8 – 4 Ergebnisse der Mikrosatelliten- und Heterozygotieverlust-Analysen bei den NZK-Patienten. Dargestellt sind alle Patienten mit Veränderungen in mindestens einem der drei untersuchten Mikrosatellitenmarkern (Rb, myc-L1, p53 Alu). Zusätzlich sind die Daten der Methylierungs-Analysen dieser Patienten aufgeführt (Ges ... Geschlecht; RAS N ... RASSF1A-Methylierung im Normalgewebe; RAS T ... RASSF1A-Methylierung im Tumorgewebe; k.V. ... keine Veränderungen in den untersuchten DTZ).

							Methylierung								DTZ		LOH/MSI			DTZ				
							Alter	Ges	pT	pN	pM	G	SNP309	RAS N	RAS T	p16 N	p16 T	rar-β N	rar-β T	FHIT N	FHIT T	BI+-Zel.	CK+-Zel.	Status
NZK-1	35	m	1	0	0	3	.	nein	ja	nein	nein	nein	nein	nein	ja	nein	nein	am Leben			MSI			
2/02	72	w	3	0	1	2	.	ja	ja	nein	nein	nein	nein	nein	nein	ja	nein	verstorben	LOH		LOH			
NZK-5	68	w	3	0	1	2	.	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	ja	nein	am Leben			LOH			
21/01	78	w	3	0	0	3	.	ja	ja	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	am Leben	LOH					
48/99	79	w	1	0	0	3										nein	ja	am Leben				k.V.		
NZK-22	40	m	3	0	0	2	T/G	nein	nein	nein	nein	ja	nein	nein	nein	nein	nein	am Leben		LOH				
19/01	46	m	2	0	0	3										nein	nein	verstorben		MSI				
NZK-24	50	m	1	0	0	2	.	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	am Leben			MSI			
NZK-29	71	m	1	0	0	2	T/G	nein	ja	nein	ja	nein	nein	ja	nein	ja	nein	am Leben			LOH			
NZK-30	70	w	1	0	0	2										nein	nein	am Leben	LOH					
NZK-33	74	w	1	0	0	3	T/G	ja	ja	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	am Leben	LOH					
NZK-35	62	m	3	0	1	3	.	ja	ja	nein	nein	nein	ja	nein	nein	nein	nein	am Leben		LOH				
NZK-38	63	w	1	0	0	2	.	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	verstorben			MSI			
NZK-44	50	m	3	2	0	3	.	ja	ja	nein	ja	nein	nein	nein	nein	ja	ja	am Leben				k.V.		
NZK-53	72	w	3	2	0	3	T/G	ja	ja	nein	ja	nein	nein	nein	nein	ja	nein	verstorben		LOH				
23/03	68	m	3	0	1	3	T/T	nein	ja	nein	nein	nein	nein	nein	nein	ja	nein	verstorben				LOH	MSI	
NZK-71	72	m	1	0	1	2	.	nein	ja	nein	nein	nein	nein	nein	nein	ja	ja	verstorben	MSI					
17/01	51	w	2	0	0	3	.	ja	ja	nein	nein	nein	nein	nein	nein	ja	nein	am Leben		MSI				
6/03	71	w	1	0	0	3	.	ja	ja	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	verstorben			LOH			
NZK-91	62	w	1	0	0	1	T/G	nein	ja	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	am Leben	LOH					
19/03	65	m	3	2	1	3	.	ja	ja	nein	nein	nein	nein	nein	nein	ja	nein	verstorben				k.V.		
NZK-98	68	m	1	2	0	3	T/T	ja	ja	nein	nein	nein	nein	nein	nein	ja	nein	am Leben	LOH					
NZK-101	77	w	3	0	0	2	T/G	ja	ja	nein	nein	nein	nein	nein	nein	ja	nein	am Leben	LOH				LOH	
27/97	71	m	2	1	0	2	.	ja	ja	nein	nein	nein	nein	nein	nein	ja	nein	am Leben	MSI			k.V.		
17/00	63	w	2	2	1	2	.	nein	ja	nein	ja	nein	nein	ja	nein	ja	nein	am Leben	MSI			k.V.		
NZK-113	49	m	1	1	0	2	G/G	nein	ja	nein	nein	nein	nein	nein	nein	ja	nein	am Leben	LOH					
6/00	74	w	3	0	0	2	T/G	nein	ja	am Leben						MSI
44/99	63	m	2	1	1	2	.	nein	ja	nein	nein	nein	nein	nein	nein	ja	ja	verstorben				MSI	MSI	

