

INAUGURAL-DISSERTATION

vorgelegt von

Diplom-Biologe Igor Gerasimovski

aus Bocholt

**Analyse von genomischen Veränderungen in Prostatakarzinomen der
Tumor - Suppressorregion 10q26 und eines putativen Prostatakarzinom –
Suszeptibilitätsgens *HPC2/ELAC2***

Erlangung der Doktorwürde
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität

in

Düsseldorf

2003

mom anđelu Niklasu

i

mojim roditeljima

Referent: Frau Prof. Dr. Brigitte Royer-Pokora

Korreferent: Herr Prof. Dr. Ulrich Rüther

Tag der mündlichen Prüfung: Dienstag, der 03. Februar 2004

Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
Abb.	Abbildung
Bp	Basenpaar
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
ddH ₂ O	doppeltdestilliertes Wasser
DNA	Desoxyribonukleinsäure
et al.	und andere
EtOH	Ethanol
G	Guanin
g	Gramm
h	Stunde
k	kilo (x 10 ³)
kB	Kilobasenpaar
l	Liter
m	milli (x 10 ⁻³)
M	Molarität
μ	mikro (x 10 ⁻⁶)
min	Minute
n	nano (x 10 ⁻⁹)
p	piko (x 10 ⁻¹²)
PAA	Polyacrylamid
PCR	Polymerase Chain Reaction (Polymerase Kettenreaktion)
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
sec	Sekunde
T	Thymin
Tab.	Tabelle
U	Einheit (U)
u.a.	unter anderem
üN	über Nacht
z.B.	zum Beispiel

Inhaltsverzeichnis

I. Einleitung	1
I. 1 Onkogene und Tumorsuppressorgene (TSGs)	1
I. 1.1 Onkogene	2
I. 1.2 Tumorsuppressorgene (TSGs)	3
I. 2 Aberrationen im Genom	4
I. 2.1 LOH (Loss of Heterozygosity)	4
I. 2.2 Defekte in DNA-Reparaturgenen	5
I. 3 Prostatakarzinome	7
I. 3.1 Prostata	7
I. 3.2 Prostatakarzinome	8
I. 4 Klinik	11
I. 5 Pathologie	12
I. 6 Gradierung und Bestimmung der Stadien eines Prostatakarzinoms	12
I. 6.1 Bestimmung und histologische Gradierung nach <i>Gleason et al., 1966</i>	13
I. 6.2 Tumorsuppressorgene (TSGs)	16
I. 7 Formen des Prostatakarzinoms	17
I. 7.1 Nachweis von LOH in 10q	18
I. 7.2 Hereditäre Prostatakarzinome	21
I. 8 Zielsetzung der Arbeit	22
II. Material und Methoden	23
II. 1 Material	23
II. 1.1 Chemikalien	23
II. 1.2 Enzyme	24
II. 1.3 DNA-Größenmarker für die Elektrophorese	25
II. 1.4 Oligonukleotide	25
II. 1.4.1 LOH-Analyse	25
II. 1.4.2 <i>HPC2/ELAC2</i> -Analyse	27
II. 1.5 Verwendete „Kits“	28
II. 1.6 Verbrauchsmaterialien	28
II. 1.7 Geräte	29
II. 1.8 Puffer und Lösungen	29

II. 2 Methoden	31
II. 2.1 LOH-Analyse	31
II. 2.1.1 Pathologie	32
II. 2.1.2 Isolierung der Zellen aus Paraffinpräparaten	33
II. 2.1.3 Amplifikation der extrahierten DNA	35
II. 2.1.4 LOH-Detektion	38
II. 2.2 <i>HPC2/ELAC2</i> -Polymorphismusanalyse	39
II. 2.2.1 Silberfärbung von Polyacrylamidgelen	42
II. 2.2.2 Analyse mit Hilfe der DHPLC-Methode	43
II. 2.2.3 Sequenzierung der amplifizierten DNA	45
II. 2.2.4 Statistik	46
III. Patienten und Kontrollpersonen	47
III. 1 Patienten	47
III. 2 Kontrollpersonen	47
IV. Ergebnisse	48
IV. 1 Untersuchung sporadischer Prostatakarzinome	49
IV. 1.1 Untersuchung von Veränderungen auf Chromosom 10	49
IV. 1.2 DNA-Extraktion aus Paraffinschnitten und Amplifikation der DNA	50
IV. 1.3 Extrahierte DNA aus Normalgewebe	53
IV. 1.4 Amplifikationsmethode nach <i>Paulson et al., 1999</i>	56
IV. 1.5 LOH-Analyse	59
IV. 2 <i>HPC2/ELAC2</i>	68
IV. 2.1 Polymorphismusanalyse in <i>HPC2/ELAC2</i>	68
IV. 2.2 Berechnung der Haplotypenfrequenz	77
V. Diskussion	81
V. 1 Deletionen in der Region 10q26 in Zellen von Prostatakarzinomen	81
V.2 Familiäre Prädisposition des Prostatakarzinoms: <i>HPC2/ELAC2</i>	86
VI. Zusammenfassung	90
Literatur	91

I. Einleitung

Ein Tumor ist eine Geschwulst, die durch abnormale, lokale Zunahme eines Gewebes charakterisiert ist. Dieser Gewebezuwachs ist auf autonome, progressive und unkontrollierte Proliferation körpereigener Zellen zurückzuführen, die auch bei Ausbleiben von auslösenden Reizen für die Zellteilung weiterwachsen (*Zurborn et al., 1985*). In der Medizin wird zwischen zwei Arten von Tumoren unterschieden: benigne (gutartige) und maligne (bösartige) Tumoren (*Bichner et al., 1991*). Im Gegensatz zu benignen Tumoren, die keine Metastasen bilden und selbst ohne Behandlung für den Patienten nicht mortal sind, charakterisieren sich die malignen Tumore durch ihr invasives Wachstum und häufige Metastasierung, die ohne Behandlung der krankhaften Geschwulst fast ausschließlich zum Tod des Patienten führen. Zu den bösartigen Tumoren zählen Karzinome und Sarkome (*Gorstein et al., 1991*). Während der Ausgangspunkt eines Karzinoms auf die Transformation von Epithelzellen zurückzuführen ist, sind Sarkome hingegen von mesenchyalem Gewebe ausgehende maligne Tumore.

I. 1. Onkogene und Tumorsuppressorgene (TSGs)

Die Initiation eines Karzinoms ist auf einen vielschichtigen Prozess innerhalb der Zellen zurückzuführen, deren Ursprung in Veränderungen des genetischen Materials liegt (*Bishop et al., 1987*), z.B. DNA-Methylierung, Missensemutationen und Insertionen/Deletionen. Diese Aberrationen im genetischen Material werden begünstigt durch:

- äußere Faktoren: - physikalische (UV-Strahlung)
 - chemische (karzinogene Substanzen, z.B.: Benzol)
- innere Faktoren: - metabolische Anomalien
 - hormonelle Einflüsse (z.B. erhöhte Androgenproduktion)
 - hereditäre Veranlagung.

Von diesen Einflüssen sind bei Karzinomen zumeist zwei Klassen von Genen betroffen, die in die Initiation und Progression eines Tumors involviert sind: *Onkogene* und *Tumorsuppressorgene* (TSG). Beide Gengruppen beeinflussen die Proliferation von Zellen und deren Teilung. Die an sich nicht pathogenen Protoonkogene werden durch eine Aktivierung zu Onkogenen, während TSG durch Inaktivierung, z.B. Mutation oder Deletion, ihre Funktion verlieren.

I. 1. 1 Onkogene

Mutationen in Protoonkogenen führen bei Aktivierung zum *Onkogen* und können somit den malignen Phänotyp aktiv beeinflussen. Die Wirkung von Onkogenen auf der zellulären Ebene ist dominant, d.h. eine veränderte Genkopie reicht aus für die Ausprägung des Merkmals. Viele Protoonkogene kodieren für Proteinkinasen, die andere Proteine phosphorylieren. Bei einer weiteren Proteinklasse handelt es sich um GTP-bindende und -spaltende G-Proteine, die intrazelluläre Prozesse regulieren. Daneben können Protoonkogene auch für Wachstums- bzw. Transkriptionsfaktoren oder Wachstumsfaktorrezeptoren kodieren. Das Ergebnis ist eine Zelle, die permanent im aktivierten Zustand verbleibt (*Dirks et al., 1999*).

Mechanismen der Aktivierung:

a) *Translokation*

Bei der Chronisch Myeloischen Leukämie (CML) führt eine reziproke Translokation zwischen Chromosom 22 und Chromosom 9 zur Entstehung des Philadelphia-Chromosoms (22q-). Dabei wird das *ABL*-Gen des Chromosoms 9q auf das Chromosom 22q und Teile des *BCR*-Gens von Chromosom 22q auf das Chromosom 9q verlagert. Die beiden Gene auf dem nun verkürzten Chromosom 22q- fusionieren (*BCR/ABL*-Gen). Während das normale *ABL*-Protein eine niedrige Tyrosinkinase-Aktivität besitzt, haben die Fusionsproteine (es entstehen verschiedene Proteine durch unterschiedliche Bruchpunkte auf dem Chromosom 22q-) eine erhöhte Kinase-Aktivität. Dies führt zu gesteigerter Teilung der betroffenen Zellen und letztlich zur Tumorgenese (*Nieborowska-Skorska et al., 2000*).

b) *Amplifikation*

Bei der Untersuchung an Neuroblastomen hat sich ein Zusammenhang zwischen der veränderten Expression von *N-MYC* und des Neuroblastomstadiums ergeben (*Garvin et al., 1990*). Patienten, die am Neuroblastom im Stadium I erkrankt waren, zeigten eine geringe Expression des *N-MYC*-Gens (12,5%), während Patienten im Stadium III oder IV eine erhöhte Expression des *N-MYC*-Gen aufwiesen (>50%), welche auf die Amplifikation des Gens zurückzuführen ist.

c) *Punktmutationen*

Eine weitere Fehlsteuerung von Genen kann durch Punktmutation eintreten. Beispielsweise wurde in kolorektalen Tumorzellen und Lungenkarzinomzellen eine bis zu 40% bzw. 50% höhere GTPase-Aktivität als bei nicht malignen Zellen der gleichen Art gemessen (*Lin et*

al., 2000). Ausgangspunkt hierfür ist eine Punktmutation in Kodon 60 vom *K-RAS*-Gen, was zur Folge hat, dass das Protein K-RAS verstärkt mit membrangebundenen G-Proteinen interagiert. Dies hat zur Folge, dass die GTPase-Aktivität erhöht und die unkontrollierte Zellproliferation eingeleitet wird.

I. 1. 2 Tumorsuppressorgene (TSGs)

Die Wirkungsweise der Tumorsuppressorgene (TSGs) ist prinzipiell verschieden von der der Protoonkogene: TSGs hemmen die Zellteilung und/oder –differenzierung.

Die Existenz von TSGs und deren Beteiligung in der Tumorgenese wurde von *Knudson et al.*, 1971 durch statistische Untersuchungen von Patienten mit Retinoblastomen beschrieben. Das Retinoblastom ist ein von der undifferenzierten Retina (Netzhaut) ausgehender Tumor des Säuglings- und frühen Kindesalters in einem oder beiden Augen. *Goodrich et al.*, 1990 konnte Knudsons Theorie bestätigen, wonach der Verlust beider Allele des Retinoblastom-Gens (*RB*-Gen), welches auf dem langen Arm des Chromosoms 13 (13q14.1–13q14.2) liegt, zum Auftreten des Tumors führte. Demzufolge sind TSGs in ihrer Wirkung rezessiv, d.h., dass beide Allele eines TSG inaktiviert sein müssen, um zu der neoplastischen Transformation einer Zelle beizutragen. Die Modifizierungen, die zur Inaktivierung beider Allele führen, sind a) Punktmutation und/oder Deletionen der Allele, b) die Methylierung der CpG-Region im Promotor beider Allele und dadurch der Verlust der Expression oder c) eine Kombination beider Ereignisse (*Jones et al.*, 1999). Die Beobachtung von *Jones et al.*, 1999 wird durch *Batova et al.*, 1997 bestätigt, wonach TSG durch Methylierungen inaktiviert werden können. Der Grund für die fehlerhafte Methylierung der DNA während der Tumorgenese ist noch nicht genauer geklärt. Möglich wäre eine Fehlfunktion der DNA-Methyltransferasen, wonach neu synthetisierte DNA-Stränge methyliert werden, obwohl die parentalen Stränge keine Methylierungen aufweisen. Eine weitere Möglichkeit wäre darauf zurückzuführen, dass Proteine, die das Genom vor Methylierungen schützen sollen, nicht mehr vorhanden sind und dadurch eine fehlerhafte Methylierung der DNA erfolgt (*Jones et al.*, 1999). Zusätzlich zum Defekt eines TSG müssen jedoch noch weitere Mutationen in Onkogenen in der gleichen Zelle stattfinden, um eine unkontrollierte Proliferation zu ermöglichen (*Knudson et al.*, 1972).

I. 2 Aberrationen im Genom

I. 2. 1 LOH (Loss of Heterozygosity)

Wie schon zuvor erwähnt, kann durch Inaktivierung von TSG die Tumorgenese eingeleitet werden. Die Deletion eines Allels eines TSG kann ein Mechanismus der Inaktivierung sein, deshalb kann der Verlust von genomischen DNA-Segmenten auf die Lokalisation eines TSG im Genom hinweisen. Der Verlust von DNA-Segmenten wird als LOH bezeichnet.

Mit Hilfe von polymorphen Markern können in LOH-Analysen Loci von TSGs in Tumorzellen eingegrenzt und/oder bestimmt werden. Polymorphe Marker sind Mikrosatelliten mit 10-50-fachen Nukleotidsequenzwiederholungen (CA bzw. TG-Wiederholungen), die im nicht kodierenden und kodierenden Bereich der DNA vorkommen, und deren Länge von Mensch zu Mensch und im Genom zwischen den homologen Chromosomen variieren kann.

Der Verlust des zweiten Allels eines TSGs kann durch verschiedene Mechanismen entstehen (Abb. 1.1):

- A) Verlust eines ganzen Chromosoms durch die fehlerhafte Segregation der Chromosomen in der Anaphase (mitotische Non-disjunction) (*Nigro et al., 1989*),
- B) Verlust eines ganzen Chromosoms in der Anaphase und Reduplikation des vorhandenen Chromosoms innerhalb der monosomischen Tochterzelle, wodurch das defekte Allel des TSG dupliziert wird (*Thiagalingam et al., 2001*),
- C) Rekombination homologer chromosomaler Bereiche während der Mitose (*de Nooij-van Dalen et al., 1998*),
- D) Deletion des Wildtyp-Allels durch einen Doppelstrangbruch (*Varella-Garcia et al., 1998*),
- E) Pathogene Punktmutation/Methylierung des homologen Wildtyp-Allels.

*Mechanismen zur Inaktivierung der zweiten Kopie
eines Tumor-Suppressorgens (TSG)*

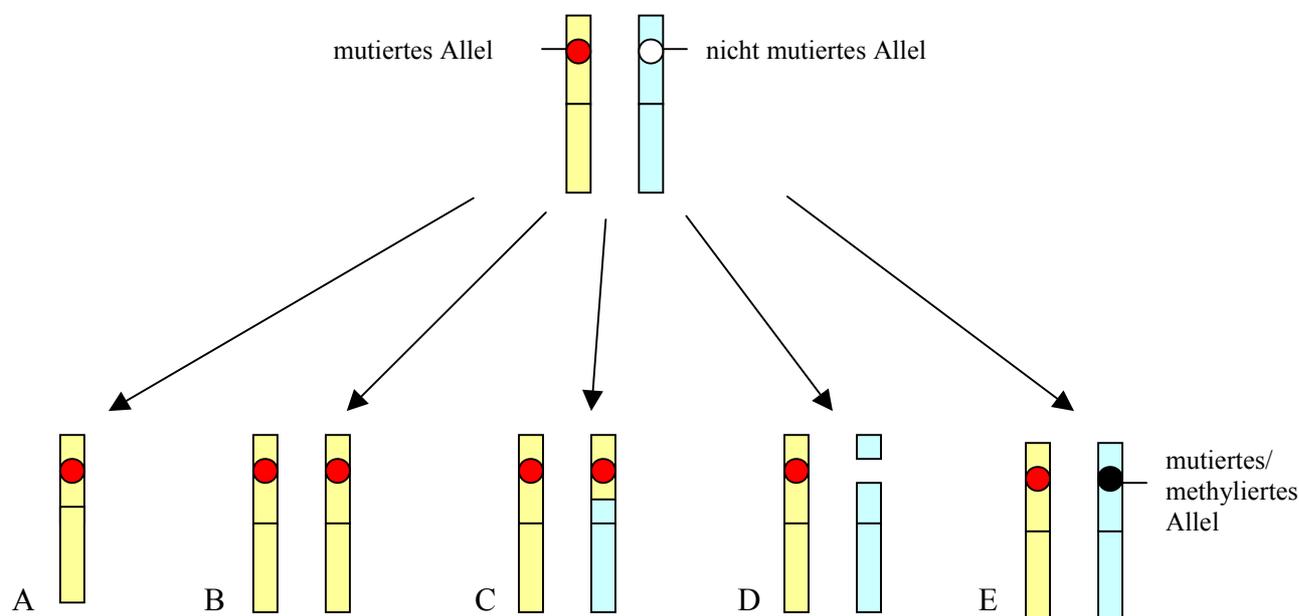


Abb. 1.1: Ereignisse, die zum Verlust eines homologen Allels führen können (im Text beschrieben).

I. 2. 2 Defekte in DNA-Reparaturgenen

Polymorphe Regionen in TSGs können von Modifikationen betroffen sein, welche wiederum zur Inaktivierung der Gene beitragen können (Nupponen *et al.*, 1998).

Die Veränderung der Längen der CA-Wiederholungs-Marker resultiert vermutlich auf fehlerhafte DNA-Replikationen des neu synthetisierten DNA-Stranges durch die DNA-Polymerase (DNA polymerase slippage). Wird dieser Fehler von der 5'-3'-Korrekturlese (proofreading)-Einheit der DNA-Polymerase nicht erkannt, entsteht eine Fehlpaarung (mismatch). Falls die Sequenzwiederholungen im kodierenden Bereich eines Gens liegen, kann die Längenveränderung mutagen sein. Fehlpaarungen werden normalerweise von DNA-Reparatursystemen („DNA mismatch repair“ (MMR)-Systems) in einem post-replikativen Prozess korrigiert und somit die Stabilität des Genoms bewahrt (Karren *et al.*, 1994). In diesem Reparatursystem sind mindestens fünf MMR-Gene involviert: *hMLH1*, *hMSH2*, *hMSH3*, *hMSH6*, und *hPMS2*.

Fehler im Reparatursystem können entweder zu einer Verlängerung oder Verkürzung der Mikrosatellitensequenz führen, was als Mikrosatelliten-Instabilität (MSI) bezeichnet wird.

MSI wurde zuerst in Tumoren von HNPCC (hereditary nonpolyposis colorectal cancer)-Patienten detektiert (*Aaltonen et al., 1993*), sie wurde jedoch auch bei Prostatakarzinomen und anderen Tumoren nachgewiesen (*Rohrbach et al., 1999*).

Kommt es zu Replikationsfehlern, binden zunächst zwei Enzyme des DNA-Reparatursystems, hMSH2 und hMSH6, die zuvor ein Heterodimer bilden, an einzelne Nukleotide oder an Nukleotidschleifen im neu synthetisierten Strang. Nukleotidschleifen entstehen durch die fehlerhafte Replikation repetitiver Mononukleotidsequenzen (wie A_n, CA, etc.). Unterstützt durch zwei weitere MMR-Proteine hMLH1 und hPMS2, die an das hMSH2/hMSH6-Heterodimer an der Fehlpaarung binden, kann die Fehlpaarung in der dsDNA ausgeschnitten und repariert werden.

Defekte im „mismatch repair“-System führen zu MSI. Die Ursache ist die Bildung eines hMSH2/hMSH3-Komplexes anstelle des hMSH2/hMSH6-Heterodimers (*Karran et al., 1994*). Zwar binden hMLH1 und hPMS2 ebenfalls das hMSH2/hMSH3-Dimer, jedoch wird der mutierte DNA-Teilabschnitt nicht repariert und dadurch die Fehlpaarung in das Genom durch Deletion bzw. Insertion integriert. Bei Analysen der CA-Wiederholungs-Marker, z.B. auf einem Polyacrylamid (PAA)-Gel sind zusätzlich zu den Hauptbanden der amplifizierten Allele weitere Banden zu erkennen (Abb. 1.2).

*Schematische Darstellung eines LOH und einer MSI
anhand eines heterozygoten Markers*

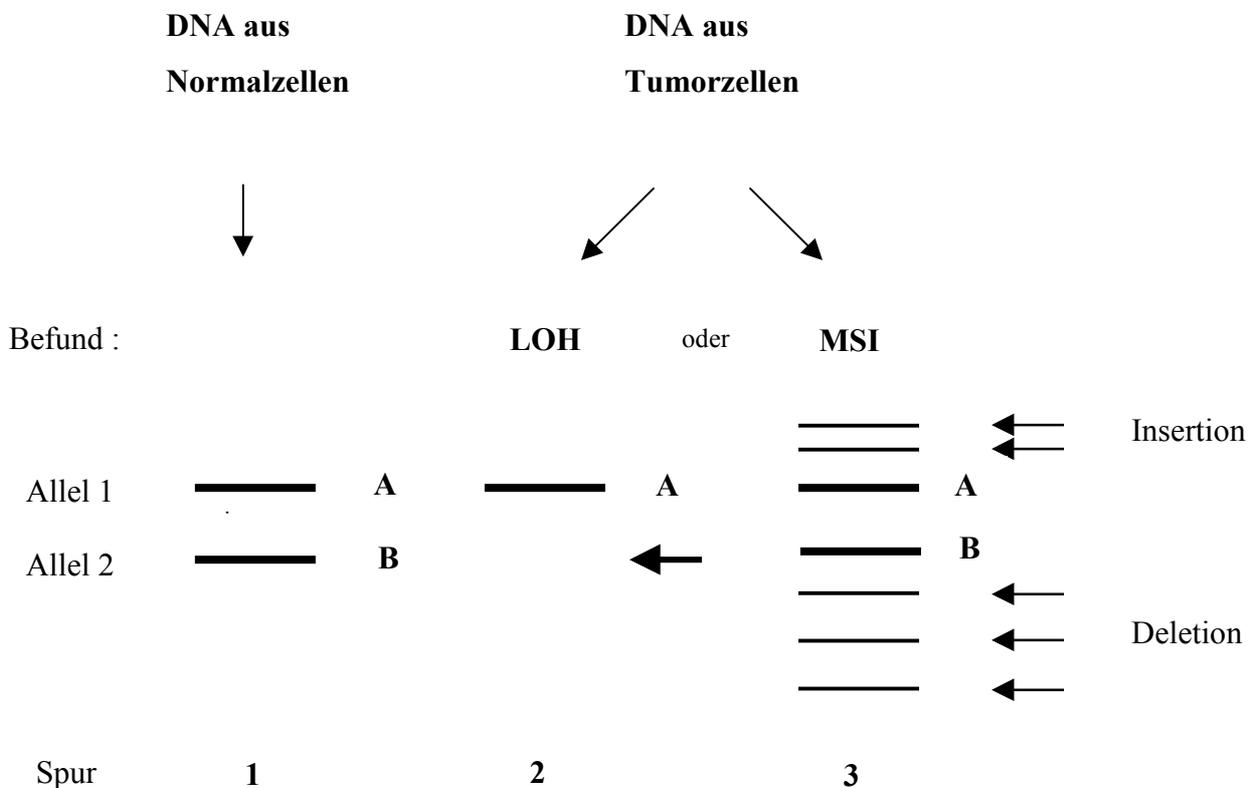


Abb. 1.2: Schematische Darstellung eines heterozygoten Markers aus DNA von Normalzellen (Spur1) und DNA aus Tumorzellen (Spur 2 und 3). In Spur 1 sind zwei Banden beider Allele zu erkennen, die mit A und B gekennzeichnet sind. In Spur 2 ist in Tumorzellen nur ein Allel detektiert worden, dicker Pfeil (LOH, Spur 2). Spur 3 MSI, die durch zahlreiche zusätzliche Banden zu den beiden normalen Allelen (Insertionen und Deletionen) gekennzeichnet ist.

I. 3 Das Prostatakarzinom

I. 3. 1 Die Prostata

Die Aufgabe der Vorsteherdrüse (Prostata) besteht in der Produktion und Sekretion eines leicht alkalischen Prostatasekrets (pH 7,4-7,8) bei der Ejakulation. Durch dieses Sekret, bestehend aus Phosphatasen und Spermidin, wird in einer alkalischen Reaktion eine erhöhte Beweglichkeit der Samenzellen ermöglicht.

Die kastanienförmige Vorsteherdrüse ist 3x5cm groß und an der Basis der Harnblase lokalisiert (Abb. 1.3). Mit zwei Untereinheiten, einem hinteren Mittellappen und einem vorderen Verbindungsstück, umgibt die Prostata fast 3cm der Harnröhre. Die beiden

Untereinheiten des Organs bestehen aus insgesamt 30–50 einzelnen Prostatadrüsen oder Läppchen, die in ein Maschenwerk zahlreicher glatter Muskelfasern, dem sogenannten Muskelschwamm, eingelagert sind.

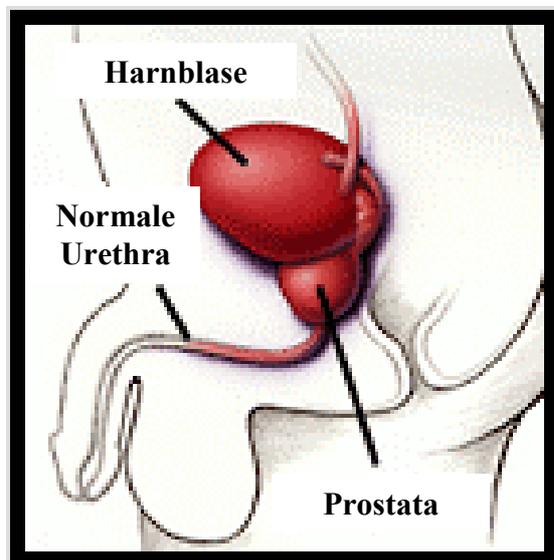


Abb.1.3 Lage der Prostata im Unterleib (aus www.rxabbott.com/ph/ph006.htm).

I. 3. 2 Das Prostatakarzinom

Inzidenzrate

Das Prostatakarzinom ist mit einer Inzidenzrate (Anzahl der Neuerkrankungsfälle einer bestimmten Erkrankung innerhalb eines bestimmten Zeitraumes) von 30% die häufigste maligne Neoplasie der westlichen Welt (*Hsing et al., 2000*), bezogen auf die Anzahl der männlichen Krebserkrankungen ist jedoch die Mortalitätsrate, nach dem Bronchialkarzinom, mit 3,5% die zweithäufigste (*Sato et al., 1999*). Folglich sterben nicht alle Patienten mit einem Prostatakarzinom an ihrer Krankheit. Ein maligner Tumor in der Prostata wird selten vor dem 50. Lebensjahr diagnostiziert, die Inzidenz steigt mit zunehmendem Alter an (bis zum 70. Lebensjahr auf 30-40%) (*Stamey et al., 1992*).

Klassifizierung

Die Klassifizierung der Prostatakarzinome richtet sich nach dem maligne entarteten Gewebeanteil der Prostata. So sind 98% der Prostatakarzinome Adenokarzinome. Die restlichen 2% entfallen auf seltene Karzinome wie muzinöses und intraduktal-papilläres Karzinom, Karzinoid und kleinzelliges Karzinom, Transitionalkarzinom, adenoid-zystisches Karzinom und Plattenepithelkarzinom (*Roth et al., 1999*).

Initiation und Proliferation

Die Funktion der Drüsenzellen der Prostata wird unter dem Einfluss des Geschlechtshormons *Testosteron*, einem *Androgen*, reguliert. Androgene können starke Tumor-Promotoren sein, da sie über membrangebundene *Androgenrezeptoren (AR)* die Zellteilung und das endogene und exogene Wachstum des Karzinoms begünstigen können (*Borg et al., 2001*). Die Initiation und Proliferation des Prostatakarzinoms geht von dem Epithelgewebe exokriner Drüsen aus (daher die Bezeichnung *Adenokarzinom*). Die Progression des malignen Tumors erfolgt zunächst innerhalb der Prostata, und zu einem späteren Zeitpunkt kann eine Infiltration in das Beckenbindegewebe möglich sein (Abb. 1.4–1.6). Die Metastasierung des Karzinoms erfolgt entweder lymphogen in die Lymphknoten oder hämatogen vor allem in Knochen (Abb. 1.7).

Schematische Darstellung der Tumorgnese des Prostatakarzinoms

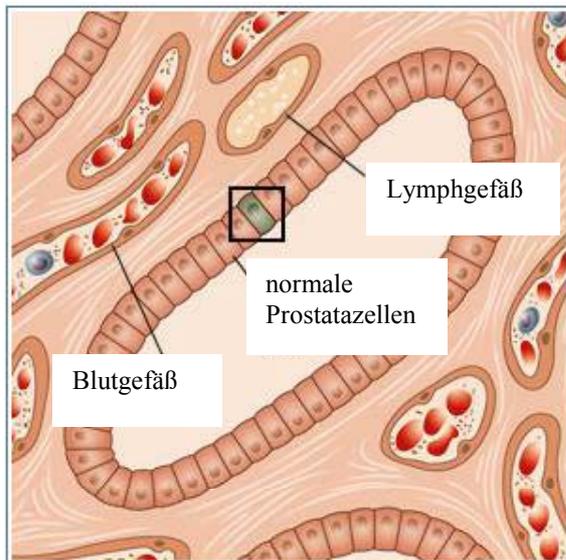


Abb.1.4: Prostata mit normalen, nicht malignen Epithelzellen (normale Prostatazellen).

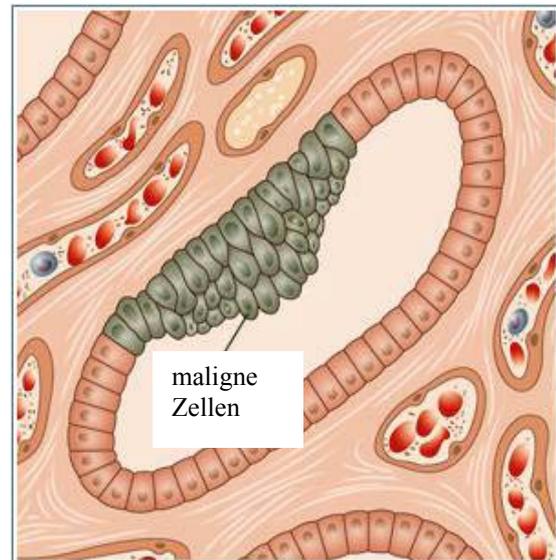


Abb.1.5: Maligne Epithelzellen

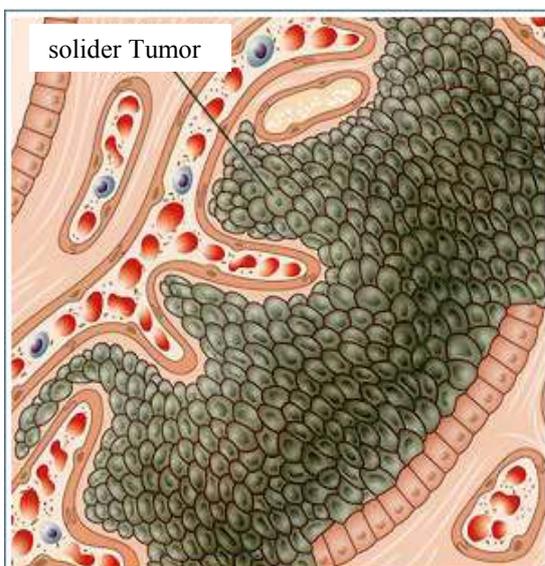


Abb.1.6: Die Prostata ist vollkommen mit malignen Tumorzellen ausgefüllt.

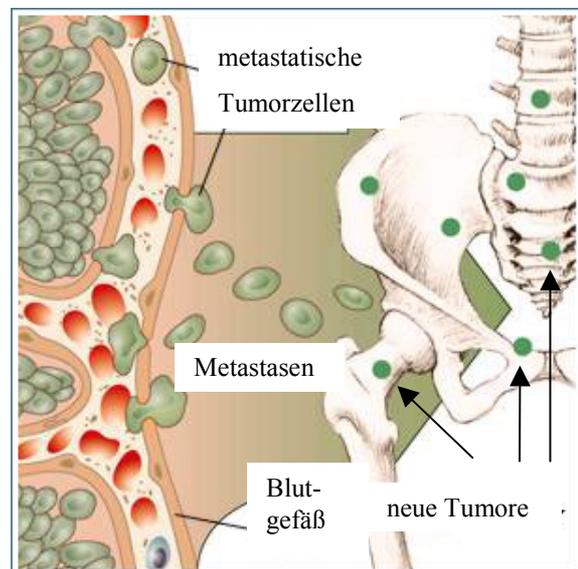


Abb.1.7: Metastasierung des Prostatakarzinoms in das Beckenbindegewebe und das Knochenmark.

(aus www.capcure.org/Abt Prostate/descprostate.asp?mainid=3&subid=3¶m=abtprostate)

1.4 Die Klinik

Die wichtigste diagnostische Maßnahme zur Früherkennung des Prostatakarzinoms ist neben der rektalen Palpation die Bestimmung des prostataspezifischen Antigens (PSA) sowie transrektale Sonographie. Es entstehen 75% der Prostatakarzinome im hinteren Prostatalappen (Norberg *et al.*, 1994). Fast alle Karzinome wachsen in der äußeren Zone der Prostata (Rindenzone, subkapsuläre Lage), ein geringer Teil sowohl in der äußeren als auch in der inneren Zone (periurethrales Gebiet). Dabei handelt es sich meistens um fortgeschrittene Tumoren, die von der subkapsulären Zone an die Urethra vorgewachsen sind. Äußerst selten liegen Karzinome ausschließlich im periurethralen Bereich. Die rektale Palpation ist Bestandteil der Vorsorgeuntersuchung des über 45 Jahre alten Mannes. Jede Verhärtung, abgrenzbarer Knoten oder höckrige Oberfläche bedarf der Abklärung mittels Stanz- oder Saugbiopsie (Treffsicherheit ca. 90%). Es gibt vier Manifestationsformen des Prostatakarzinoms:

- a) Das *klinisch manifeste Prostatakarzinom* wird durch klinische Untersuchung mit nachfolgender histologischer Sicherung entdeckt.
- b) Als *latentes Prostatakarzinom* wird ein Krebs bezeichnet, der erst bei der Autopsie entdeckt wird.
- c) Unter einem *inzidenten Karzinom* versteht man einen zufällig im bioptischen Material entdeckten Prostatakrebs bei klinisch unverdächtiger Prostata.
- d) Von einem *okkulten Prostatakarzinom* spricht man, wenn beim Patienten zuerst eine Metastase bei zunächst noch unbekanntem Primärtumor festgestellt wird.

Der wichtigste organspezifische Laborparameter ist das PSA (McCarthy *et al.*, 2001). Es gilt als Tumormarker und dient der Verlaufsbeobachtung unter der Therapie. Die Therapie des Prostatakarzinoms richtet sich nach Stadium und Ausbreitung des Tumors. Je nachdem, ob ein kurativer (heilender) oder palliativer Ansatz gewählt wird, besteht die Therapie aus radikaler Prostatektomie, Radiotherapie, Hormonentzug oder/und Chemotherapie. Ist der Tumor auf die Prostata beschränkt und wird eine radikale Prostatektomie durchgeführt, beträgt die Überlebensrate, je nach pathologischem Stadium, 85% bei allen untersuchten Personen. Bei Metastasierung sinkt die Überlebensrate auf ca. 20%. Durch die Beobachtung des PSA-Wertes kann bei einem erneuten Anstieg ein Rezidiv erkannt und dementsprechend behandelt werden. Aus u.a. diesem Grund ist die Lethalität um etwa ein Drittel niedriger als die Inzidenz. Um die hohen Kosten der falschen Behandlungsmethoden zu senken, ist es

wichtig die molekulargenetischen Ursachen zu Erforschen, um dann den Defekt direkt behandeln zu können. Deshalb konzentriert sich die moderne Krebsforschung auf die Identifizierung der Gene, die durch Aktivierung oder Inaktivierung das Tumorstadium auslösen und vorantreiben. Wenn diese Gene ausreichend biochemisch charakterisiert sind, ist es möglich neue Arzneimittel zu entwickeln, die spezifisch am Ort des Geschehens wirken und den Gendefekt beseitigen. Ein Beispiel hierfür ist der monoklonale Antikörper Herceptin, welcher bei einer speziellen Art von Brustkrebstumoren angewendet wird. Diese Tumoren tragen HER2-Rezeptoren (human epidermal growth factor receptor 2) für Wachstumshormone auf der Zelloberfläche. Herceptin ist in der Lage, sich an diese Proteine anzulagern und somit die Bindungsstellen für den Liganden, der für die Zellproliferation benötigt wird, zu blockieren. Da auch Metastasen diese HER2-Rezeptoren tragen können, ist der Antikörper auch bei metastasierten Tumoren einsetzbar. Besonders wirksam ist Herceptin in Verbindung mit einer Chemotherapie. Während eine alleinige Behandlung mit Herceptin nur bei 14% der Patienten wirksam ist, konnte bei einer gleichzeitigen Behandlung mit den Chemotherapeutika Cyclophosphamid und Doxorubicin eine Wirksamkeit von 50% erreicht werden (<http://www.nci.nih.gov/clinicaltrials/developments/qa-herceptin0700>).

1.5 Die Pathologie

Das Prostatakarzinom ist in den meisten Fällen heterogen und polyklonal. *Qian et al., 1995* postulierte in seiner Arbeit, dass die malignen Foci, die in Prostatakarzinomen detektiert wurden, unterschiedliche Stadien und Malignitätsgrade aufweisen. Die Initiation und Progression des Tumors in den malignen Foci ging vermutlich jeweils von verschiedenen chromosomalen Aberrationen aus. Des Weiteren sind neben den malignen Foci in einem soliden Prostatakarzinom normale Drüsen lokalisiert. Bei anderen soliden Karzinomen, wie z.B. dem Nierenkarzinom, besteht der Tumor ausschließlich aus Tumorzellen (*Jenkins et al., 1997*). Die histologische und genetische Heterogenität des Prostatakarzinoms erschwert die Bestimmung der klinischen und pathologischen Stadien und die Analyse der molekularen Veränderungen, weshalb eine konkrete Prognose über die Progression der Krankheit nicht in allen Fällen möglich ist. (*Gittes et al., 1991; Gleason et al., 1992*).

1.6 Gradierung und Bestimmung der Stadien eines Prostatakarzinoms

Die Gradierung und Bestimmung der Stadien eines Prostatakarzinoms wird mit Hilfe von Hämatoxylin/Eosin (HE) gefärbten Schnittpräparaten erstellt.

1. 6. 1 Bestimmung und histologische Gradierung nach *Gleason et al., 1966*

Mit Hilfe eines histologischen Gradierungssystems nach *Gleason et al., 1966* können Prostata–Adenokarzinome an HE gefärbten Schnittpräparaten differenziert werden. Die Bestimmung der Differenzierungsgrade der Tumoreale basiert auf den Beobachtungen der *Morphologie* der Drüsen zueinander und der Beziehung zwischen den malignen Drüsen und dem Stroma, durch die festgestellt werden kann, wie weit die Progression des Tumors fortgeschritten ist.

Hierbei sind von Bedeutung (*Gleason et al., 1966*):

1. die Form und Größe der Drüsen und das Drüsenmuster;
2. die Struktur der Zellen und deren Größe;
3. der Vergleich der Tumorzellen in den betreffenden Drüsen und dem umgebenden Stroma.

Anhand dieser Kriterien können fünf histologische Wachstumsmuster des Karzinoms unterschieden werden, die von *Gleason et al., 1966* mit 1 bis 5 bezeichnet wurden (Abb. 1.8).

- Muster 1: kleine uniforme, hoch differenzierte Drüsen;
- Muster 2: ähnlich wie Muster 1 mit geringen Unterschieden in Größe und Form der Drüsen. Die Krebszellen sind lockerer in den Drüsen angeordnet;
- Muster 3: die Unregelmäßigkeit hinsichtlich Größe und Form der Drüsen hat zugenommen. Die Drüsen und einzelne Tumorzellen infiltrieren in das Stroma hinein;
- Muster 4: die Tumorzellen wachsen diffus ins Stroma hinein, jedoch können die einzelnen Drüsen noch differenziert werden;
- Muster 5: ein solides Karzinom, in dem die malignen Drüsen nicht zu differenzieren sind.

Um die genaue Gradierung des Karzinoms bestimmen zu können, werden die beiden am weitesten entwickelten Krankheitsherde, die in einem Schnittpräparat erkannt werden nach *Gleason* bewertet und addiert, so dass ein Produkt zwischen 2 und 10 erhalten wird. Diese Muster aus den beiden Mustern wird als der Gleason-Score bezeichnet.

Je kleiner der Wert ist, um so kleiner ist die Gradierung des Karzinoms: Karzinome bei denen die beiden am weitesten ausgeprägten Tumorregionen das Wachstumsmuster 1 haben, haben

ein Gleason-Score von 2 ($1+1=2$). Karzinome mit niedriger Gradierung (2-4) wachsen für gewöhnlich langsam und breiten sich wenig aus. Ein Gleason-Score von 5-7 entspricht einer mittelmäßigen Gradierung. Der klinische Verlauf dieser Karzinome ist besonders schwierig vorherzusehen, da bei einigen Patienten eine langsame und bei anderen auch eine schnelle Progression festzustellen ist.

Tumore mit einem Gleason-Score zwischen 8 und 10 wachsen für gewöhnlich schneller und breiten sich schneller aus, so dass diese Patienten eine schlechte klinische Prognose haben.

Histologischen Wachstumsmuster nach Gleason

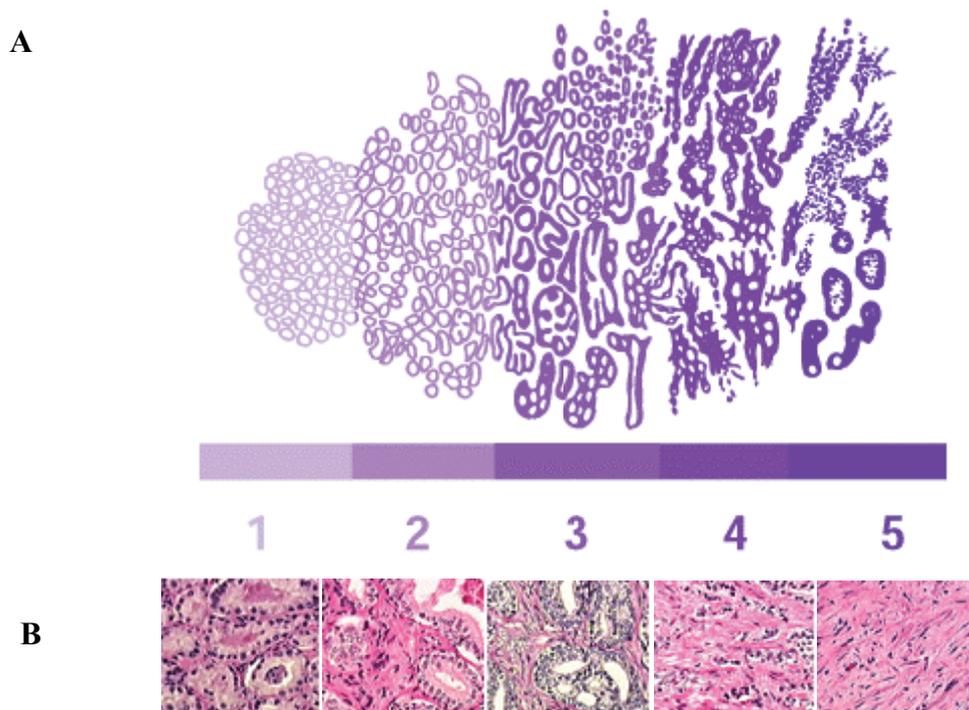


Abb. 1.8: Die schematische Darstellung (A) der Gleason-Muster 1-5 (phänotypisches Erscheinungsbild der Prostata Drüsen eines Prostatakarzinoms). In B sind entsprechend die H&E-gefärbten Präparate gezeigt (www.upmccancercenters.com/cancer/prostate/gradingsystems.html)

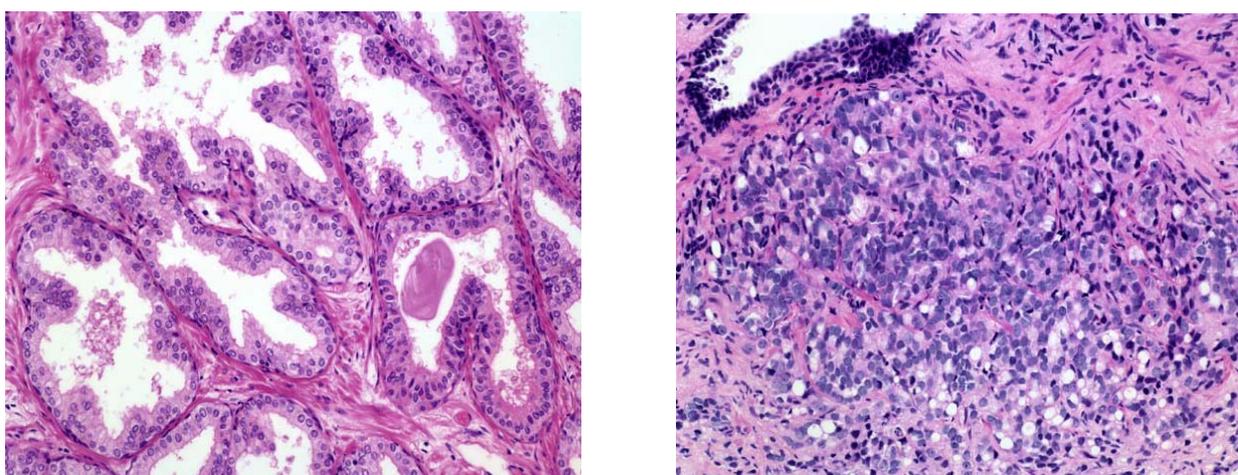


Abb 1.9: Vergleich gesunde (rechts) / maligne (links) Prostata Drüsen (T4).