Tab. 8 – 5 Ergebnisse der Mikrosatelliten- und Heterozygotieverlust-Analysen bei den MMK-Patienten. Zusätzlich sind die Daten der Methylierungs-Analysen aufgeführt (RAS N ... RASSF1A-Methylierung im Normalgewebe; RAS T ... RASSF1A-Methylierung im Tumorgewebe; k.V. ... keine Veränderungen in den untersuchten DTZ).

	Alter	pT	pN	pM	G	SNP309	Methylierung								DTZ		Status	MSI/LOH			MSI/LOH bei den DTZ			
							Ras N	RAS T	p16 N	p16 T	rar-β N	rar-β T	FHIT N	FHIT T	BL+	CK+		Rb	myc	p53	Rb	myc	p53	
FI180836	65	1	0	0	1	T/G									ja	ja	am Leben	LOH		LOH	LOH	LOH	LOH	LOH
KF310721	80	3	1	0	3		ja	ja	nein	nein	nein	ja	nein	nein	ja	ja	am Leben							
KH181139	62	1	1	0	2	T/G	nein	ja	nein	nein	nein	ja	nein	nein	ja	ja	am Leben	LOH			LOH	MSI		
KA171033	68	2	1	0	2		nein	ja	nein	ja	nein	ja	nein	nein	nein	nein	am Leben							
KI080323	78	1	1	0	2		nein	ja	nein	ja	nein	nein	nein	nein	ja	nein	verstorben							
HE130731	69	1	1	1	2		nein	ja	verstorben	.	.	.	k.V	.	.	.
10/03	61	2	1	0	3		nein	ja	nein	nein	nein	ja	nein	ja	nein	nein	verstorben							
LD161231	70	.	.	.	3		nein	ja	nein	nein	nein	ja	nein	nein	nein	nein	am Leben							
LH010638	63	1	0	0	1	G/G	ja	ja	nein	nein	nein	nein	nein	ja	nein	am Leben								
MM011058	63	1	0	0	3		nein	ja	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	am Leben							
MU280522	79	2	0	0	2	G/G	ja	ja	nein	nein	nein	ja	nein	nein	ja	ja	verstorben							
MG070525	76	2	0	0	2		nein	ja	nein	nein	nein	nein	nein	ja	nein	am Leben								
MH120937	64	1	0	0	2		nein	ja	nein	nein	nein	ja	nein	nein	nein	nein	am Leben							
MD050443	58	2	0	0	2	T/G	nein	ja	nein	nein	nein	ja	nein	nein	ja	ja	am Leben							
11/03	54	2	1	0	2	T/T	ja	ja	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	am Leben							
13/03	82	1	1	1	2		ja	nein	nein	nein	nein	nein	nein	ja	ja	nein	verstorben							
21/03	55	2	2	0	4	T/G	nein	ja	nein	nein	nein	ja	nein	nein	nein	nein	verstorben							
SM021251	50	2	0	0	2	T/G	ja	ja	nein	nein	nein	nein	nein	nein	ja	nein	am Leben							
ZE120733	68	1	0	0	2	T/G	nein	ja	nein	ja	nein	ja	nein	nein	ja	ja	am Leben							

Danksagung

Für die Überlassung des Themas und der Möglichkeit die Arbeit am Institut für Pathologie durchführen zu können, möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr.med. F.-W. Rath recht herzlich bedanken.

Ein besonderer Dank gilt Herrn PD Dr.rer.nat. H. Taubert für sein Vertrauen in meine Arbeit und die zahlreichen Hilfestellungen und Anregungen zur Lösung bei Problemen. Seit meiner Diplomarbeit am Institut für Pathologie wurde ich von ihm unterstützt, motiviert und gelenkt.