(www.drbrandeis.com/prostate_histopathology.htm)

In Abb. 1.10 ist ein schematischer Querschnitt durch eine maligne Prostata dargestellt. Anhand der Heterogenität des Prostatakarzinoms können im Gewebe Tumorareale lokalisiert sein, deren Initiation und Proliferation von unterschiedlichen Abberationen (Deletionen/Insertionen) in verschiedenen chromosomalen Abschnitten abstammen. An diesem Beispiel wird deutlich, dass unterschiedliche Areale verschiedene Gleason-Score und genetische Veränderungen zeigen können (Heterogenität). Des weiteren wird gezeigt, dass Metastasen nicht notwendigerweise von größeren Tumorarealen mit den höchsten Gleason-Score entstammen.

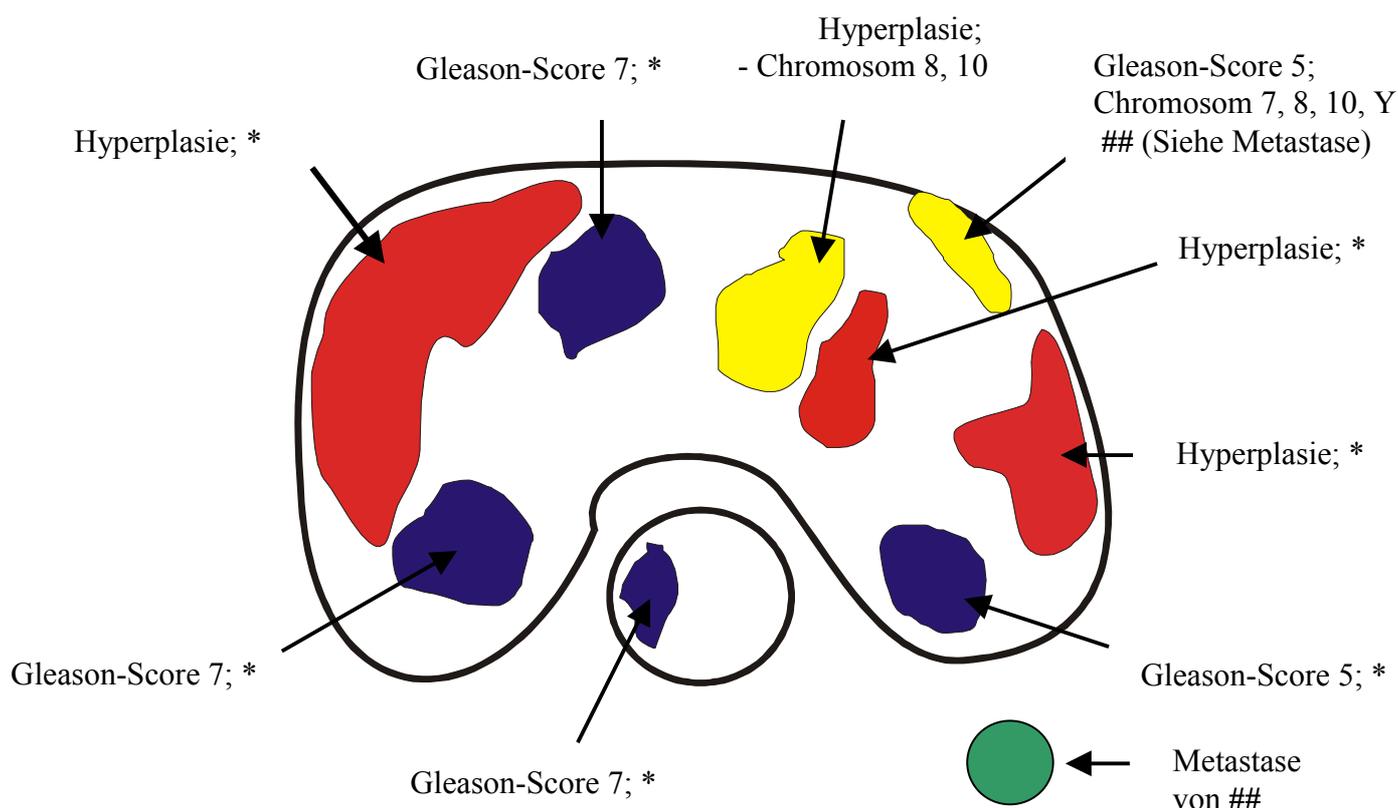


Abb. 1.10: Schematische Darstellung einer karzinomatösen Prostata im Querschnitt mit chromosomalen Veränderungen (modifiziert nach *Qian et al., 1995*). * = keine abnormale chromosomale Anomalien; - = Deletion des Chromosoms.

1. 6. 2 Stadien des Prostatakarzinoms

Neben der pathologischen Gradierung nach Gleason wird das lokale Ausbreitungsstadium des Prostatakarzinoms im Gewebe bestimmt. Das Prostatakarzinom wird in vier Stadien aufgeteilt, in lokalisierte (Stadium 1 und 2) und in das umgebende Gewebe verteilte (Stadium 3 und 4). Falls sich der Krebs in andere Bereiche des Körpers verteilt hat, handelt es sich um

ein sekundäres Prostatakarzinom (metastatisches Prostatakarzinom). Die Klassifizierung erfolgt mit den Buchstaben T₁–T₄ (*Dhom et al., 1975*):

- Stadium 0/T₁: liegt dann vor, wenn ein Prostatakarzinom klinisch nicht nachweisbar ist.
- Stadium T₁: ein isolierter Knoten in einem der Prostatalappen;
- Stadium T₂: ein oder beide Prostatalappen sind ohne Überschreiten der Organgrenze befallen;
- Stadium T₃: ein Karzinom, welches bereits die Organgrenze überschritten hat (*extraprostatistisches Tumorwachstum*);
- Stadium T₄: es liegen Metastasen vor.

T₁ und T₂ Tumore werden als frühe Prostatakarzinome bezeichnet, T₃ and T₄ Tumore als fortgeschrittene Prostatakarzinome.

1. 7 Formen des Prostatakarzinoms

Es wird zwischen der *sporadischen* und der *familiäre bzw. hereditäre* Form des Prostatakarzinoms differenziert (Abb.: 1.11). Diese Formen können mit Hilfe von Familienanamnesen erkannt werden, indes ist eine pathologische Unterscheidung nicht möglich.

Sporadisches Prostatakarzinom

Das sporadische Prostatakarzinom tritt einzeln auf, d.h. keine weitere Person in einer Familie ist davon betroffen. Es wird durch mehrere spontane Veränderungen des Genoms verursacht. Dies ist die häufigste Form des Prostatakarzinoms (74% aller Fälle; *Hanus et al., 1999*). Die Veränderungen des Genoms können epigenetisch (durch Methylierung der DNA) oder durch Missensemutationen und Insertionen/Deletionen in Protoonkogenen oder TSGs bedingt sein.

Hereditäres und familiäres Prostatakarzinom

Ein **hereditäres** Prostatakarzinom ist zunächst auf eine genetische Prädisposition zurückzuführen, die durch Stammbaumanalysen innerhalb eines Familienverbandes detektiert werden können.

Ein **hereditätes** Prostatakarzinom wird in ca. 5% aller untersuchten Fälle diagnostiziert (*Hanus et al., 1999*) und liegt vor, wenn ein maligner Tumor innerhalb einer Familie

1. in mindestens drei aufeinanderfolgenden Generationen
oder
2. bei zwei nahe verwandten Familienangehörigen vor dem 55. Lebensjahr auftritt.

Bei einem **familiären** Prostatakarzinom (Inzidenzrate ca. 21%; *Klein et al., 1999*) ist mehr als eine Person in einer Familie erkrankt, jedoch sind die Kriterien für ein hereditäres Prostatakarzinom nicht erfüllt (siehe oben). Dies kann auf gleiche Umwelt, der Ernährungsgewohnheiten in einer Familie oder auf Zufall (*Brawley et al., 1998*) beruhen.

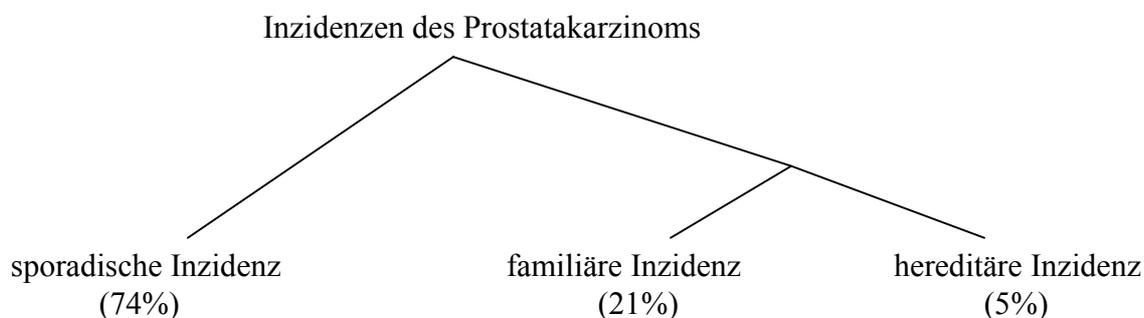


Abb.1.11: Prozentuale Verteilung der Prostatakarzinoms (nach *Hanus et al., 1999*).

1. 7. 1 Nachweis von LOH in 10q

Der Verlust von chromosomalen Regionen (LOH) auf dem langen Arm des Chromosoms 10 wurde bei Gliomen, malignen Melanomen und Harnblasenkarzinomen nachgewiesen (*Smeets et al., 1987*). *Gray RB et al., 1995* und *Trybus et al., 1996* gelang es, bei Prostatakarzinomen die Region auf dem langen Arm des Chromosoms 10 zwischen 10q23 und 10q26 einzugrenzen. Bestätigt wurde dieser Beobachtung durch Untersuchungen von *Gray IC et al., 1995* an drei Prostatakarzinomen von drei verschiedenen Patienten, bei denen Deletionen in der Region 10q23-26 auftraten. *Teng et al., 1997* zeigte in seiner Arbeit, dass in Prostatakarzinomen in bis zu 20% der zytogenetisch untersuchten Tumoren Deletionen in 10q23-26 gefunden worden sind.

Im gleichen Jahr wurde ein TSG, das in der untersuchten Region (10q23.3) lokalisiert und dessen Funktionsverlust an der Entstehung von Prostatakarzinomen beteiligt ist, entdeckt, *PTEN* (phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome ten) (*Li et al., 1997* und

Steck et al., 1997). Beim Vergleich des Tumor- mit Normalgewebe von 80 Patienten mit Prostatakarzinom, trat in 28 % der Fälle an diesem Locus LOH auf (*Cairns et al., 1997*). In weiteren Untersuchungen an Prostatakarzinomen stimmten die deletierten Regionen nicht mit dem Locus des *PTEN* Gens überein, so dass in 10q23-26 weitere TSG vermutet werden (*Maier et al., 1998*). Bei Untersuchungen an Patienten mit Glioblastom wurde distal von *PTEN* in der Region 10q25-26 ein weiteres TSG detektiert, *DMBT1* (Deleted in malignant brain tumors 1) (*Mollenhauer et al., 1997*). Hierbei handelt es sich um einen instabilen Locus, der auch in gesunden Zellen Deletionen aufweist, so dass ein Zusammenhang zwischen der Inaktivierung des *DMBT1* und der Tumorgenese der Prostata sehr unwahrscheinlich ist (*Takito et al., 1999*). Ein weiteres interessantes Gen ist *MXII* (MAX-interacting protein 1). *MXII* hemmt die Aktivität von MYC-Proteinen und könnte eine Tumorsuppressorfunktion ausüben. Diese Hypothese wurde zusätzlich durch den Nachweis von *MXII*- Mutationen in mehreren Prostatakarzinomen mit 10q-Deletionen unterstützt (*Prochownik et al., 1998*).

Leube et al., 2002 konnte mit LOH-Analysen von Prostatakarzinomen den Bereich für mögliche Loci von TSG von ca. 63cM in der Region 10q23-26 auf 5cM in 10q26, zwischen den Markern D10S209 und D10S587, reduzieren (Abb. 1.12). Die Eingrenzung der deletierten, chromosomalen Regionen erfolgt durch die kleinste gemeinsame Schnittmenge der Deletionen (SRO = *smallest region of overlap*) des untersuchten Genomabschnitts mit Hilfe von LOH-Analysen an Tumorgeweben von Prostatakarzinom-Patienten (Abb. 1.2). Diese Untersuchungen, sowie alle bis zum Beginn dieser Arbeit an DNA aus Tumorgewebe durchgeführten Untersuchungen, die nicht mikrodisektiert wurden, wurden mit einem DNA Gemisch aus gefrorenen Tumorproben durchgeführt.

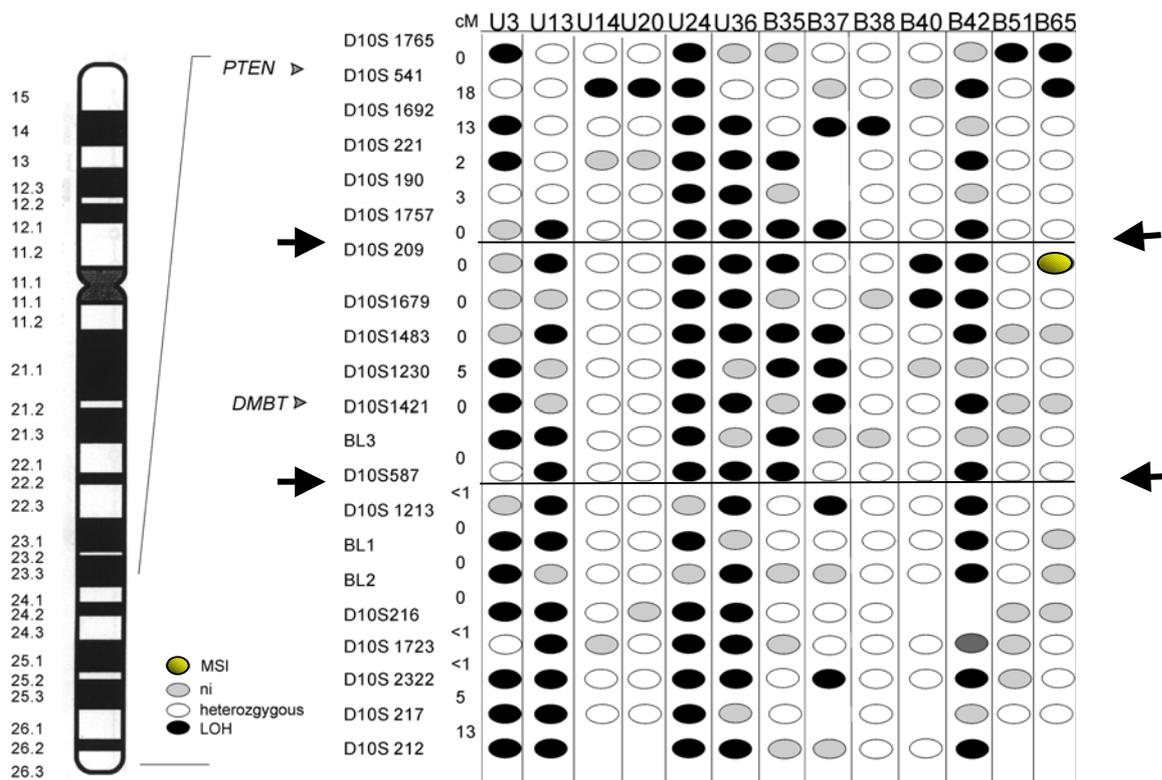


Abb. 1.12: Dargestellt sind die Ergebnisse der LOH-Analysen im langen Arm von Chromosoms 10 (links), die an 60 Prosatakarzinom-Patienten durchgeführt worden sind (aus *Leube et al., 2002*)., Nur bei 14 Patienten, die hier dargestellt sind (U3-B65) wurde ein LOH nachgewiesen. Für diese Analyse wurden 21 Marker (D10S1765-D10S212) in der Region 10q23-26 untersucht. In der Tabelle (rechts) sind die detektierten LOH mit einem ausgefüllten, schwarzen Oval dargestellt und nicht informative Ergebnisse (ni) mit einem grauen Oval. Weiße Ovale symbolisieren nicht deletierte Regionen. Links neben der Tabelle ist der Abstand zwischen den Markern in cM zum Zeitpunkt der Publikation (Ende 2001) angegeben.

I. 7. 2 Das hereditäre Prostatakarzinom

Seit den 60er Jahren ist bekannt, dass hereditäre Prädispositionen Ursache für das Prostatakarzinom sein können (*Woolf, 1960*). Anhand von Kopplungsanalysen wurden bis heute sechs Loci für Prostatakarzinom-Prädisposition detektiert (*Simard et al., 2002*):

Prädisposition	Lokalisation	Literatur
<i>HPC1</i>	1q24-25	Smith et al., 1996
<i>PCAP</i>	1q42.1–42.3	Berthon et al., 1998
<i>HPCX</i>	Xq27	Xu et al., 1998
<i>HPC20</i>	20q13.1–13.3	Barry et al., 2000
<i>CAPB</i>	1p36.1–36.3	Xu et al., 2001
8p22-23	8p22-23	Xu et al., 2001
<i>HPC2/ELAC2</i>	17p12	Tavtigian et al., 2001

Die Regionen konnten jeweils auf einen kleinen Bereich eingegrenzt werden, jedoch ist auch nach Vervollständigung des Genomprojekts bisher nur die Isolierung eines Prostatakarzinomgens beschrieben worden: *HPC1*.

Als *HPC1* wurde das *RNASEL* (Ribonuclease L)-Gen identifiziert. Dieses Gen kodiert für eine Komponente eines Interferon regulierenden Systems einer 2',5'-oligoisoadenierenden Synthese-Einheit einer Ribonuclease L. Keimbahnmutationen in diesem Gen scheinen mit einer erhöhten Wahrscheinlichkeit zur Initiation des Prostatakarzinoms zu korrelieren.

Tavtigian et al., 2001 konnten anhand von Kopplungsanalysen, die an 127 Prostatakarzinom-Risiko-Familien in Utah (USA) durchgeführt worden sind, in der Region 17p12 das Gen *HPC2/ELAC2* als mögliches Prostatakarzinom-Suszeptibilitäts-gen identifizieren. Diese Arbeitsgruppe fand zwei pathogene Mutationen in zwei Familien: in einer Familie wurde eine Leserastermutation detektiert (nonsense-Mutation), die zu einem Kettenabbruch führte, und in der zweiten Familie wurde ein nichtkonservativer Basenaustausch in Exon 17 des Gens *HPC2/ELAC2* festgestellt. Zusätzlich dazu wurden zwei Missensevariationen in Exon 7 und Exon 17 detektiert (*Rebbeck et al., 2000*). Nach den Studien von *Rebbeck et al., 2000* und *Tavtigian et al., 2001* besteht ein erhöhtes Risiko für Prostatakarzinom, wenn ein Ala541Thr-Polymorphismus in Exon 17 gekoppelt mit einem Ser217Leu-Polymorphismus in Exon 7 auftritt. Ein Zusammenhang zwischen einer erhöhten Inzidenz des Prostatakarzinoms und einem veränderten *HPC2/ELAC2*-Gen wurde durch eine Arbeit von *Xue et al., 2000* bestätigt,

wonach eine Kombination von Missensemutationen im *HPC2/ELAC2* und im *AR* (Androgenrezeptor)-Gen, in der Region Xq11.2-12, das Krebsrisiko um ein Fünffaches erhöht (*Xue et al., 2000* und *Nelson et al., 2002*). Diese Beobachtung ist von Bedeutung, da die Prostata ein androgenreguliertes Organ ist. Androgene, zu denen auch das Testosteron gehört, sind bekannt als starke Tumor-Promotoren, welche über membrangebundene Androgenrezeptoren (AR) die Zellteilung und das endogene und exogene Wachstum des Karzinoms begünstigen können (*Borg et al., 2001*).

1. 8 Zielsetzung der Arbeit

Im Rahmen dieser Dissertation sollten Tumorsuppressorgene (TSGs) identifiziert und ihre Relevanz für die Initiation und Progression des Prostatakarzinoms untersucht werden.

Die Aufgabe im ersten Teil dieser Arbeit war es, den deletierten Bereich zwischen den Markern D10S209 und D10S587 so weiter einzugrenzen, dass die Suche nach einem TSG aus dieser Region möglich wird. Für dieses Vorhaben, das noch vor der Beendigung des Humangenom-Projektes eingeleitet worden war, wurde paraffineingebettetes Tumormaterial verwendet, da in diesem Material Tumorregionen besser zu identifizieren waren als mit Gefrierewebe. Um die deletierte Regionen auf Chromosom 10 in den Prostatakarzinomen weiter einzugrenzen, sollten diese Tumoreareale, was vorher nicht praktiziert wurde, mikrodissektiert und die extrahierte DNA mit einer PEP (primer extension preamplification) präamplifiziert werden, da die gewonnene DNA-Menge aus den Tumorzellen nicht für viele spezifische PCR-Ansätze ausreichte.

Die weitere Eingrenzung der entsprechenden Region sollte mit neuen Markern, die mit Fortschreiten des Genomprojekts identifiziert werden konnten, fortgeführt werden. Falls bekannte Gene in dieser Region liegen, sollten diese auf Deletionen untersucht werden.

Im zweiten Teil wurde ein neues, während dieser Arbeit identifiziertes putatives Prostatakarzinom-Tumorsuppressorgen untersucht. Dafür wurden Restriktionsanalysen in Exon 7 und 17 des *HPC2/ELAC2*-Gens mit Blut-DNA-Proben von kaukasoiden Personen aus der Region Düsseldorf untersucht. Es sollte geklärt werden, ob die beschriebenen Polymorphismen in diesem Gen, auch in der europäischen Bevölkerung ein erhöhtes Risiko für des Prostatakarzinom bedingt.

II. Material und Methoden

II. 1 Material

Im Folgenden werden die Hersteller und Lieferanten der verwendeten Chemikalien und Apparaturen aufgeführt:

Arcturus (Mörfelden), Biozym (Hess. Oldendorf), Engelbrecht (Edermünde), Eppendorf (Hamburg), Euroimmun (Lübeck), Falcon (Oxnard, CA, USA), Gibco BRL/Life Technologies (Karlsruhe), Gilson (Langenfeld), Hermle (Wehingen), Invitrogen (Karlsruhe), Dr. Kleef (Bonn), Leica (Bensheim), Linde (München), MBI Fermentas (Vilnius, Litauen), Melitta (München), Merck (Darmstadt) MWG–Biotech (Ebersberg.), Neolus (Frankfurt a.M.), New England Biolab (Beverly, MD, USA), PE Applied Biosystems (Warrington, UK), Perkin Elmer (Boston, MA, USA), Pharmacia Fine Chemicals (Uppsala, Schweden), Roth (Karlsruhe), Schleicher & Schuell (Einbeck), Schott (Mainz), Shandon (Pittsburgh, PA, USA), Sigma (St Louis, MO, USA), und Zeiss (Jena).

II. 1.1 Chemikalien

CHEMIKALIEN	HERSTELLER/LIEFERANT
Agarose Seakem	Biozym, Gibco BRL/Life Technologies
Ammoniumacetat	Merck
Bromphenolblau	Merck
Borsäure	Sigma
Calciumchlorid	Merck
Chloroform	Roth
Dimethylformamid	Sigma
Dinatriumhydrogenphosphat	Merck
Dithiothreitol (DTT)	Gibco BRL/Life Technologies
Dodecylsulfat, Na-Salz	Sigma
Essigsäure	Merck
Ethanol	Merck
Ethidiumbromid	Merck
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Merck
Ficoll 400	Pharmacia Fine Chemicals
Glycerin, wasserfrei	Merck

CHEMIKALIE	HERSTELLER/LIEFERANT
Glycogen	Merck
Hämatoxylin	Shandon
Isopropanol	Merck
Magnesiumchlorid	Merck
Natriumacetat	Merck
Natriumcitrat	Sigma
Natriumchlorid	Merck
Natriumdihydrogenphosphat	Merck
Natriumhydroxidplättchen	Merck
dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)	Amersham Pharmacia
Phenol	Roth
Rinderserumalbumin (BSA)	Merck
Tris-HCl	Merck
Tween 20	Sigma
Xylol	Merck

II. 1.2 Enzyme

Die mikrodisezierten Tumorzellen wurden mit Proteinase K (Roche) lysiert.

Als Polymerasen wurden Taq DNA Polymerase (Invitrogen), Expand High Fidelity Polymerase (Roche), Hot Star Taq-Polymerase (Qiagen) und Advantage2PCR-System (Clontech) verwendet.

Für die Analyse des Restriktionsfragmentlängen-Polymorphismus (RFLP) des *HPC2/ELAC2*-Gens auf Chromosom 17 wurden die Restriktionsenzyme Fnu4HI und Taq α I (beide von *New England Biolab, Beverly, MA, USA*) benutzt. Allen Enzymen wurden folgende Agenzien mitgeliefert: 10x Reaktions – bzw. Restriktionspuffer, MgCl₂ (für die Polymerasen) und BSA (für Fnu4HI).

II. 1.3 DNA-Größenmarker für die Elektrophorese

Ready Load 1Kb DNA Ladder (Invitrogen)

Fragmentgrößen in Bp:

75/ 134/ 154/ 201/ 220/ 298/ 344/ 396/ 506, 517/ 1018/ 1636/ 2036/ 3054/ 4072/ 5090/ 6109/
7126/ 8144/ 9162/ 10180/ 11198/ 12216

pUC-Mix (MBI Fermentas)

Fragmentgrößen in Bp:

67/ 110/ 111/ 147/ 190/ 242/ 331/ 404/ 489/ 501/ 692/ 883/ 1116

II. 1.4 Oligonukleotide

Alle verwendeten Oligonukleotide wurden über die Firma MWG -Biotech bezogen.

II. 1.4.1 LOH-Analyse

I-PEP-Primer:

Für die unspezifische Präamplifikation des Genoms wird ein Mix von dN₁₅-Random-Primer aller möglichen Nucleotide verwendet.

Amplifikation der Mikrosatelliten

Die Primer zur Amplifikation der Mikrosatellitenmarker in Chromosom 8 und 10 wurden mit dem Fluoreszenzfarbstoff IRD 800 markiert.

Die verwendeten Mikrosatellitenmarker wurden aus der Literatur nach *Gyapay et al., 1994* (D10S 190-D10S 587), *Dib et al., 1996* (D10S 1656-D10S 1757) und *Wood et al., 1994* (D8S549).

Mikrosatellitenmarker auf Chromosom 8

Name	Sequenz	Größe des amplifizierten Produktes in Bp
D8S136	Sense: 5'-GCC CAA AGA GGA GAA TAA A-3' Antisense: 5'-CTG TTT CCA CAC CGA AGC-3'	398
D8S549	Sense: 5'-AAA TGA ATC TCT GAT TAG CCA AC-3' Antisense: 5'-TGA TTA GGT GAC ACT ATA-3'	368

Mikrosatellitenmarker auf Chromosom 10

Name	Sequenz	Größe des amplifizierten Produktes in Bp
D10S190	Sense: 5'- GTG TTT GGG TCA TGG AGA TG- 3' Antisense: 5'- AGG CAA AGC AGG AGC A- 3'	208
D10S201	Sense: 5'- AGC TCA TGG GAT GGA AGC AT- 3' Antisense: 5'- AGC TAA AAG GCT GCT GGA GA- 3'	294
D10S212	Sense: 5'- GAA GTA AAG CAA GTT CTA TCC ACG- 3' Antisense: 5'- TCTGTGTACGTTGAAAATCCC- 3'	194
D10S216	Sense: 5'- TGG CAG AGC CAT TTA ACT AC- 3' Antisense: 5'- AGC TGC TGG GGA ATA ATA TGC- 3'	210
D10S209	Sense: 5'- CAA ATG TGC TCA TAT CCT GC - 3' Antisense: 5'- CCC ATC AGT AGT AAA GGG GC - 3'	212
D10S217	Sense: 5'- CCA CGA TGC AGA GGT T- 3' Antisense: 5'- CCA GGT GGC TAG GAG G- 3'	199
D10S221	Sense: 5'- TTT TAG TGG CTT CTT ACT GAC C- 3' Antisense: 5'- GGA CCN TAA ATG TGA AAC CAA G- 3'	106
D10S541	Sense: 5'- AAG CAA GTG AAG TCT TAG AAC CAC C- 3' Antisense: 5'- CCA CAA GTA ACA GAA AGC CTG TCT C- 3'	272
D10S587	Sense: 5'- CCC AGA TTT CAT GGC TTT C - 3' Antisense: 5'- TTC TGC TGA CAC GGG C - 3'	179
D10S1483	Sense: 5'- GAG CCA TCC ACT TGA CTG GAA - 3' Antisense: 5'- TGT ATT CAT CGT TTA GCA GCC - 3'	158
D10S1656	Sense: 5'- AAG TGT TCA CAG CAA GTN GAA T- 3' Antisense: 5'- GAA ACA ACC ATC CTA GCA GAA- 3'	148
D10S1679	Sense: 5'- TGA GGC TTG TGC TGA TCT - 3' Antisense: 5'- AGT ATT TAC CCA TGA GGG TAC TAT A - 3'	207

Name	Sequenz	Größe des amplifizierten Produktes in Bp
D10S1692	Sense: 5'- GCT GAG ATT GTG CCA TTG- 3' Antisense: 5'- CCA GGA AAA GCC AGA TGT T- 3'	201
D10S1708	Sense: 5'- CCA TCC AGC CAA GTC AG- 3' Antisense: 5'- GCT ATA AAT ACA CAA ATG ACA CGC- 3'	100
D10S1723	Sense: 5'- GCC TTC ATT TGC ATA GGG- 3' Antisense: 5'- CAT GCT GAG ACC CAG TG- 3'	164
D10S1731	Sense: 5'- TAC TAG CAG GAC AAA TCA GAC- 3' Antisense: 5'- GTT TGT CCT AAC AGG TTG TG- 3'	181
D10S1757	Sense: 5'- ATT CCA TAT TGA ATA AGG CCA TC- 3' Antisense: 5'- AGT ATC TTT GCT TAG CAT TCC C- 3'	209

Mikrosatellitenmarker für den Intronbereich des Gen WDR11 der Region 10q26

WDR11a : 5' -ACA GGA GGA AGA GGA CTT- 3'

WDR11b : 5' -GTC CAA TAT CCT CGC ATA TG- 3'

II. 1.4.2 *HPC2/ELAC2*-Analyse

Für die Polymorphismusanalyse des *HPC2/ELAC2*-Gens wurden im Gegensatz zur LOH-Analyse unmarkierte Primer verwendet. Die Primerauswahl erfolgte nach *Tavtigian et al., 2000*.

Die verwendeten Primerpaare für die Detektion des *Ser217Leu*-Polymorphismus in Exon 7:

Primerpaar

Sequenz

m5B : 5'- GTT TTC CCA GTC ACG ACG CAT TCC CAT GTA TGA ACG TCT -3'

m5Q : 5'- AGG AAA CAG CTA TGA CCA TCT ACA AGC ATT ACA AGG CAG AG -3'

Die verwendeten Primerpaare für die Detektion des *Ala541Thr*-Polymorphismus in Exon 17:

Primerpaar

Sequenz

m15A : 5`- CCA GCC TTT GTG TAA GTC TAC -3`

m15RFLP.R`: 5`- CAG CTT TGT GGT CCA GCC CAA -3`

II. 1.5 Die verwendeten „Kits“

Die Blut-DNA wurde nach einer PCR-Amplifikation mit QIAquick PCR Purification Kit (*Qiagen*) gereinigt, bevor die Produkte für eine Sequenzierung mit dem „DNA Sequencing Kit Big DyeTM Termination RR Mix“ (*PE Applied Biosystems*) amplifiziert werden. Der DNA Sequencing Kit Big DyeTM Termination RR Mix besteht aus markierten Nukleotiden und Taq Polymerase.

II. 1.6 Verbrauchsmaterialien

MATERIAL	HERSTELLER/LIEFERANT
Blaukappröhrchen	Falcon
CapSure HS Caps	Arcturus
Deckgläser	Shandon
Eindeckelmedium	Euroimmun
Einwegkanülen (20Gx11/2)	Neolus
Einwegspritzen (1 ml)	Primo
Glaswaren	Schott
Haushaltsfolie	Melitta
Objektträger	Engelbrecht
Parafilm „M“	American Can Company
Plastik – Reaktionsgefäße (0,5 ml, 1 ml)	Eppendorf, Hamburg
Pipetten 20µl, 200 µl, 1000µl	Gilson,
Pipettenspitzen (20 µl, 200 µl, 1 ml)	Dr. Kleef
Pipettenspitzen gestopft (20 µl, 200 µl)	Biozym
Sterilfilter (0,45 µm Durchmesser)	Schleicher & Schuell
Stickstoff	Linde

II. 1.7 Die Geräte

Folgende zur Durchführung oder Dokumentation der Experimente wurden benutzt:

GERÄT	HERSTELLER/LIEFERANT
Automatisches Sequenziergerät	Licor
Hybridisierungsöfen	Biozym
PixCell® II LCM System	Arcturus
Phasenkontrast-/Durchlichtmikroskop	Zeiss
Schlittenmikrotom	Leica
Eppendorfcentrifuge (5415D)	Eppendorf
Kühlzentrifuge	Hermle
Tischzentrifuge (Z 200 M/H)	Hermle
MJ 200 Bioscience	MJ Bioscience
PE 9600 PCR Cycler	PE Applied Biosystems
PE 4700 PCR Cycler	PE Applied Biosystems

II. 1.8 Die Puffer und Lösungen

Alle Puffer und Lösungen wurden mit deionisiertem Wasser angesetzt. Einige Puffer wurden bei Bedarf autoklaviert.

LÖSUNG	ZUSAMMENSETZUNG
Blaumarker (Stop-Mix)	100mM EDTA (pH 8,0) 1% SDS 50% Glycerin 500µl Bromphenolblau-Lösung (gesättigt)
Bromphenolblau-Lösung (gesättigt)	200mg Bromphenolblau in 10ml Wasser lösen
EDTA	0,5M, pH 8,0 (NaOH)
Ethidiumbromid-Stammlösung	10mg/ml in ddH ₂ O
Ficoll-Ladepuffer (5 x) für das PAA-Gel	25% Ficoll 400 25mM EDTA 0,1% Bromphenolblau

LÖSUNG	ZUSAMMENSETZUNG
Lösung A (Silberfärbung)	10% Ethanol 0,5% Eisessig
Lösung B (Silberfärbung)	0,1% AgNO ₃
Lösung C (Silberfärbung)	1,5% NaOH 0,01% NaBH ₄ 0,015% Formaldehyd (37 %)
Lösung D (Silberfärbung)	0,75% NaCO ₃
Natriumacetat pH 5.2	3M Natriumacetat
PBS (10 x)	800mM Na ₂ HPO ₄ 200mM NaH ₂ PO ₄ 1M NaCl, pH 7,5
Proteinase K - Stammlösung	20mg/ml in H ₂ O
Standard DNA - Extraktionspuffer	10mM Tris-HCl, pH 7,8 5mM EDTA 0,5% SDS 4 mg/ml Proteinase K aus Stammlösung
SSC (20 x)	3M NaCl 0,3M NaCitrat, pH 7,0
TE (pH 7,5)	10mM Tris-HCl, pH 8,0 1mM EDTA
TAE (50 x), pH 7,0	3M Tris-Base 5,71% Eisessig (v/v) 50mM EDTA
TBE (10 x), pH 8,3 – 8,9	0,89M Tris-Base 0,89M Borsäure 25mM EDTA

II. 2 Methoden

II. 2.1 LOH-Analyse

Mit Hilfe von LOH-Analysen können sporadische Deletionen in extrahierter DNA detektiert werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurden Prostatakarzinomzellen aus Paraffinpräparaten isoliert und DNA extrahiert. Die extrahierte DNA-Menge reichte zumeist nicht aus, um mehrere PCR-Reaktionen ansetzen zu können (*Dietmaier et al., 1999*). Mit Hilfe einer *improved-primerextension preamplification* (I-PEP) wurde das extrahierte Material zunächst linear präamplifiziert, bevor mit speziellen Primern, über PCR, polymorphe Marker in der Region 10q26 amplifiziert wurde. Die LOH-Analyse erfolgte abschließend auf einem Polyacrylamid (PAA)-Gel.

In Abb. 2.1 ist der Verlauf der LOH-Analyse schematisch dargestellt:

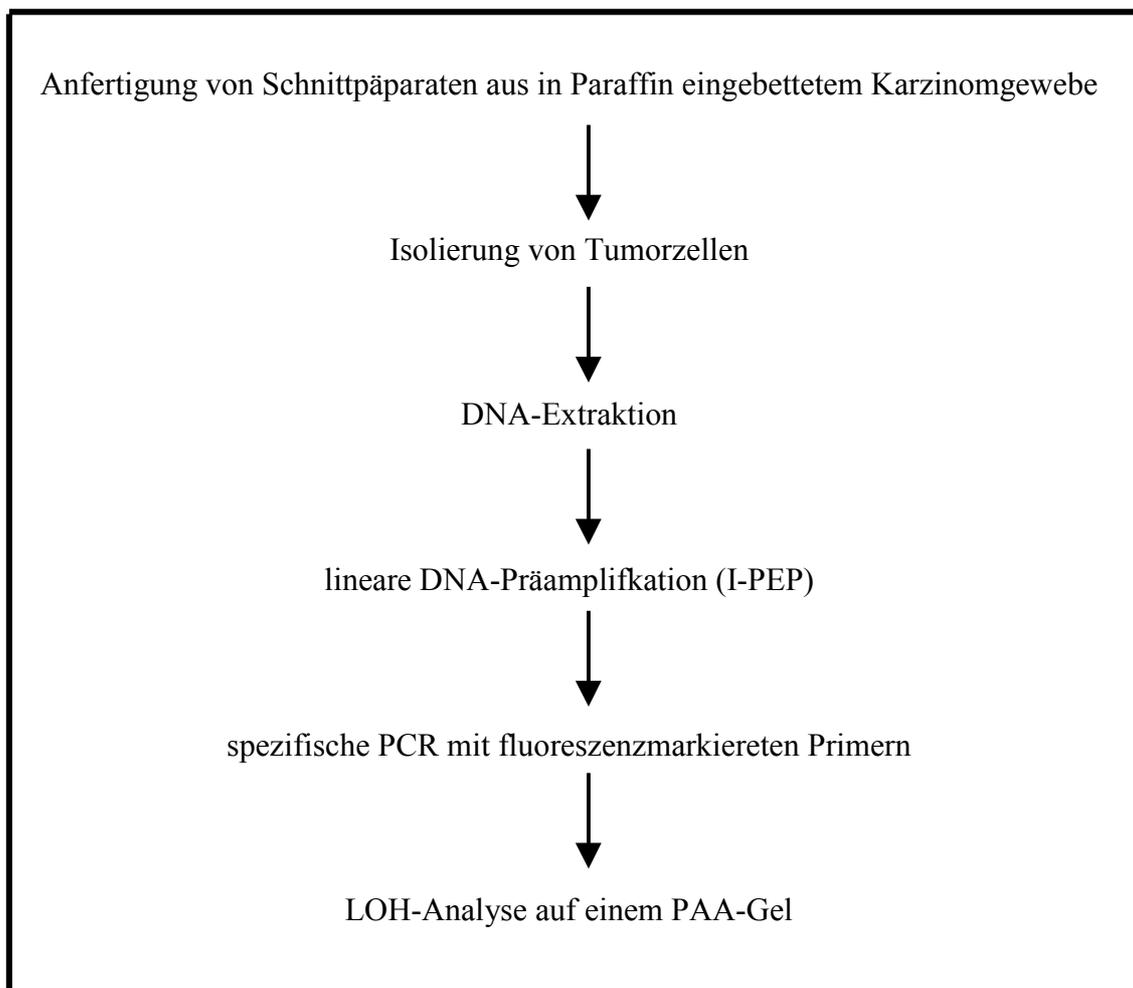


Abb. 2.1: Schematische Darstellung der Verfahrensweise der LOH-Analyse zur Detektion von sporadischen Deletionen im Genom.

II. 2.1.1 Pathologie

Präparation von Paraffinschnitten

Die Schnittpräparate wurden aus in Paraffin eingebettetem Tumorgewebe der Prostata angefertigt. Zur Erstellung der Paraffinschnitte wurde die Schnittfläche der Paraffinblöcke (ca. 20x 15x 5x mm) auf Eis ca. 1h gekühlt oder der Block für mindestens 1h bei -20°C gelagert. So wurde gewährleistet, dass 3-5 μm dünne Schnitte für die Hämatoxylin-Färbung hergestellt und hierdurch eine eindeutige histologische Untersuchung durchgeführt werden konnte. Die Schnitte aus den Paraffinblöcken wurden mit einem angefeuchteten Pinsel von der Klinge des Schnittmikrotoms abgehoben und zur Streckung in ein Warmwasserbad (50°C) übertragen. Die durch das Wasserbad blasen- und faltenfrei gewordene Schnitte wurden anschließend auf saubere und fettfreie Objektträger (Engelbrecht) aufgezogen. Die Paraffinpräparate wurden luftgetrocknet und bei 60°C in einem Hybridisierungs-ofen (Unitherm) 30min auf dem Objektträger fixiert, um bei der anschließenden Hämatoxylin-Färbung ein Abschwimmen der Schnitte vom Objektträger zu verhindern.

Entparaffinierung und Färbung der Schnittpräparate (MWG-Protokoll)

Die angefertigten Schnittpräparate wurden zunächst 2x 5min in Xylol entparaffiniert und in den folgenden Schritten gewässert:

2x 30sec in 100% EtOH; 1x 30sec in 80% EtOH; 1x 30sec in 70% EtOH, 1x 30sec in ddH₂O.

Die Hämatoxylin-Färbung der Präparate erfolgte 5min in einer wässrigen Hämatoxylin-Färbelösung (Shandon). Die gefärbten Schnitte wurden unter fließendem Wasser 5min gespült und anschließend entwässert (1x 10sec in 70% EtOH; 1x 1min in 80% EtOH, 2x 1min in 100% EtOH) und in Xylol fixiert (2x 5min). Nachdem die fixierten Präparate 15min bei RT luftgetrocknet wurden, konnten sie mit einem wasserlöslichen Medium (Vectrashield) und 24x 60mm Deckgläsern (AutomatStar) eingedeckelt werden.

Die Tumor-Bestimmung wurde von Herrn Prof. Wernert (Pathologisches Institut in Bonn) und Herrn Dr. Müller (Pathologisches Institut in Düsseldorf) an gefärbten Schnitten vorgenommen.

DNA-Extraktion aus Paraffinschnitten

Die Herstellung der Schnittpräparate, welche für die DNA-Extraktion verwendet wurden, erfolgte nach der in II. 1.1 beschriebenen Methode. Der einzige Unterschied bestand darin, dass nicht 5 μm , sondern 10 μm dicke Schnitte angefertigt wurden. Bei dünneren Präparaten

bestand die Gefahr, dass ein Teil der genomischen DNA für die Analyse nicht zur Verfügung gestanden hätte, da der Durchmesser einer humanen Zelle ca. 10µm beträgt (*A Sense of Scale: A Visual Comparison of Various Distances*; www.falstad.com/scale/).

II. 2.1.2 Isolierung von Zellen aus Paraffinpräparaten

Die Lokalisierung von malignen Drüsen in den Schnittpräparaten von Prostatakarzinompatienten wurde durch den Vergleich von Hämatoxylin-Schnitten (Abschnitt II. 1.1), die von einem Pathologen begutachtet wurde, mit frisch entparaffinierten Folgeschnitten des Präparates ermöglicht. Diese Tumorareale wurden auf den Folgeschnitten markiert und anschließend isoliert.

Die angewandten Isolationsverfahren waren abhängig von dem Malignitätsgrad des Prostatumors. Bestand das Tumorareal aus hoch differenzierten malignen Drüsen (Malignitätsgrad niedriger als G3), dann wurden die 30-50 monoklonalen Tumorzellen, die in der Drüse lokalisiert wurden, mit Hilfe eines *Laser-Capture-Mikrodissection (LCM)*-Gerätes (Arcturus) isoliert. Mit diesem Verfahren wurden Kontaminationen mit anderen Zelltypen vermieden. Handelte es sich jedoch um solide Prostatakarzinome, deren maligne Drüsen nicht mehr zu unterscheiden waren (ab einen Malignitätsgrad von G3), wurden die malignen monoklonalen Zellen manuell mit einem Skalpell isoliert.

Laser-Capture-Mikrodissection (LCM)

Die Laser-Capture-Microdissection (LCM) ist eine Methode, um kleine Areale oder einzelne Zellen aus einem histologischen Schnitt zu isolieren. Durch dieses Isolationsverfahren wurde eine genaue DNA-Isolierung aus heterogenen Gewebeschnitten ermöglicht, ohne dass diese durch andere Zellsorten kontaminiert wurden. Für die LCM wurde das maligne Prostatagewebe zunächst schonend entwässert, um die Mikrodissektion der Zellen zu ermöglichen. Die LCM-Aufsätze, die mit einem Ethylen-Vinyl-Acetat-Transferfilm beschichtet waren, wurden auf das gewünschte Tumorareal des Paraffinschnittes positioniert. Mit Hilfe des Strahls eines Niederenergie-Infrarot-Lasers wurde der Transfer-Film aktiviert und verschmolz dadurch mit den selektierten Zellen. Die Extraktion der DNA erfolgte direkt vom Aufsatz (Cap; siehe Abb. 2.2).

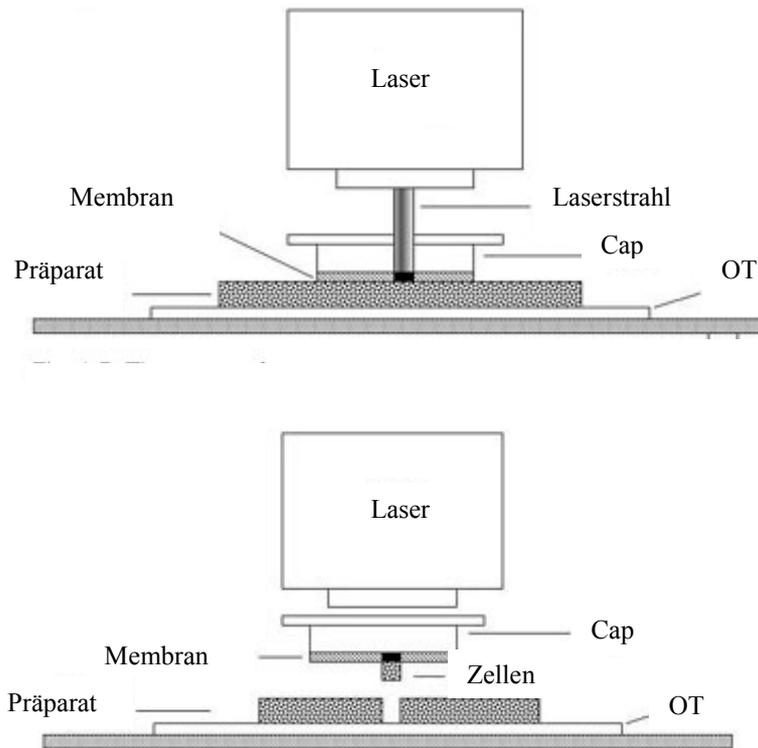


Abb. 2.2: Methode der Laser Capture Mikrodissektion (Arcturus): Das Aufsatz wird positioniert und der Transferfilm durch Beschuss mit einem Infrarotlaser aktiviert. Der Transferfilm verschmilzt so mit dem Gewebe. Der Aufsatz mit dem angeschweißten Gewebe wird abgenommen und weiter verarbeitet.