Weiterhin möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr.med. P. Fornara und Herrn Prof. Dr.med. H. Heynemann (Klinik und Poliklinik für Urologie) bedanken. Die Arbeit wäre ohne finanzielle Unterstützung über Drittmittelprojekte der Klinik und Poliklinik für Urologie nicht möglich gewesen. Außerdem danke ich Herrn Prof. Dr.med. P. Fornara und Herrn Prof. Dr.med. H. Heynemann für die Unterstützung bei der Vorstellung der Ergebnisse auf verschiedenen nationalen und internationalen Kongressen.

Mein Dank gilt Herrn PD Dr.rer.nat. A. Meye für die unentwegte Unterstützung, insbesondere für die guten Ideen, die konstruktive Kritik und den fortwährenden Optimismus.

Auch ein besonderes Dankeschön gilt Herrn Dr. med. U. Bilkenroth für die Beurteilung und Auswertung der Cytospinpräparate der Karzinompatienten und für die zahlreichen Blutentnahmen und Hilfestellungen bei medizinischen Fragen.

Danken möchte ich Herrn Dr.rer.nat. F. Bartel, Herrn Dr.rer.nat. M. Kappler und Herrn Dr.rer.nat. M. Bache für die Hilfestellungen, Diskussionen und Ideen und allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe für die freundliche Atmosphäre und der Unterstützung bei meiner Arbeit.

Für die Durchführung der HLA-Typisierungen und die Überarbeitung und Diskussion der HLA-Daten möchte ich Herrn DM W. Altermann recht herzlich danken (HLA-Labor des Institutes für Medizinische Immunologie, Direktor: Prof. Dr.rer.nat. B.Seliger).

Bei Herrn Dr. M. Kotzsch möchte ich mich für die Hilfsbereitschaft und die Möglichkeit hinsichtlich der Durchführung der Proteinstudien am Institut für Pathologie der Technischen Universität in Dresden bedanken.

Ferner gilt mein Dank Frau Dr.rer.nat. C. Lautenschläger (Institut für Medizinische Epidemiologie, Biometrie und Informatik) und Herrn Dr.rer.nat. Göbel für die Unterstützung und Beratung hinsichtlich der statistischen Analysen.

Desweiteren möchte ich Herrn Prof. Dr.med. C. Thomssen und Frau Dr.med. E.-J. Kantelhardt (Universitäts- und Poliklinik für Gynäkologie) für die Bereitstellung von Mammakarzinomproben und Frau S.Kaufhold für die Präparation von DNA-Proben danken.

Besonders herzlicher Dank gilt meinen Eltern für die vertrauensvolle und kontinuierliche Unterstützung meiner Vorhaben.

Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe. Andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel wurden nicht benutzt. Die aus fremden Quellen direkt oder indirekt entnommenen Gedanken sind als solche kenntlich gemacht.

Die Dissertation wurde bisher weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Halle, den 28.08.2007

Karen Blümke

Tabellarischer Lebenslauf

persönliche Daten

Name	Karen Blümke
Wohnort	Palmenstraße 13 06122 Halle / Sachsen – Anhalt
Telefon	0345/8054353
Geburtsdatum-/Ort	05.08.1978, Halle
Familienstand	ledig
Beruf	Diplom-Biochemikerin

Schulbildung

1985 – 1991	Polytechnische Oberschule Wettin
1991 – 1997	Burggymnasium Wettin, Abschluss: Abitur (Note:1,9)

Wissenschaftlicher Werdegang

1997 – 2002	Studium der Biochemie an der Martin – Luther – Universität Halle – Wittenberg
2001 – 2002	schriftliche Diplomarbeit am Institut für Pathologie, AG Molekularpathologie, der MLU Halle - Wittenberg Thema: „Molekularbiologische Untersuchungen von disseminierten Tumorzellen und Karzinomen“ (Prädikat: „sehr gut“ 1,0)
2002 – 2006	Doktorandin am Institut für Pathologie, AG Molekularpathologie, MLU Halle-Wittenberg (Arbeit an der Promotion)
Seit Dez. 2006	wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für Rechtsmedizin, Chemisch-Toxikologische Abteilung, MLU Halle-Wittenberg (Prof. Dr. med. habil. M. Kleiber)