Die Einstellung des LCMs:

Mikrodissektionssdauer: 850ns; LCM-Wiederholungen: 0,2s; die Größe der mikrodissektierte Fläche: 30µm; Stromspannung: 0,205V;: Stromstärke :18,0mA.

Mit 30 µl Proteinase K-Puffer wurden die Zellen direkt vom Aufsatz lysiert und die DNA extrahiert. Das Volumen wurde so gewählt, dass die extrahierte DNA im kleinst möglichen Volumen aufgenommen werden konnte. Die Zellen wurden mit dem Puffer ÜN bei 55°C inkubiert. Die Inaktivierung des Enzyms erfolgte 30min bei 68°C.

Manuelle Isolation

Areale mit soliden Prostatakarzinomen, deren maligne Drüsen nicht mehr zu differenzieren waren (ab einen Malignitätsgrad von G3), wurden manuell mit einem Skalpell isoliert. Voraussetzung war, dass das Tumoreal mindestens zu 80% aus malignen Zellen bestand, da

geringe Kontaminationen mit normalen Zellen keinen gravierenden Einfluss auf die LOH-Analyse hatten.

Bei der manuellen Isolation wurden bis zu 3000 Zellen mit einem Skalpell in ein 0,5 ml Eppendorf-Gefäß überführt und mit 50 µl der Proteinase K-Lösung lysiert. Diese Zellen wurden ebenfalls mit der Lösung ÜN bei 55°C inkubiert. Die Inaktivierung der Proteinase K erfolgte 30 Minuten bei 68 °C.

II 2.1.3 Amplifikation der extrahierten DNA

I-PEP (Dietmaier et al, 1998)

Mit der *improved-primerextension preamplifikation* (I-PEP) wurden geringe Mengen DNA linear präamplifiziert, bevor diese spezifisch in einer PCR-Reaktion amplifiziert werden konnten. Für die extrahierte DNA aus den manuell isolierten Tumorzellen war die I-PEP deshalb notwendig, da aufgrund der Konservierung des Tumorgewebes in gepuffertem Formalin die DNA degradiert war. Somit stand nur ein Teil des extrahierten Materials für eine PCR-Reaktion zur Verfügung.

Die lineare Präamplifikation der DNA wurde mit 15-mer Random-Primern durchgeführt. Bei den Primern handelte es sich um einen Mix aus allen möglichen Primerkombination, die ihrer Sequenz entsprechend am Genom binden können.

Der I-PEP-Reaktionsansatz hatte ein Volumen von 50µl und enthielt folgende Komponenten:

10 x Taq-DNA Polymerase Puffer (<i>Invitrogen</i>)	:	5,0µl
je 10mM dNTPs	:	0,5µl
50mM MgCl ₂	:	3,0µl
400µM I-PEP-Primer	:	2,0µl
DNA-Lösung	:	5,0µl
5U/µl Taq-DNA Polymerase (<i>Invitrogen</i>)	:	0,8µl

Die lineare Amplifikation erfolgte in einem PTC-200 (MJ-Bioscience) mit folgendem Programm:

- | | |
|--------------------------|-------------|
| - 2min, 96°C | } 20 Zyklen |
| - 30sec, 96°C | |
| - 20sec, 37°C | |
| - 0,1°C/sec → 55°C, 2min | |
| - 7min, 68°C | |
| ↓ | |
| - 30sec, 94°C | } 30 Zyklen |
| - 20sec, 37°C | |
| - 0,1°C/sec → 55°C, 2min | |
| - 7min, 68°C | |
| - ∞, 8°C | |

Bei Einzelzellamplifikationen oder bei Amplifikationen mit geringer Zellzahl (30-100 Zellen) besteht die Gefahr, dass Teile des Genoms aufgrund ineffiziente Denaturierung der Template-DNA in den ersten Zyklen der PCR nicht amplifiziert werden. Dieses Phänomen wird als **allele drop out** (ADO) bezeichnet (*Navidi et al., 1991; Grifo et al., 1996; Harper et al., 1994* und *Verlinsky et al., 1996*). Zur Vermeidung von ADOs wird deshalb zur Amplifikation der DNA ein zweistufiger I-PEP-PCR-Zyklus gewählt.

Spezifische PCR

Die spezifische PCR war maßgeblich für die Detektion von LOHs im Genom. Für die Detektion wurden Primer verwendet, mit denen DNA-Abschnitte mit Mikrosatellitenmarkern amplifiziert werden. Bei den Primern handelte es sich um 18-20-mere Oligonukleotide mit einem G/C-Gehalt von 50-60%. Die Analyse der PCR-Produkte erfolgte auf einem 6% PAA-Gel.

Für die spezifische PCR wurden für die Amplifikation der Mikrosatellitenbereiche auf Chromosom 8 die Primer D8S136 und D8S549 verwendet. Für die LOH-Detektion auf Chromosom 10 wurden folgende Primer benutzt:

D10S137	D10S217
D10S190	D10S221
D10S201	D10S1453
D10S209	D10S1656
D10S260	D10S1679
D10S541	D10S1692
D10S587	D10S1708
D10S1230	D10S1723
D10S212	D10S1731
D10S216	D10S1757

Die PCR-Reaktionsansätze hatte ein Volumen von 15 μ l und enthielt folgende Komponenten:

10x PCR-Puffer (Invitrogen)	: 1,5 μ l
je 10mM dNTPs	: 3,0 μ l
50mM MgCl ₂	: 0,6 μ l
5U/ μ l <i>Taq</i> -Polymerase (Invitrogen)	: 0,2 μ l
2pM Primer	: 1,0 μ l
10ng DNA-Lösung	: 1,0 μ l
add 15,0 μ l ddH ₂ O	

Zusätzlich wurde zu jedem Versuch eine Negativkontrolle ohne DNA mitgeführt. Die spezifische PCR wurde in einem PE 9700 PCR Cycler (Perkin Elmer) mit folgendem Programm durchgeführt: Denaturierung bei 94°C, 2 min und 35 Zyklen mit 1min, 94°C; 1min, 60°C; 45sec, 72°C und 10min, 72°C. Je nach verwendetem Primer variierte die Annealingtemperatur zwischen 50–60°C.

II 2.1.4 LOH-Detektion

Sequenzgel

Die LOH-Detektion erfolgt auf einem 6%-igen *Polyacrylamid* (PAA)–Gel, das aus folgenden Agenzien zusammengesetzt war:

10 x TBE	3,0ml
Acrylamid/bisacrylamid (29:1) (<i>Roth</i>)	5,0ml
Urea Pura (<i>Merck</i>)	10,5g
TEMED	8,0 μ l
10% APS	185,0 μ l
ddH ₂ O	add 20,0ml

Das Gel wurde zwischen zwei saubere Glasplatten (*Licor*) gegossen. Nachdem das Gel auspolymerisiert war, wurde es in eine LICOR-Apparatur eingespannt und die Ober- und Unterkammer mit Elektrophoresepuffer (1x TBE) aufgefüllt.

Analyse der PCR-Produkte

Zur Vorbereitung der Proben für den LICOR-Auftrag wurden 4 μ l des PCR-Ansatzes mit 1 μ l 5x Ficoll–Auftragspuffer versetzt und die aufzutragenden Proben 3min bei 70°C in einem Heizblock (*Whatman Biometra*) denaturiert. Von den Proben wurde anschließend je 2 μ l auf das 6%-PAA-Gel aufgetragen. Die Auftrennung der Produkte erfolgte innerhalb von 2h bei 1000V und 35mA. Die Proben wurden durch den Vergleich der Bandenintensitäten mit dem BaseImager IR v 2.30 (*Licor*) ausgewertet.

II. 2.2 HPC2/ELAC2-Polymorphismusanalyse

Die HPC2/ELAC2-Polymorphismusanalysen in Exon 7 und Exon 17 wurden an Blut-DNA von 185 Prostatakarzinompatienten und 184 Kontrollpersonen durchgeführt.

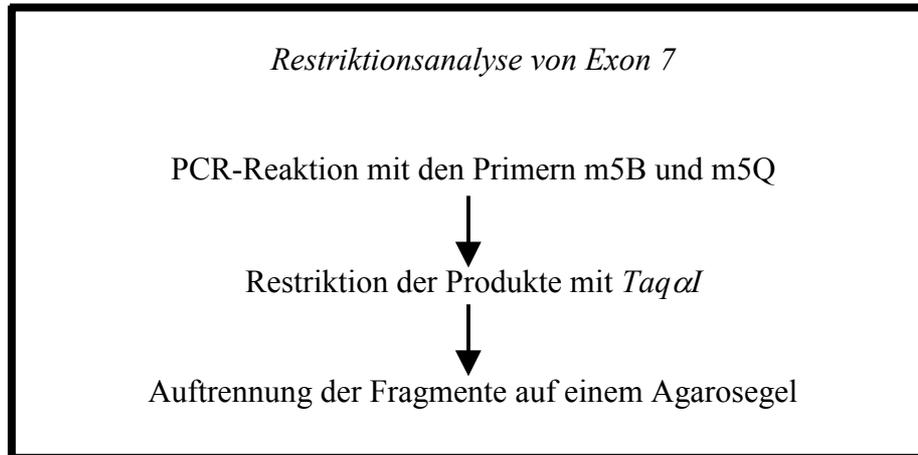


Abb. 2.3: Schematische Darstellung der Polymorphismusanalyse von Exon 7

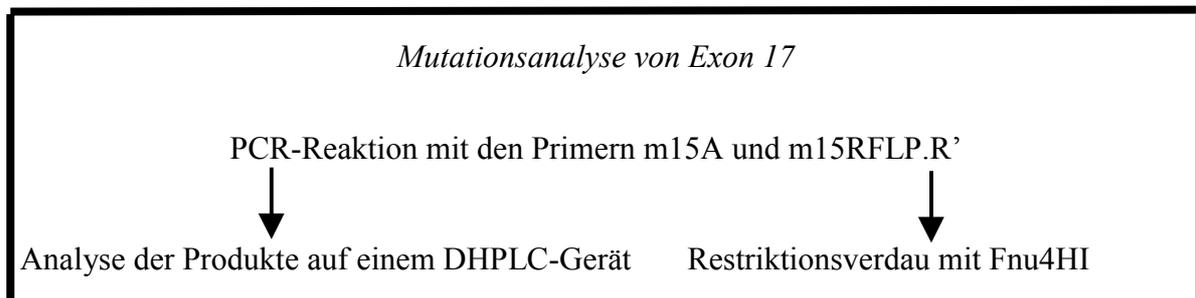


Abb. 2.4: Schematische Darstellung der Mutationsanalyse von Exon 17

Extrahierung der Blut-DNA

Die DNA für die Polymorphismusanalyse wurde aus Vollblut mit Hilfe des Qiamp Blood Kits (Qiagen) nach Angaben des Herstellers extrahiert:

Die Qualitätskontrolle erfolgte mit 10 μ l extrahierter DNA auf einem 1%-TAE-Agarosegel.

Spezifische PCR

Die PCR wurde mit 10ng genomischer DNA angesetzt.

Die Proben in den PCR-Ansätzen wurden mit Taq DNA Polymerase (*Invitrogen*) amplifiziert:

10x PCR-Puffer	: 1,5µl
je 10mM dNTPs	: 3,0µl
50mM MgCl ₂	: 0,6µl
Taq-Polymerase (5U/µl)	: 0,2µl
2pM Primer	: 1,0µl
10ng DNA-Lösung	: 1,0µl
	add 15,0µl ddH ₂ O

Zusätzlich wurde zu jedem Versuch eine Negativkontrolle ohne DNA mitgeführt. Die Proben wurden in einem PCR-Cycler PTC-200 (MJ-Bioscience) mit folgenden Programm amplifiziert: Denaturierung der Proben bei 94°C, 2 min; 35 Zyklen mit 1min, 94°C; 1min, 60°C; 45sec, 72°C und 10min, 72°C.

Restriktionsanalyse

Die Hälfte des Volumens des PCR-Ansatzes (7,5µl) wurde für die Restriktionsanalyse (ges. Vol. 10µl) verwendet. Die Produkte wurden jeweils mit 2,5µl Reaktionspuffer (inklusive 5U Restriktionsenzym) inkubiert. Die verbliebenen 7,5µl dienten als Kontrolle und wurden nicht mit dem Enzym inkubiert.

Die Reaktionspuffer für die Restriktionsanalyse wurden in einem 10-fachen Volumen angesetzt, damit die um ein vielfaches konzentrierten Agenzien (10 x Puffer, 100 x BSA) auf eine 1-fache Konzentration verdünnt werden konnten.

Die Reaktionspuffer für 10 Restriktionsanalysen:

Ser217Leu-Polymorphismus-Analyse

10 x Puffer	: 10,0µl
100 x BSA (10mg/ml)	: 1,0µl
Taq α I (20U/µl)	: 2,5µl
	H ₂ O add 25,0µl

Ala541Thr–Polymorphismus

Inkubation ÜN bei 65°C

10 x Puffer : 10,0µl
Fnu4HI (5U/µl) : 10,0µl
 H₂O add 25,0µl
 Inkubation 3 h bei 37°C

7,5µl PRC-Produkt werden mit 2,5µl des angesetzten Reaktionspuffers inkubiert.

Agarosegelelektrophorese

Die geschnittenen und ungeschnittenen PCR-Produkte wurden mit je 2,5µl 6x Ladepuffer versetzt und auf ein 2%-iges TAE–Agarosegel aufgetragen. Als Marker wurde der pUC-Mix von MBI Fermentas verwendet. Die Auftrennung der Produkte erfolgte innerhalb von 45min bei 300mA und 60V. Das Gel wurde anschließend unter einem Transiluminator (Inventas) bei einer Wellenlänge von 260nm dokumentiert.

II 2.2.1 Silberfärbung von Polyacrylamidgelen

Die Fragmente des Ala541Thr-Polymorphismen konnten auf einem Agarosegel nicht erkannt werden, deshalb wurde für die Detektion der Fragmente die sensitivere Silberfärbung angewandt. Für die Analyse der Fragmente wurde ein 8% PAA–Gel verwendet.

Zusammensetzung des 8% PAA–Gels:

21g Harnstoff
 10ml 40 % PAA (49:1)
 5ml 10 x TBE
 250µl 10% APS
 50µl TEMED
 add 50ml ddH₂O

Anschließend wurde 1µl PCR–Produkt mit 3µl ddH₂O und 1µl Ladepuffer versetzt und davon 2µl auf das Gel aufgetragen. Als Marker wurde der pUC–Mix verwendet. Die Proben wurden bei 50V für 4 h in 1x TBE aufgetrennt und anschließend gefärbt.

Färbung

Die Lösungen B und D wurden aus einer 10x Stammlösung angesetzt und die Lösung A und C frisch hergestellt (siehe Material).

- Fixierung der DNA 2x 3min in 300ml 1x Lösung C;
- Färbung des Gels 10min in 1x Lösung B;
- zweimal mit 300ml dH₂O waschen;
- Entwicklung des Gels für max. 20min mit Lösung C;
- 5min fixieren in 1 x Lösung D;
- das Gel zur Aufbewahrung in Gefrierbeutel (*Melitta*) eingeschweißt;

Die Analyse des Gels erfolgte unter einem Lichtprojektor.

II 2.2.2 Analyse mit Hilfe der DHPLC–Methode*DHPLC*

DNA-Fragmente können mit Hilfe der DHPLC (*denaturation-high-performance-liquid-chromatography*) des *TRANSGENOMIC WAVE DNA Fragment Analysis Systems* aufgetrennt und so Mutationsanalysen durchgeführt werden. Diese Analyse basiert auf dem Prinzip der Flüssigchromatographie (*liquid chromatography*; LC).

Hauptbestandteil dieses Systems ist ein TEAA-(Triethyl–Ammonium–Acetat)-haltiger Puffer (wässrige Phase), in welchem die DNA aufgenommen wird, und eine in den Chromatographen integrierte Matrix (stationäre Phase). Die TEAA-Moleküle binden über positiv geladene Ammoniumionen an das negativ geladene Phosphatrückgrat der DNA. Mit Hilfe seiner Alkylkette reagiert das Agenz mit der hydrophoben Oberfläche der Matrix. Diese besteht aus 2,1–0,12µm großen, elektrisch neutralen Polystyrol-Divinylbenzol–Kopolymeren. Begünstigt wird die Bindung der DNA an die Matrix bei einer Temperatur von 50°C, da die DNA–Doppelhelix unter diesen Temperaturverhältnissen ungefaltet und gestreckt vorliegt (*Huber et al. 1993*). Nach der vollständigen Bindung der PCR-Produkte wird ein Acetonitril-Puffer hinzugeführt. Die hydrophobe Interaktion zwischen der Matrix und dem Acetonitril ist höher als mit dem TEAA-Molekül mit seinem positiv geladenen Ammoniumion, wodurch die DNA von der Säule getrennt wird.

Das Prinzip der Mutationsdetektion:

Die PCR–Produkte, bestehend aus Wildtyp (WT) oder mutierter (MUT) DNA, werden denaturiert und anschließend langsam renaturiert (Abb. 2.6). Dabei bilden sich bei homozygoten Produkten nur Homoduplizes und bei heterozygoten Produkten neben den

Homoduplizes auch Heteroduplizes. Die renaturierten Produkte werden in das DHPLC-Gerät gegeben und binden an eine Matrix, die sich in einer Säule befindet. Anschließend wird die Säule langsam erwärmt.

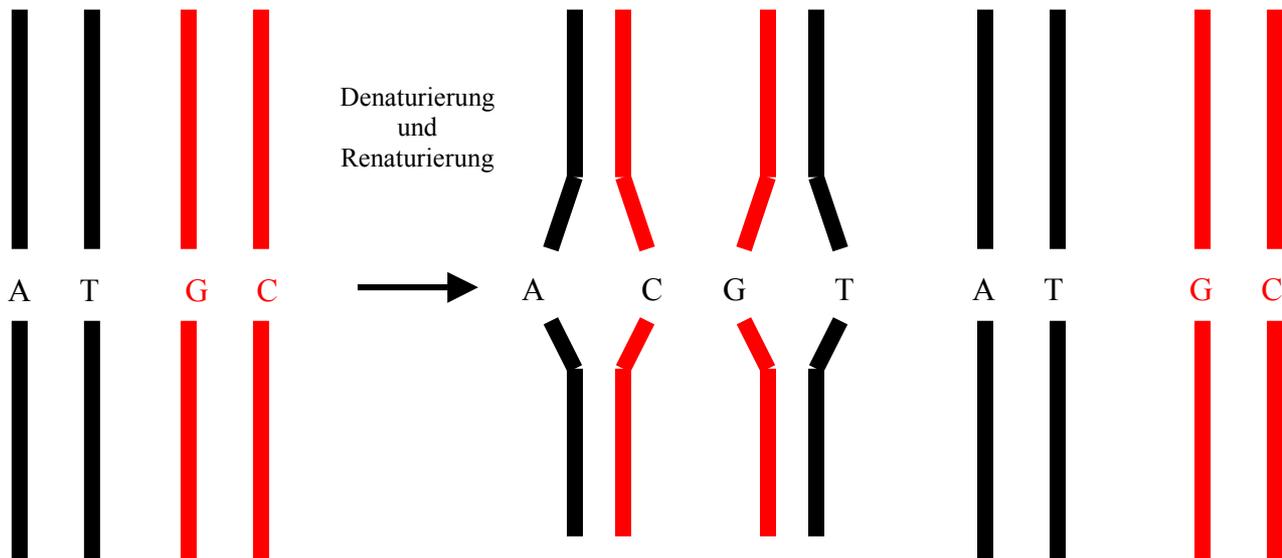


Abb. 2.6: Schematische Darstellung der Heteroduplex-Bildung während der Renaturierung.

Durch die unterschiedlichen Schmelzeigenschaften der Duplizes, die anhand der Fragmentlänge, der Position der Mutation im Fragment und der Veränderung des G–C Gehaltes im PCR-Produkt (im Vergleich zum WT) auftritt, denaturieren die an die Matrix gebundenen dsDNA Produkte zu unterschiedlichen Zeitpunkten. Anhand der unterschiedlichen Bindungskinetik denaturieren in der zeitlichen Abfolge zunächst die Heteroduplizes und anschließend die Homoduplizes (Abb. 2.7). Dieser Prozess wird durch ein UV–Detektionssystem erfasst und in einer Graphik wird die Intensität des Produktflusses in Abhängigkeit von der Denaturierungsdauer an der Matrix dargestellt.

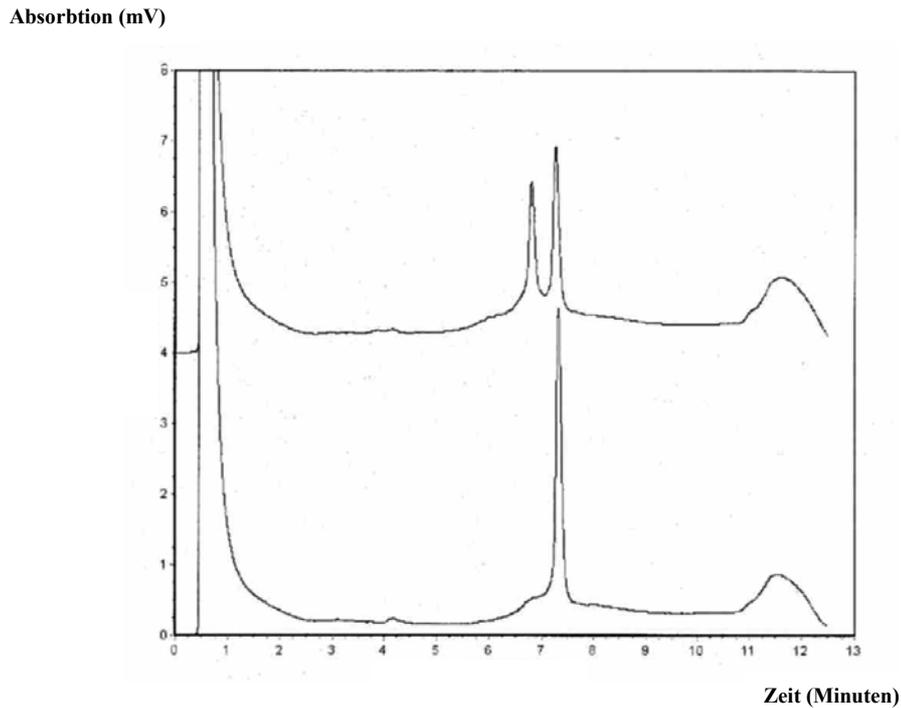


Abb. 2.7: Dargestellt sind die Absorbtionsspektren (Absorbtion in Abhängigkeit von der Zeit) von Hetero- (oben) und Homoduplices (unten) in einem DHPLC-Gerät (aus *TRANSGENOMIC Operator's Guide*).

Ansatz

Um den Ala541Thr-Polymorphismus durch die Chromatographie bestimmen zu können, war es wichtig, dass die DNA der zu untersuchenden Personen fehlerfrei amplifiziert wurden. Aus diesem Grund wurde für die PCR-Reaktion die Expand High Fidelity Polymerase (Roche) verwendet. Durch die Korrekturlese (proofreading)-Eigenschaft dieser Polymerase (3'-5'-Exonukleaseeigenschaft) werden fast gar keine unspezifischen Produkte amplifiziert.

Die PCR-Ansätze hatten ein Volumen von 50 μ l und folgende Zusammensetzung:

10 x Expand Polymerase-Puffer (inkl. 15mM MgCl ₂)	: 5,0 μ l
je 10 mM dNTPs	: 2,0 μ l
2 pM Primer	: 2,0 μ l
10ng DNA-Template	: 1,0 μ l
Expand Polymerase (3,5U/ μ l)	: 0,4 μ l
	add 50 μ l ddH ₂ O

Zusätzlich wurde zu jedem Versuch eine Negativkontrolle ohne DNA mitgeführt. Die Proben wurden in einem PTC-200 (*MJ-Bioscience*) mit folgendem Programm amplifiziert: Denaturierung bei 94°C, 2 min; 35 Zyklen mit 1min, 94°C; 1min, 60°C; 45sec, 72°C und 10min, 72°C.

Die Chromatogramme wurden analysiert und mit der gleichzeitig durchgeführten Sequenzanalyse der Proben verglichen. So konnten die Polymorphismen den Schmelzkurven zugeordnet werden.

II 2.2.3 Sequenzierung der amplifizierten DNA

Die Sequenzierung der PCR-Produkte erfolgte im Anschluss an die spezifischen PCRs. Die PCR-Produkte wurden mit dem QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen) nach Angaben des Herstellers aufgereinigt. Die aufgereinigten PCR-Produkte wurden auf einem 2 % TAE-Agarosegel aufgetragen und die DNA-Konzentration bestimmt. Für die Sequenzreaktion wurden 2µg des PCR-Produktes verwendet.

Für jeden zu amplifizierenden Bereich wurden zwei PCR-Sequenzreaktionen angesetzt. Eine Probe wurde mit dem Sense-Primer amplifiziert und die zweite mit dem Antisense-Primer.

Für die Sequenzreaktion wurden folgende Bestandteile zusammenpipettiert:

DNA	:	3,0 µl
Primer (2 pM)	:	2,0 µl
Big-Dye-Mix	:	4,0 µl

ddH₂O add 12,0 µl

Die Proben wurden in einem PE 9700 PCR Cycler (Perkin Elmer) mit folgendem Programm amplifiziert: Denaturierung bei 94°C, 2 min und 30 Zyklen mit 15sec, 94°C; 15sec, 60°C; 15sec, 72°C.

Die zu sequenzierenden Produkte wurden zur Aufreinigung in 80µl dH₂O, 10µl 3M NaAc (pH 5,2) und 300µl EtOH (100%) für 30min bei RT präzipitiert und anschließend 2x mit 70%-igem EtOH für 15 min bei RT gewaschen.

Die Sequenzanalyse wurde von Fr. Dr. Sybille Scheuring vom BMFZ auf einem 3100 ABI Sequenzer durchgeführt.

IV 2.2.4 Statistik

Die Berechnung der Haplotypenfrequenz der Probandengruppen erfolgte nach der Genzählmethode von *Mourant et al., 1976*. Die statistischen Überprüfung auf das Hardy-Weinberg-Gleichgewicht, sowie der Homogenitätstest für den Vergleich der Haplotypenverteilung in den Patienten- und Kontrollgruppen, wurde mit dem χ^2 -Test und mit der Mehrfeldtafel nach *Fisher & Yates, 1963* bestimmt. Zur Berechnung der Haplotypenverteilung wurden die Erwartungswert < 2 nach *Sachs et al., 1992* zusammengefasst und die Irrtumswahrscheinlichkeit von jeweils 5% gewählt.

III. Die Patienten und die Kontrollpersonen

In dieser Arbeit wurden DNA- und Gewebeproben von insgesamt 424 Personen verwendet. Von einer genauen Benennung und Nummerierung der Probanden musste aus Gründen des Datenschutzes abgesehen werden.

III. 1 Die Patienten

Im Rahmen dieser Dissertation wurden Prostatakarzinompatienten untersucht, die mindestens das sechzigste Lebensjahr vollendet hatten. Die LOH-Analyse wurde an in Paraffin eingebettetem Prostatakarzinomgewebe von 55 Patienten durchgeführt, die freundlicherweise von Herrn Prof. Wernert (Pathologisches Institut in Bonn), Herrn Dr. Engert und Herrn Dr. Müller (Pathologisches Institut in Düsseldorf) zur Verfügung gestellt worden sind. Die Polymorphismusanalyse des *HPC2/ELAC2*-Gens wurde mit Blut-DNA-Proben von 185 Patienten aus dem Zentrum für Operative Medizin III in Düsseldorf (Urologische Klinik, Herr Dr. Schulz) und dem Pathologischen Institut in Berlin (Herr Prof. Dr. Schäfer) durchgeführt.

III. 2 Die Kontrollpersonen

Als Referenzpersonen für die Polymorphismusanalyse des *HPC2/ELAC2*-Gens wurden 184 DNA-Proben von Knochenmarkspender aus der Institut für Transplantationsdiagnostik und Zelltherapie (Herr Dr. Enczmann) zur Verfügung gestellt. Die Auswahl erfolgte unabhängig vom Geschlecht und Alter der Probanden.

IV. Ergebnisse

Im Rahmen dieser Arbeit wurden somatische und hereditäre Faktoren für die Progression des Prostatakarzinoms untersucht. Für die Untersuchung sporadischer Deletionen in Prostatakarzinomzellen sollten Aberrationen in der Region 10q26 anhand von LOH-Analysen detektiert werden. Im zweiten Teil wurde mittels Polymorphismusanalysen des putativen Tumorsuppressorgens *HPC2/ELAC2* bei Patienten und Kontrollpersonen dessen Rolle für ein erhöhtes hereditäres Krebsrisiko untersucht.

In Abb. 4.1 und 4.2 sind die verwendeten Analyseverfahren der Dissertation schematisch dargestellt.

LOH-Analyse

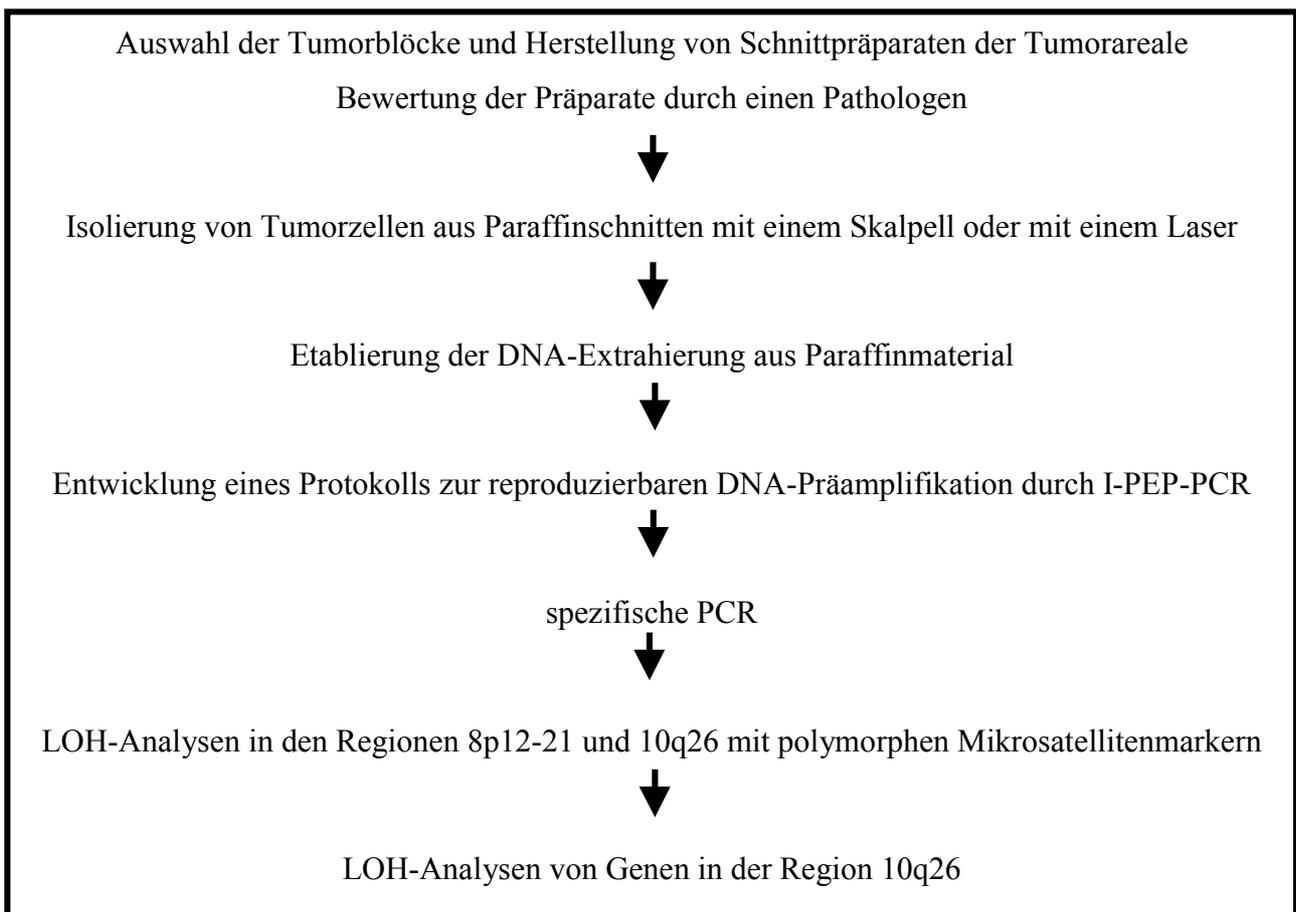


Abb. 4.1: Schematische Darstellung der einzelnen Projektteile dieser Arbeit.

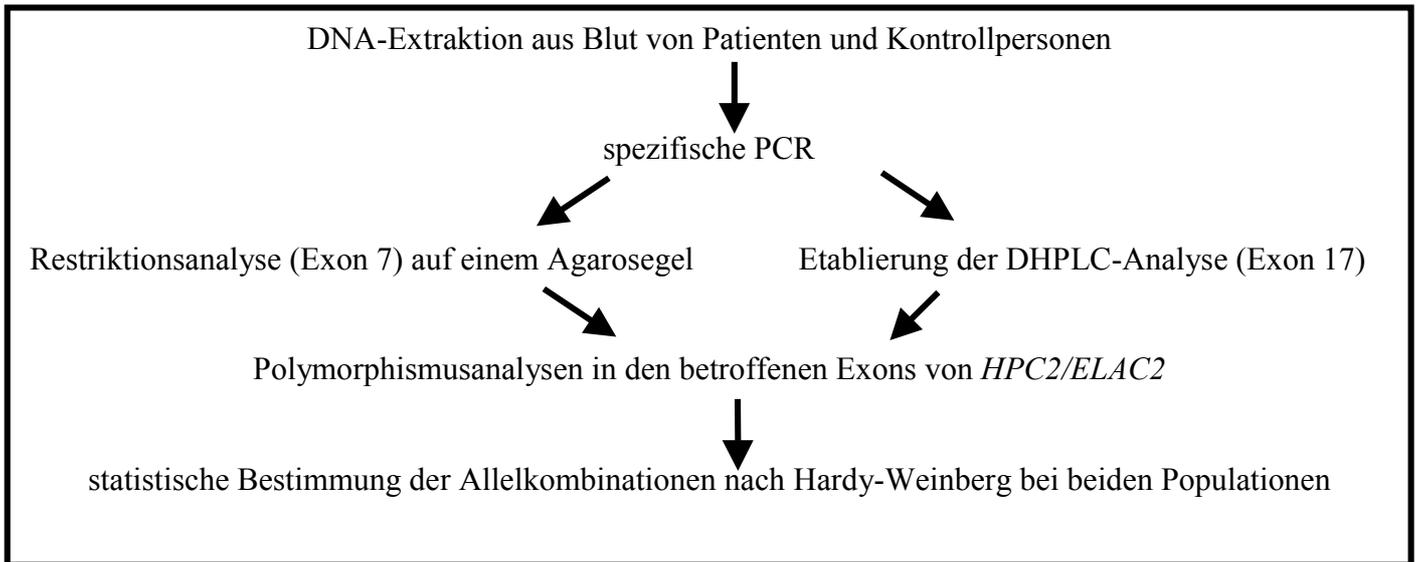
HPC2/ELAC2-Polymorphismusanalyse

Abb. 4.2: Schematische Darstellung der in dieser Arbeit angewandten Verfahrensweisen.

IV. 1 Untersuchung sporadischer Prostatakarzinome

IV. 1.1 Untersuchung von Veränderungen auf Chromosom 10

LOH-Analysen mit extrahierter DNA aus monoklonalen Tumorarealen mikrodissektierter Paraffinschnitte waren bis zu Beginn dieser Arbeit nicht publiziert. Für die Untersuchungen an Prostatakarzinomen aus Paraffinschnitten wurden heterogene DNA-Gemische von Tumoren verwendet, die aus ganzen Schnittpräparaten extrahiert wurden (*Doll et al., 1999, Alers et al., 2000* und *Leube et al., 2002*). Um deletierte, chromosomale Bereiche eingrenzen zu können, war es notwendig, monoklonale Tumorzellen per Mikrodissektion zu isolieren, die in einer malignen Drüse zwischen 30-50 Zellen umfassen. Für diese Untersuchungen wurden Paraffinpräparate verwendet, da bei Gefrierschnitten durch das Schockgefrieren das Gewebe so stark zerstört wird, dass eine histologische Identifizierung der Tumorareale und somit eine morphologische Differenzierung von Tumor- und Normalgewebe für die LOH-Analysen fast unmöglich ist.

Als erstes wurden Präparate verwendet, bei denen die Tumorareale von Herrn Dr. Müller (Institut für Pathologie, Düsseldorf) eingegrenzt worden sind. Die Tumorpräparate stammten aus den Jahren 1990 bis 1997 und wurden in ungepuffertem Formalin konserviert. Durch die Fixierung des Prostatagewebes in ungepuffertem Formalin wurde die DNA stark degradiert

(Sieben *et al.*, 2000) und war somit, durch die schlechte Qualität der DNA, für LOH-Analysen nicht geeignet. Ab 1998 wurde, auf unsere Anregung hin, in der Pathologie die Tumore in gepuffertem Formalin konserviert.

IV. 1.2 DNA-Extraktion aus Paraffinschnitten und Amplifikation der DNA

Für die Etablierung einer geeigneten Methode zur Extraktion von DNA aus in Paraffin eingebettetem Gewebe wurden Präparate mit nicht malignen Arealen von drei Prostatakarzinompatienten (A, B, C) verwendet. Das primäre Ziel war es eine Methode zu etablieren, mit der mit wenigen Zellen reproduzierbare LOH-Ergebnisse durchgeführt werden konnten.

In der ersten Versuchsreihe wurden ca. 50 Zellen mit einem *Laser Capture Microdissection* (LCM)–Gerät (Arcturus) mikrodisektiert. Die DNA wurde aus den Zellen nach einem Protokoll von MWG Biotech extrahiert, dann EtOH/NaAc präzipitiert und in einer 50µl I-PEP-PCR-Reaktion präamplifiziert. In Abb. 4.3 ist die präamplifizierte DNA der Größe von 200Bp bis ca. 2 Kb zu sehen.

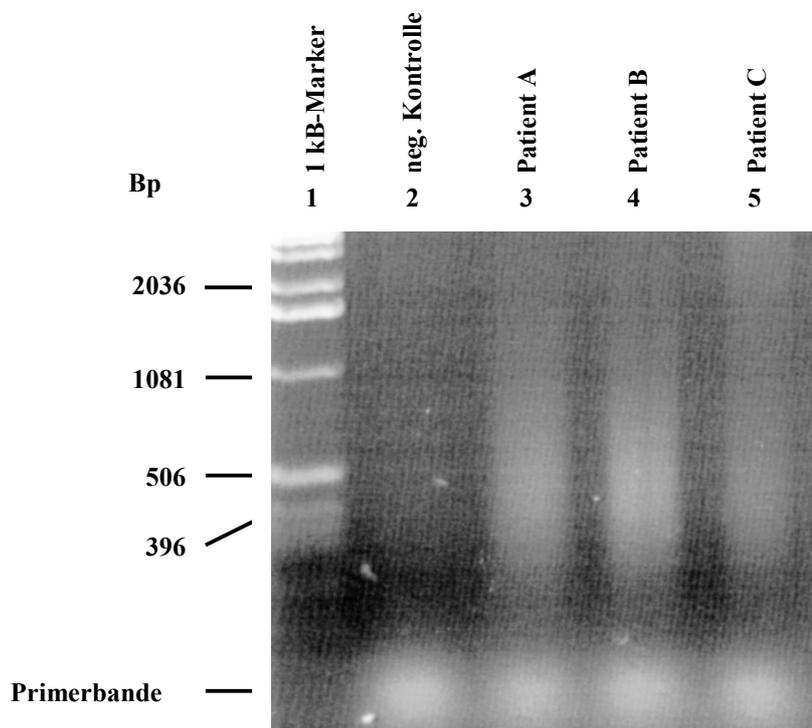


Abb. 4.3: 1% TAE–Agarosegel mit I-PEP-Produkten von drei Prostatakarzinompatienten (Spur 3: A; Spur 4: B; Spur 5: C). In Spur 2 ist die Negativkontrolle zu sehen.

Die I-PEP-Produkte wurden anschließend mit dem Primerpaar D10S587 in 15µl PCR-Reaktionen amplifiziert und auf einem 6%-igen PAA-Gel getrennt, auf dem jedoch nur sehr schwache PCR-Produkte zu erkennen waren. Aus diesem Grund wurde das Protokoll weiter optimiert. Das DNA-Extraktionsverfahren wurde modifiziert, in dem die isolierten Zellen im PCR-Reaktionspuffer (Invitrogen) mit Proteinase K (4mg/ml) lysiert wurden.

Die Anzahl der lysierten Zellen aus einem Paraffinschnitt betrug:

- 1) 1000 Zellen (isoliert durch Lasermikrodissektion)
- und
- 2) ca. 3000 Zellen (manuelle Isolation per Skalpell)

Die extrahierte DNA wurde mit Taq-Polymerase (Invitrogen) unspezifisch in einer I-PEP-PCR präamplifiziert und anschließend mit dem Primer D10S587 spezifisch amplifiziert (Abb. 4.4). Weil die Blut-DNA der untersuchten Person nicht zur Verfügung stand, wurde als positiv Kontrolle die Blut-DNA einer anderen Person verwendet.

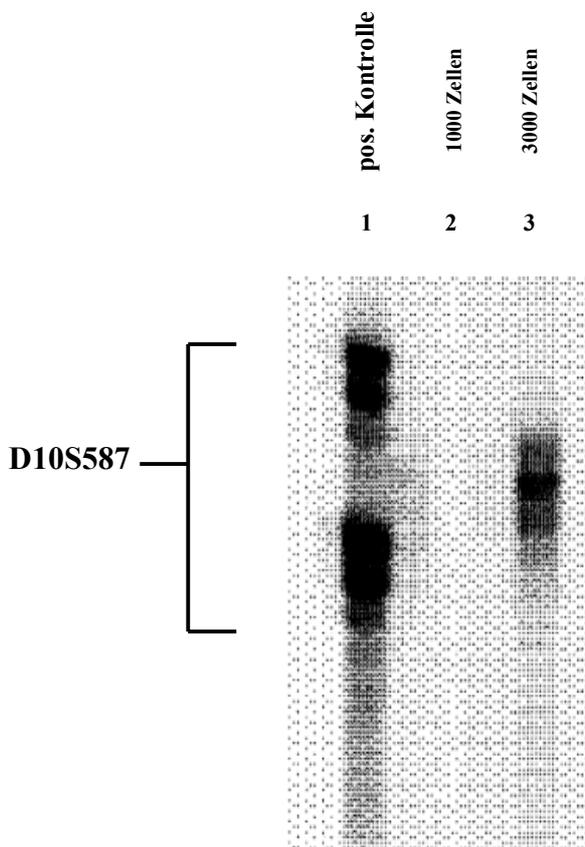


Abb. 4.4: Auf dem 6%-igen PAA-Gel wurden folgende Produkte, die mit D10S587 amplifiziert wurden, aufgetrennt:
 Spur 1) Positivkontrolle aus 10ng Blut-DNA
 Spur 2) DNA aus 1000 Zellen, die aus Paraffinmaterial mikrodisektiert wurden.
 Spur 3) DNA aus 3000 Zellen, die aus Paraffinmaterial manuell mit einem Skalpell isoliert wurden.
 Die isolierten Zellen stammten vom gleichen Präparat.

In Abb. 4.4 ist zu erkennen, dass das Amplifikationsergebnis besser war, wenn mehr Zellen mit einem Skalpell vom Paraffinpräparat isoliert und mit Proteinase K in dem PCR-Reaktionspuffer von Invitrogen lysiert wurden (Spur 3 in Abb. 4.4). Die Produkte sind nicht als einzelne Banden zu erkennen. Der Grund hierfür ist, dass bei der Amplifikation von CA-Wiederholungs-Markern immer ein Hauptprodukt und „Stotterbanden“ entstehen, die jeweils einem Produkt entsprechen, das um 2Bp (CA) verkürzt ist (*Shinde et al., 2003*). Je nach Größenunterschied zwischen dem ersten und zweiten Allel komigrieren die Stotterbanden von dem ersten Allel mit der Hauptbande des zweiten Allels. Des Weiteren werden die beiden Allele nicht immer gleich amplifiziert (Abb.4.8).

Zusätzlich wurde ein weiterer Standard-DNA-Extraktionspuffer (*Sambrook et al., 1989*) an drei Folgeschnitten eines Paraffinpräparates eines Patienten getestet. Die Tumoreareale wurden vollständig mit einem Skalpell isoliert und drei Lyseansätze getestet. Für alle Extraktionsansätze wurde jeweils ein gesamter Paraffinschnitt mit dem Skalpell isoliert:

- 1) Lyseansatz 1 (Invitrogen-PCR-Puffer mit Proteinase K),
- 2) Lyseansatz 2 (detergenzloser Standard-DNA-Extraktionspuffer nach *Sambrook et al., 1989*),
- 3) Lyseansatz 3 (Invitrogen-PCR-Puffer mit Proteinase K und anschließende Konzentrierung die extrahierte DNA durch EtOH/NaAc-Präzipitation.

Die extrahierte DNA wurde mittels I-PEP-PCR präamplifiziert und mit D10S587 amplifiziert. Für die Amplifikationen wurde die Taq-Polymerase von Invitrogen verwendet (Abb. 4.5).

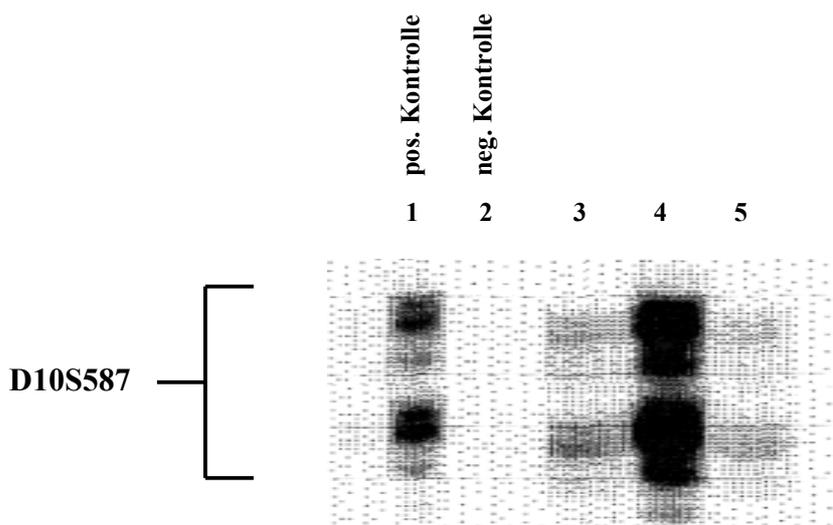


Abb. 4.5: Die DNA aus drei mit dem Skalpell isolierten Paraffinpräparaten eines Patienten wurde nach drei verschiedenen Verfahren extrahiert:

Spur 3) Lyseansatz 1 (Invitrogen-PCR-Puffer mit Proteinase K),

Spur 4) Lyseansatz 2 (detergenzloser Standard-DNA-Extraktionspuffer nach *Sambrook et al., 1989*),

Spur 5) Lyseansatz 3 (Invitrogen-PCR-Puffer mit Proteinase K mit EtOH/NaAc präzipitiert).

Die extrahierte DNA wurde mit einer I-PEP präamplifiziert und mittels einer PCR mit D10S587 amplifiziert. Die Proben wurden auf einem 6%-igen PAA-Gel getrennt: Spur 1) Positivkontrolle mit 10ng Blut-DNA; Spur 2) Negativkontrolle (ohne Template).

In Abb. 4.5 sind PCR-Produkte dargestellt, die aus extrahierter DNA dreier verschiedener Lyseansätze amplifiziert wurden. Anhand des Vergleichs der Intensität der Produktbanden (Spur 3-5) ist festzustellen, dass mit dem Standard-DNA-Extraktionspuffer (*Sambrook et al., 1989*) mehr DNA aus den isolierten Zellen extrahiert werden konnte als mit den Extraktionsverfahren mit dem Invitrogen-PCR-Puffer inkl. Proteinase K ohne (Spur 3) und mit anschließender EtOH/NaAc-Präzipitation (Spur 5). Der Standard-DNA-Extraktionspuffer (*Sambrook et al., 1989*) wurde im weiteren Verlauf der Arbeit verwendet.

IV. 1.3 Extrahierte DNA aus Normalgewebe

Damit die Marker für LOH-Analysen auf ihre Informativität untersucht werden können, muss von den Patienten nicht nur malignes, sondern auch normales Gewebe zur Verfügung stehen.

Da nicht von jedem Prostatakarzinompatienten Blut-DNA-Proben für Positivkontrollen zur Verfügung standen, wurde untersucht, ob extrahierte DNA aus Paraffinpräparaten vom Normalgewebe ebenfalls als Positivkontrollen geeignet waren. Dieser Test war notwendig, da die genomische DNA aus Paraffinschnitten, aufgrund der Fixier- und Lagerungsmethoden des

Prostatagewebes, nicht mit DNA aus Vollblut zu vergleichen ist (*Diaz-Cano et al.*, 1997). Zu diesem Zweck wurde die DNA von drei Prostatakarzinompatienten (P1, P2, P3) aus tumorfreien Paraffinpräparaten extrahiert, unspezifisch in einem 50µl I-PEP-Ansatz präamplifiziert und jeweils 1µl des präamplifizierten Produktes mit D10S587, D10S610 und D10S187 amplifiziert (Abb. 4.6).

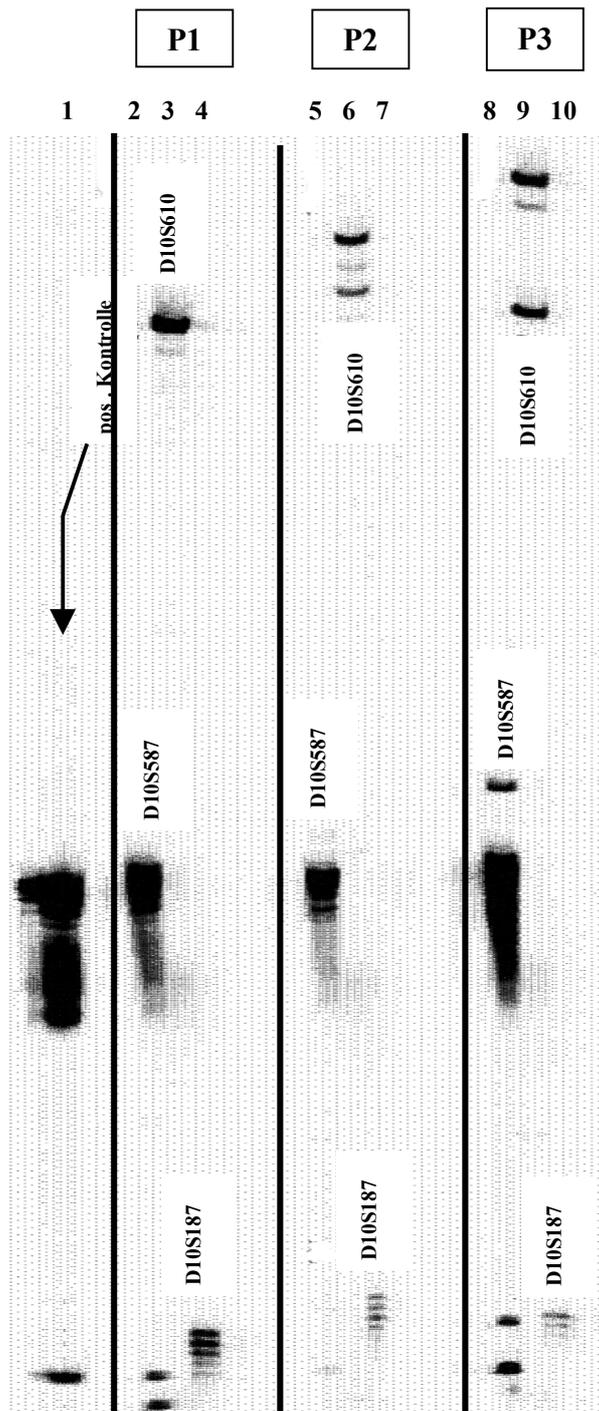


Abb. 4.6: Auf dem 6 % PAA-Gel sind die PCR-Produkte der DNAs aus Kontrollarealen von drei Prostatakarzinompatienten (P1, P2, P3) zu sehen. Die DNA wurde aus Paraffinschnitten extrahiert, mit einer I-PEP präamplifiziert und mit D10S587 (P1, Spur 2; P2, Spur 5; P3, Spur 8), D10S610 (P1, Spur 3; P2, Spur 6; P3, Spur 9) und D10S187 (P1, Spur 4; P2, Spur 7; P3, Spur 10) in einer PCR amplifiziert. Spur 1) Positivkontrolle mit genomischer Blut-DNA (10ng/µl), die mit D10S587 amplifiziert wurden.

Auf dem 6%-PAA-Gel in Abb. 4.6 ist zu erkennen, dass mit den Primern D10S587, D10S610 und D10S187 spezifische Produkte mit den extrahierten DNA-Proben aus manuell isoliertem, in Paraffin eingebettetem Prostatagewebe amplifiziert werden konnten. Somit war es möglich DNA aus Paraffinpräparaten ebenfalls als Positivkontrolle zu verwenden.

Zusätzlich wurde die Informativität der untersuchten Patienten für diese drei Marker bestimmt. Anhand der beiden Hauptbanden, die auf dem Gel in den Spuren 6) und 9) detektiert wurden (Abb. 4.6), konnte festgestellt werden, dass die Patienten P2 und P3 heterozygot, und somit informativ für den Marker D10S610, waren. Bei dem Produkt von P1 (Spur 3) hingegen, war nur eine Hauptbande zu erkennen, was darauf hindeutete, dass P1 homozygot (nicht informativ) in Bezug auf den Marker D10S610 war. Eine Informativität konnte ebenfalls bei P1 und P2 für den Marker D10S187 (Spur 4 und 7) festgestellt werden.

IV. 1.4 Amplifikationsmethode nach *Paulson et al., 1999*

Das primäre Ziel war, aus wenigen Tumorzellen (30-50 Zellen) einer Prostata-drüse, eine LOH-Analyse durchzuführen. Die meisten Prostatakarzinome besitzen keine homogenen Tumorzellenareale, sondern einzelne Tumordrüsen, von denen nicht bekannt ist, ob sie sich aus den selben Ursprungszellen entwickelt haben. Durch die Mikrodissektion von nur einer Tumordrüse kann davon ausgegangen werden, dass es sich genetisch um eine homogene Zellpopulation handelt (Abb. 4.7).

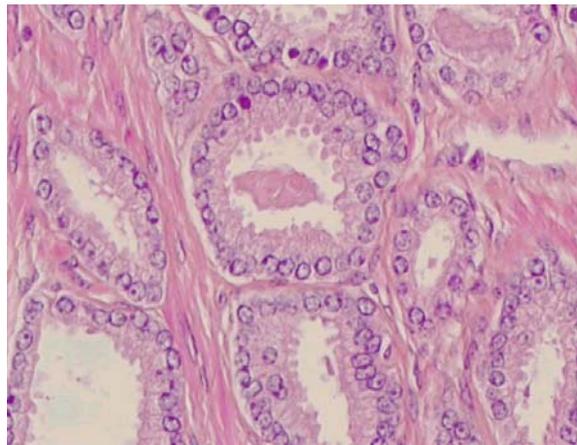


Abb. 4.7: Hoch differenzierte Drüsen eines malignen Prostatakarzinoms

Des Weiteren sind Präparate mit kleinen zusammenhängenden Tumorarealen häufiger vorrätig als Präparate mit großen zusammenhängenden Arealen (mehreren hundert Tumorzellen; Abb. 4.8).

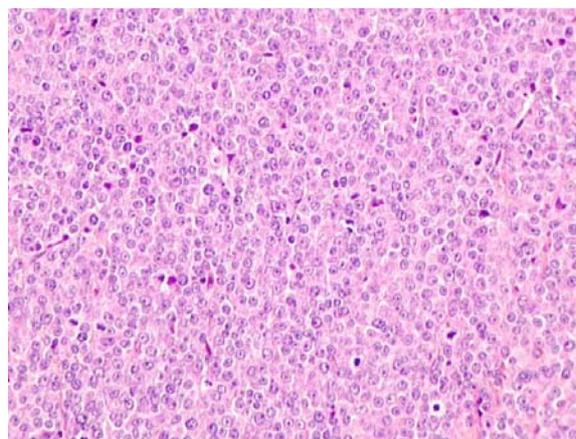


Abb. 4.8: Zusammenhängendes Tumorareal eines Prostatakarzinoms mit nicht mehr zu differenzierten Drüsen.

Mit dem geeigneten Standard-DNA-Extraktionspuffer (*Sambrock et al., 1989*) schien es möglich zu sein, die LOH-Analysen mit einer geringen Zellzahl durchführen zu können. Jedoch war nach dem gängigen I-PEP-Verfahren nach *Dietmaier* die Menge der I-PEP-Produkte so gering, dass die Ergebnisse der spezifischen PCR-Amplifikation mit extrahierter DNA aus mikrodisssektierten, undifferenzierten, malignen Prostatadrüsenzellen nicht reproduzierbar waren. Um die Reproduzierbarkeit zu erhöhen, wurden erstens Präparate ausgewählt, deren Tumorareale aus zusammenhängenden Zellen bestanden, zweitens wurde eine modifizierte I-PEP-Methode nach *Paulson et al., 1999* angewandt, die ursprünglich für die unspezifische Präamplifikation von extrahierter DNA aus Gefrierschnitten (Kryoschnitten) verwendet wurde. Es wurde zunächst ausgetestet, ob das Verfahren nach *Paulson* auch mit Zellen aus Paraffinschnitten angewandt werden konnte.

Das Prinzip nach *Paulson* ist in Abb. 4.9 dargestellt: DNA aus einem Schnittpräparat wurde extrahiert und auf drei unabhängige I-PEP-PCRs verteilt, präamplifiziert und die I-PEP-Produkte anschließend wieder vereinigt. Der Vorteil dieser Präamplifikationsmethode lag darin, dass das Probenvolumen verdreifacht und somit mehrere Versuche mit der DNA des gleichen malignen Areals durchgeführt werden konnte. Zusätzlich konnte ein Amplifikationsfehler in einem der Ansätze durch das Vermischen der I-PEP-PCR-Produkte ausgeglichen werden.

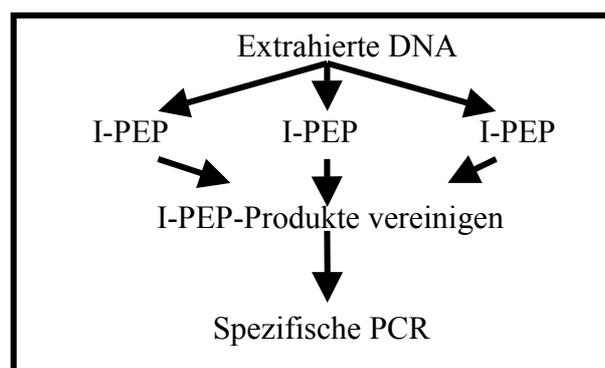


Abb. 4.9: Prinzip des Paulson-Protokolls.

Um die Reproduzierbarkeit des Präamplifikationsverfahrens zu testen, wurden ca. 1000 Zellen aus einem Paraffinschnitt in einen Ansatz mit Standard-Proteinase K-Lysispuffer überführt und lysiert. Die extrahierte DNA wurde auf drei I-PEP-Ansätze verteilt und präamplifiziert. Die Produkte aus je drei I-PEP-Reaktionen (Vol.: 150µl) wurden vermischt und daraus je 5µl in einer spezifischen PCR mit dem Primer D10S1483 amplifiziert.

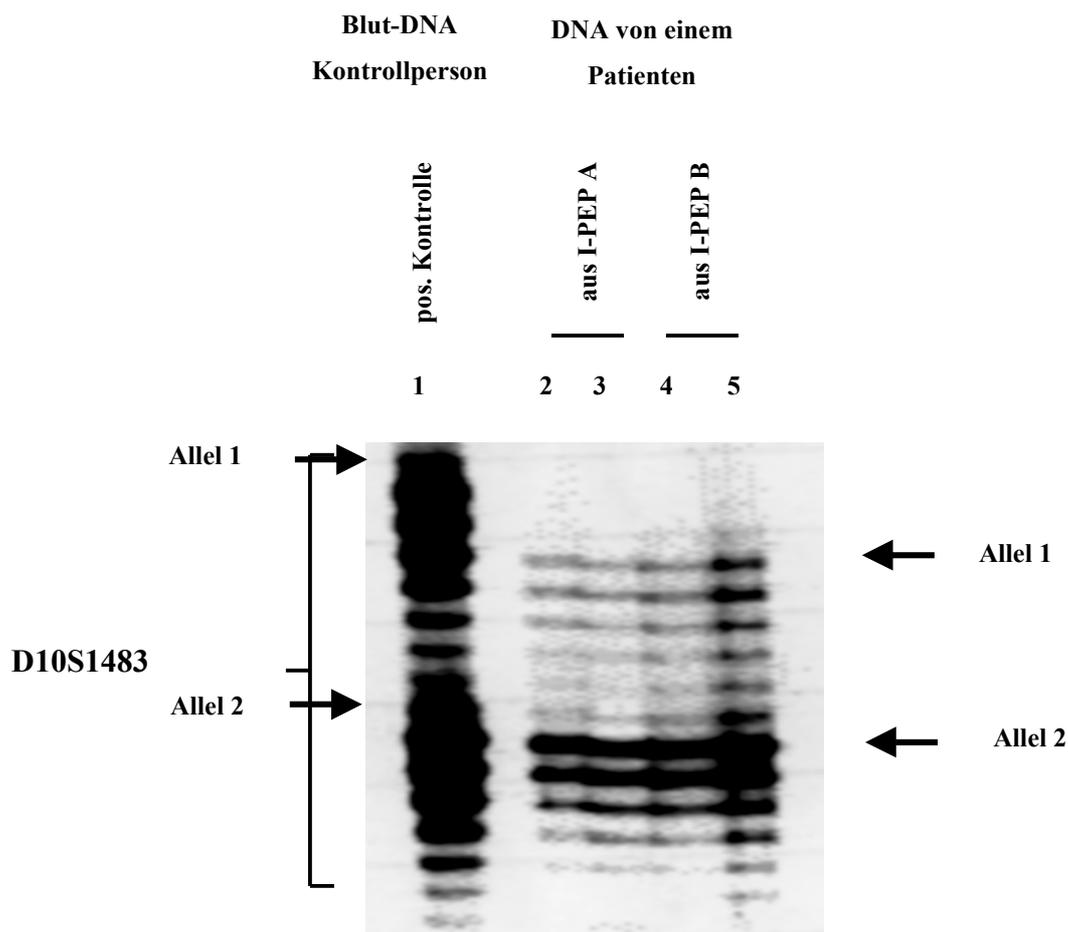


Abb. 4.10: Auf dem 6% PAA-Gel wurden PCR-Produkte, die mit D10S1483 amplifiziert wurde, getrennt. Spur 1) Positivkontrolle: spez. PCR mit 10ng/ μ l Blut-DNA; die Produkte auf den Spuren 2-3) und 4-5) wurden jeweils aus unspezifischen Produkten eines I-PEP-Ansatzes (I-PEP A bzw. I-PEP B) amplifiziert.

In Abb. 4.10 sind in den Spuren 2-3) und 4-5) spezifische PCR-Produkte mit D10S1483 dargestellt, die jeweils aus zusammengeführten (gepoolten) Produkten eines I-PEP-Ansatzes amplifiziert wurden. Durch den Vergleich der Bandenintensität zeigte sich, dass die Intensitäten aller vier Ansätze nahezu identisch waren und somit durch die Methode nach *Paulson* reproduzierbare Ergebnisse erzielt werden konnten. Es zeigte sich, dass das Allel 1 schwächer amplifiziert wird als Allel 2.

IV. 1.5 LOH-Analyse

LOH-Analyse auf 8p12-21

Um feststellen zu können, ob in der isolierten DNA aus Tumorarealen prinzipiell LOHs nachzuweisen waren, wurde eine interne Kontrolle eingeführt. Die DNA wurde zuerst auf Deletionen von Chromosom 8, die als frühe Ereignisse in der Prostatakarzinogenese bekannt waren, untersucht (Yaremko *et al.*, 1995). Für diesen Versuch wurden Präparate von 55 Prostatakarzinompatienten verwendet. Die Tumorareale von Karzinomen der Malignitätsgrade T2 und T3 wurden, wie in II. 2.1.1 beschrieben, markiert und isoliert. Gleichzeitig wurde aus nicht malignen Zellen der Präparate die DNA extrahiert und beide DNAs auf LOH von zwei Markern des Chromosoms 8 (D8S136 und D8S549) analysiert.

Die Tumorpräparate wurden von drei verschiedenen Pathologen erhalten, die Normal- und Tumorareale auf den gefärbten Paraffinschnitten markiert haben:

	Anzahl der Patienten	
	T2	T3
Herr Dr. Müller	1	29
Herr Prof. Dr. Wernert	7	10
Herr Dr. Engers	3	5

Tab.: 4.11: Übersicht der untersuchten Patienten.

Um ein LOH eindeutig zu identifizieren, wurden die Bandenintensitäten der einzelnen Proben mit dem Programm BaseImager IR v 2.30 (Licor) bestimmt. Zur Veranschaulichung der LOH-Analyse wurde die Laufstrecke der Produkte auf den Gelen (y-Achse) gegen die Bandenintensitäten der Amplifikate (x-Achse) graphisch dargestellt (Abb. 4.3).

Ein LOH kann nur bei Patienten, die heterozygot für einen Marker sind, nachgewiesen werden. Wenn die Intensität der oberen und unteren Hauptbande (dabei handelt es sich um die Allele) zwischen den PCR-Produkten aus der DNA der Normalzelle und Tumorzelle nicht voneinander abweichen, ist in dem untersuchten Marker kein LOH vorhanden. Bei einem LOH hingegen ist die Intensität einer der Banden zwischen den PCR-Produkten aus der DNA der Normalzelle und Tumorzelle eindeutig reduziert. (Abb. 4.11, Abb. 4.13; reduzierte Intensität in Tumorzellen, siehe Pfeile).

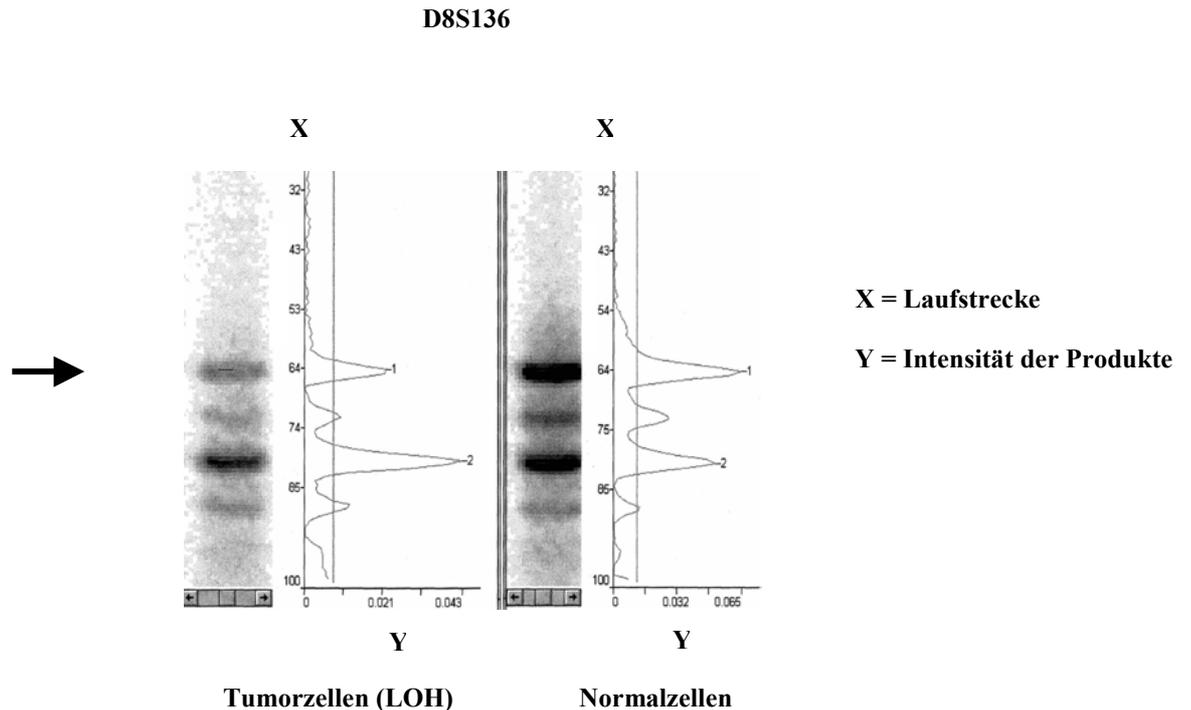


Abb. 4.11: Beispiel einer LOH-Analyse eines Patienten auf einem automatischen Sequenziergerät (LICOR) dargestellt auf einem 6 %-igen PAA-Gel (x = Laufstrecke der Produkte, y = Intensität der Produkte). Der Pfeil zeigt das LOH an. Die Tumor- und Normal-DNA des Patienten wurde mit D8S136 amplifiziert.

In Abb. 4.11 ist die LOH-Analyse eines Patienten dargestellt, der heterozygot für den polymorphen Marker D8S136 war. Die beiden Allele, die aus der DNA nicht maligner Zellen amplifiziert wurden, waren in ihrer Intensitäten identisch, wohingegen bei der Amplifikation der DNA aus den Tumorgeweben die Intensität eines Allel im Vergleich zum zweiten Allel schwächer war. Somit handelte es sich bei dem beobachteten Fall um ein LOH. Die Reduktion der Intensität eines der beiden Allele (demzufolge keine vollständige Deletion des Allels) zeigt zwar LOH an, jedoch weist dies gleichzeitig darauf hin, dass entweder noch relativ viele Normalzellen in der Probe vorhanden waren oder nicht alle Tumorzellen ein LOH hatten (Heterogenität).

LOH-Analyse auf 10q26

Für die LOH-Analyse von 10q26 wurden vier polymorphe Marker verwendet, welche die zu untersuchende Region abdeckten (Leube et al., 2002) und mit denen aus paraffinextrahierter DNA Produkte amplifiziert werden konnten (Leube et al., 2002): D10S209, D10S1679, D10S1483 und D10S587 (Abb.: 4.12).

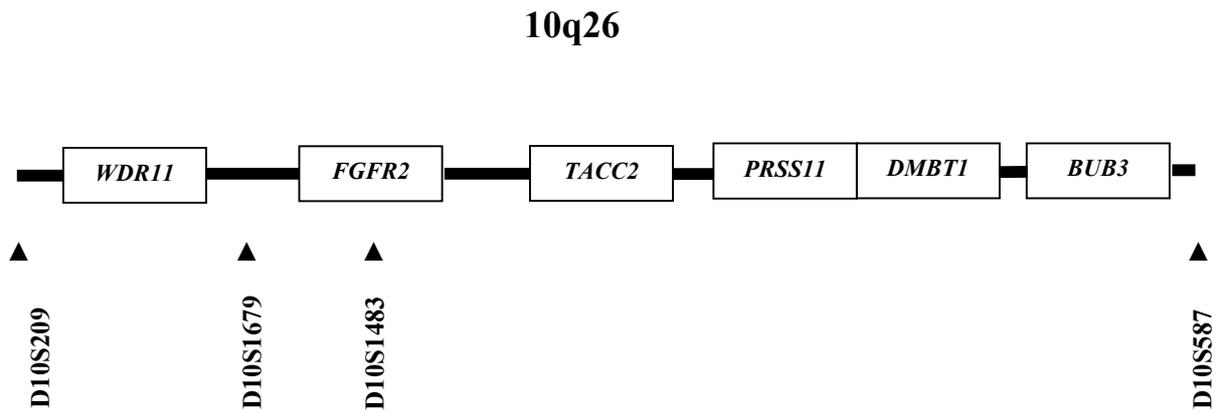


Abb. 4.12: Schematische Darstellung der Position der untersuchten polymorphen Marker und die Position bekannter Gene in 10q26, die im Laufe dieser Arbeit im Rahmen des Genomprojektes in dieser Region lokalisiert wurden.

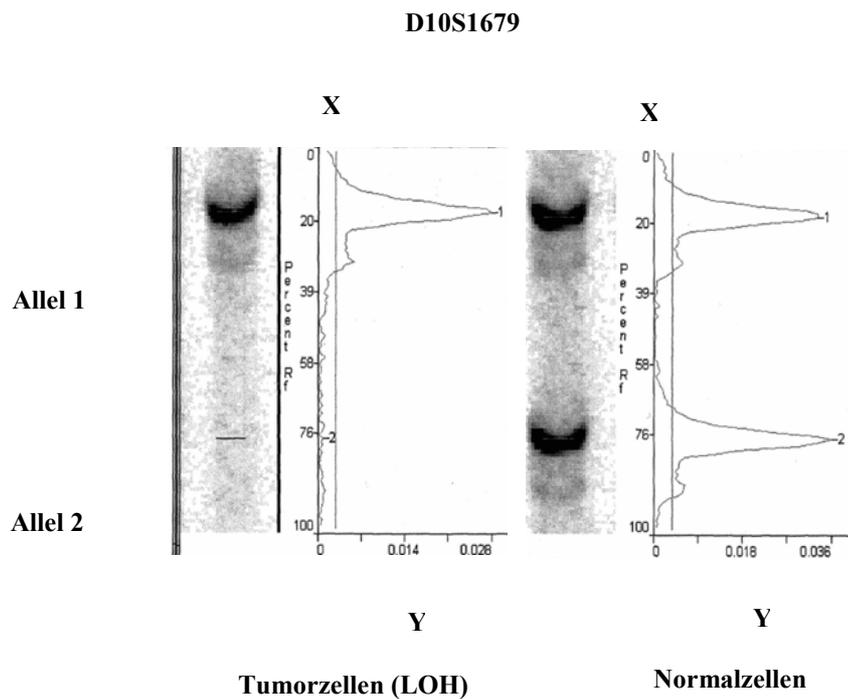


Abb. 4.13: Beispiel eines LOH des Markers D10S1679 auf Chromosom 10 im Tumor des Patienten B. Allel 2 fehlt im Tumor. x = Laufstrecke der Produkte, y = Intensität der Produkte

Die Abb. 4.13 zeigt die LOH-Analyse eines Patienten, der heterozygot für den Marker D10S1679 ist.

Die LOH-Analysen von zwei Markern auf Chromosom 8 und vier Markern des Chromosoms 10 wurden insgesamt an 55 Patienten durchgeführt (Ergebnisse siehe Tabelle 4.2).

LOH-Auswertung an 55 Patienten in der Region 8p12-21(8p) und 10q26 (10q)

Anzahl der Patienten		Malignitätsgrad des Karzinoms	LOHs im Bereich von	
			8p	10q
Dr. Müller	30	T2 (1)	0	0
		T3 (29)	0	0
Prof. Wernert/Dr. Engers	25	T2 (10)	6 (60%)	0
		T3 (15)	10 (66%)	1 (6,6%)

Tabelle 4.2: LOH-Auswertung von zwei Patientenkollektiven (Müller und Wernert/Engers) mit insgesamt 55 Tumorproben. T2 und T3 = Malignitätsgrad des Karzinoms.

Es zeigte sich, dass in Paraffinpräparaten des ersten Patientenkollektivs, ausgewertet von Dr. Müller, weder in Chromosom 8 noch Chromosom 10 LOHs detektiert werden konnte. Dies ist vermutlich darauf zurückzuführen, dass die Tumoreale der Schnittpräparate nicht exakt markiert wurden und zu viele Normalzellen enthielten.

In den Paraffinpräparaten, die von Prof. Wernert und Dr. Engers ausgewertet wurden, konnten LOHs auf Chromosom 8 mit der erwarteten Frequenz von ca. 60 % gefunden werden. Dies zeigt, dass die angewandte Technik für die LOH-Analyse geeignet ist. Bei den T3-Karzinomen wurden in 10 von 15 Fällen (66%) LOHs in der Region 8p12-23 detektiert. Bei diesen 15 Tumoren wurde nur bei einer der Proben eine Deletion der Marker D10S209, D10S1679, D10S1483 und D10S587 in Chromosom 10 detektiert. Diese Deletion ist sehr groß und umspannt den gesamten zu untersuchenden Bereich. In der DNA von T2-Karzinomen des zweiten Patientenkollektivs konnten LOHs in 8p12-21 bei 7 von 10 Personen (70%), jedoch nicht in der Region 10q26 detektiert werden.

Die Paraffinblöcke der Tumoren wurden von mir unter der mikroskopischen Kontrolle von Herrn Prof. Wernert so zugeschnitten, dass sich im Schnittpräparat nur Tumorzellen befanden. Dadurch konnten bei diesen Präparaten die malignen Bereiche der T2 und T3-Karzinomen, mit einem Skalpell isoliert werden. Hierdurch wurde gezeigt, dass die Methode der LOH-Analyse mit DNA-Material aus paraffineingebettetem Gewebe erfolgreich

angewandt werden konnte. Deletionen von Chromosom 10 kommen sehr selten vor und wenn, dann sind sie nur bei T3-Tumoren zu finden. Da, wie zuvor erwähnt, T3-Tumore sehr selten operiert werden, sind aus diesem Grunde wenig Paraffinpräparate vorhanden. Daher konnten mit diesem Ansatz die Region 10q26 nicht weiter eingegrenzt werden.

LOH-Analyse von Genen in 10q26

Zunächst wurde die LOH-Analyse mit polymorphen Markern zwischen D10S209 und D10S587 durchgeführt, welche nicht in bekannten Genen der Region 10q26 lokalisiert waren. Im Folgenden sollte untersucht werden, ob eventuell ein LOH begrenzt auf ein einziges Gen dieser Region nachzuweisen war. Zu den bekannten Genen, die im Laufe dieser Arbeit in dieser Region lokalisiert wurden, gehören (Abb. 4.12):

- WDR11 gehört zu der Familie von Proteinen mit einer WD 40-Domäne, die an Proteininteraktionen beteiligt sind. *WDR11* wird ubiquitär exprimiert und scheint in der Tumorgenese mehrerer Karzinome (Prostatakarzinom und Glioblastom) involviert zu sein (*Chernova et al., 2001*).
- FGFR2 (fibroblast growth factor receptor) wird in Epithelzellen exprimiert und ist ein Rezeptor für FGF7, das in Stromazellen exprimiert wird. Durch die Interaktion beider Proteine wird eine kontrollierte Proliferation der Epithel-, wie auch der Stromazellen gewährleistet (*Naimi et al., 2002*).
- TACC2 (transforming acidic coiled-coiled) ist während der S-Phase konzentriert am Zentromer lokalisiert. Die C-terminale Domäne des Proteins kann mit den Mikrotubuli interagieren und somit die Segregation ermöglichen (*Gergely et al., 2000*).
- PRSS11 ist eine Serin-Protease, welche durch die Regulation der Aktivität der IGF-Bindeproteine die kontrollierte Differenzierung und Proliferation der Prostatazellen ermöglicht (*Zumbrunn et al., 1997*).
- BUB3 (budding uninhibited by benzimidazole) dient als Plattform für kinetochore Proteine (z.B. Cdc20), die bei chromosomalen Defekten die Segregation bis zur Reparatur des Defektes hinauszögern und somit die Genomstabilität sichern (*Fraschini et al., 2001*).

Alle fünf Gene sind von ihrer bisher bekannten Funktion interessante Kandidatengene für das gesuchte Tumorsuppressorgen.

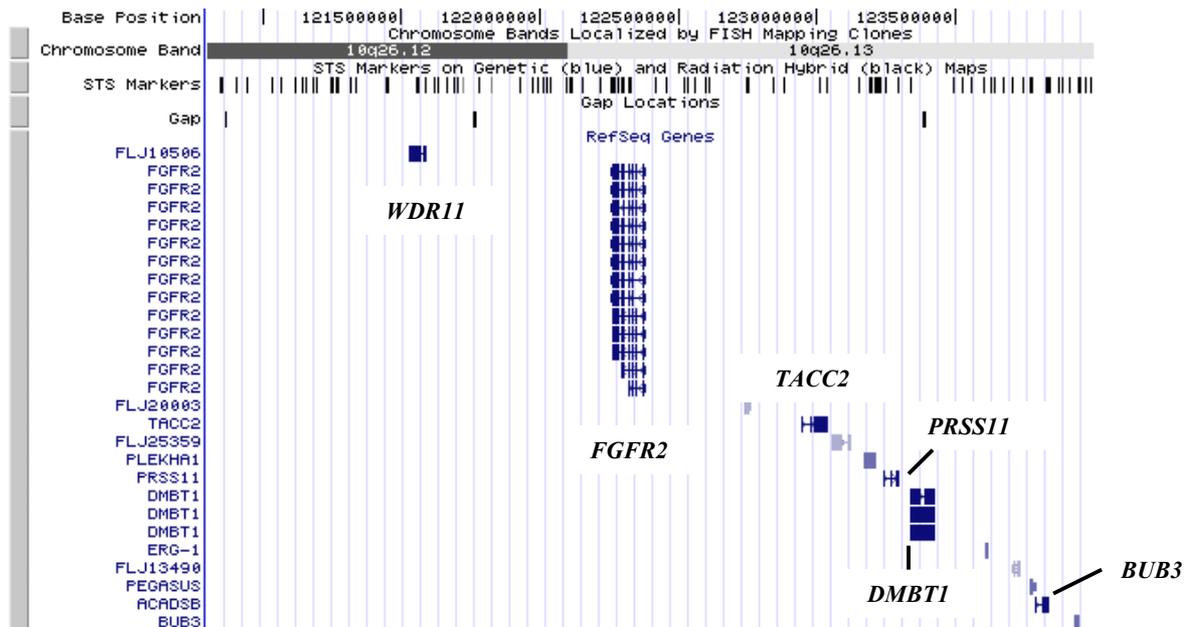


Abb. 4.12: Lokalisation bekannter Gene in 10q26 (aus www.genome.ucsc.edu)

Für die LOH-Analyse wurden zuerst polymorphe Mikrosatellitenmarker in den Genen mit Hilfe der Genomsequenz identifiziert (Abb. 4.12). Die Sequenzen wurden auf Wiederholungen von Di-, Tri- oder Tetranukleotiden untersucht (Epplen *et al.*, 1988), z.B. $(CA)_n$ -Wiederholungen (Repeats), die im Genom alle 25–100kB vorzufinden sind. Da für die LOH-Analysen nur hoch polymorphe Marker mit mindestens 20 CA-Wiederholungen geeignet sind, können für solche Analysen nur ein Fünftel dieser Repeats verwendet werden (Cornelis *et al.*, 1992). Aufgrund dieser Auswahlkriterien konnten nur zwei Marker im Intronbereich von *WDR11* (mit 10 CA-Wiederholungen) und *FGFR2* (mit 21 CA-Wiederholungen) für die LOH-Analyse der bekannten Genen von 10q26 ausgewählt werden.

Polymorphismusanalyse des Markers in *WDR11*

Als erstes musste analysiert werden, ob der gewählte Marker polymorph ist. Dafür wurde eine Analyse von DNA-Proben einer achtköpfigen Familie durchgeführt.

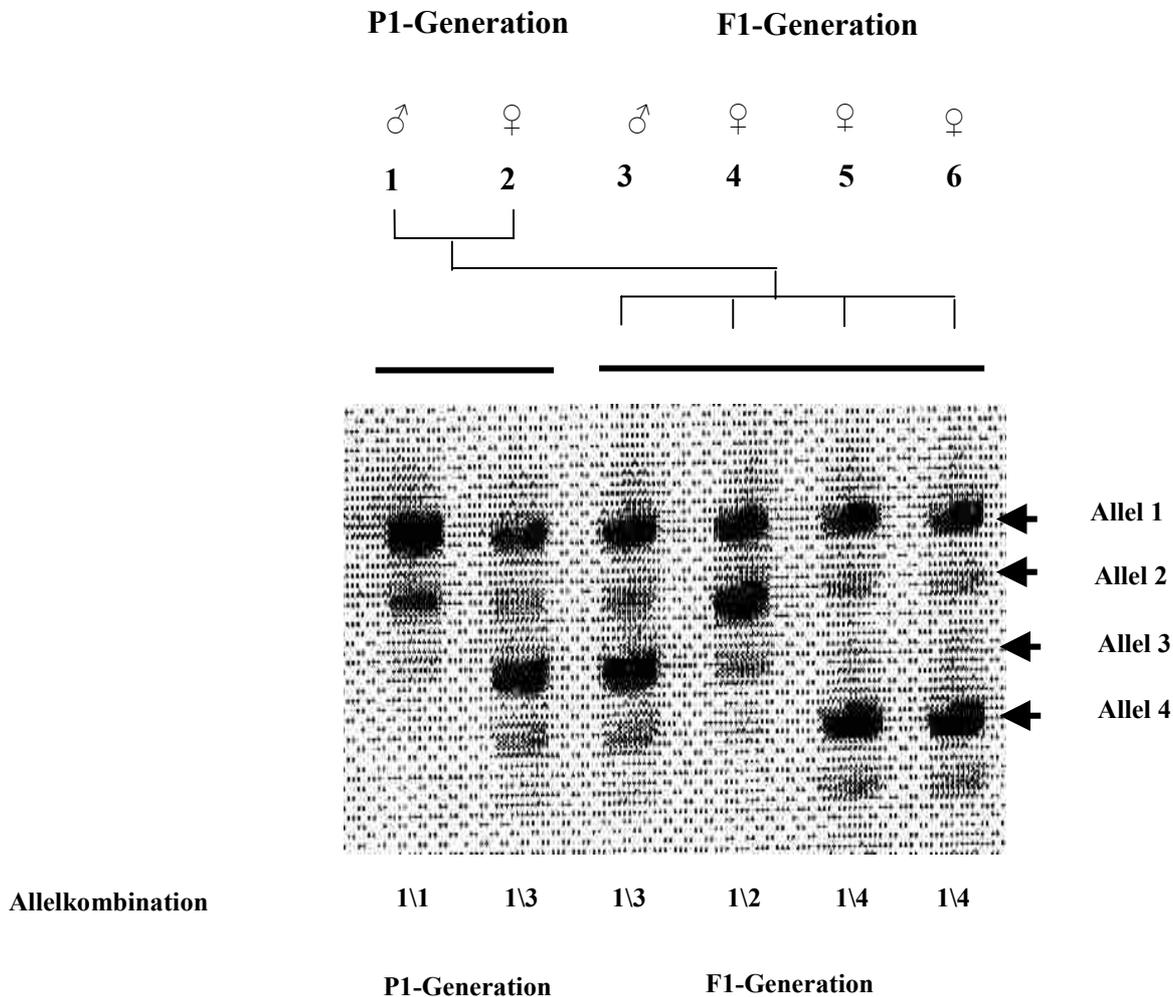


Abb. 4.13: Der Stammbaum und die Polymorphismusanalyse einer Familie mit zwei Generationen.

In Abb. 4.13 ist die Analyse an einer Familie mit zwei Generationen (2 Personen in der P1-Generation, 4 Personen in der F1-Generation) mit dem Primerpaar *WDR11a* und *b* zu erkennen. In der P1-Generation war der Vater (Spur 1) für den Marker in *WDR11* homozygot (Allel 1), was an der ersten oberen Hauptbande zu erkennen ist. Die Mutter (Spur 2) war für den Marker in *WDR11* heterozygot (zwei Hauptbanden Allel 1 und 3). In der F1-Generation waren alle vier Personen in Bezug auf den untersuchten Marker informativ (heterozygot) (Spuren 3-6).

Mit diesem Test wurde zwar bestätigt, dass der Marker im Gen *WDR11* polymorph war, jedoch führte die Polymorphismusanalyse der untersuchten Familie zu folgender Erkenntnis:

Theoretisch müssten bei allen Personen der F1-Generation nur Allele der P1-Generation zu detektieren sein. Dies war jedoch nur bei einer Person der Fall (Spur 3). Bei allen anderen Individuen der P1-Generation konnte anhand des Bandenmusters in den Spuren 4-6 erkannt werden, dass ein Allel (Allele 2 oder 4) nicht von der Parental (P1)-Generation vererbt worden war. Somit war die Wahrscheinlichkeit sehr hoch, dass es sich bei diesen drei Personen nicht um leibliche Kinder des Vaters in der P1-Generation handeln konnte.

Diese Marker konnten also für die LOH-Analyse des *WDR11*-Gens verwendet werden. Es wurden DNA-Proben von 11 Prostatakarzinompatienten, deren Karzinome den Malignitätsgrad von G3 hatten, untersucht. Bei sechs dieser Patienten konnte zuvor in der Region 8p12-21 ein LOH detektiert werden (siehe Tabelle 4.2). Hintergrund dieser Auswahl war, dass Deletionen in der Region 8p12-21, im Gegensatz zur Region 10q26, ein primäres Ereignis waren und somit die Detektion eines LOHs in dem zu untersuchenden Gen in 10q26 wahrscheinlicher war.

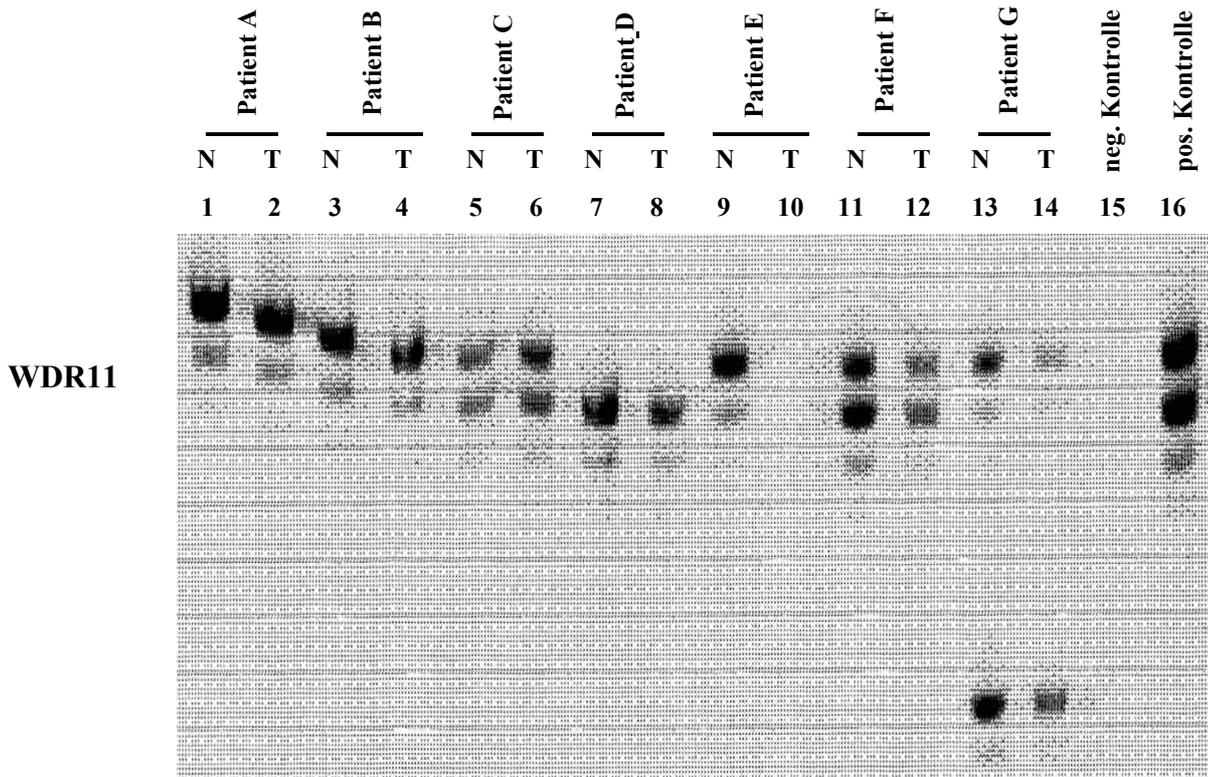


Abb. 4.14: LOH-Analyse mit dem Primerpaar WDR11a/WDR11b an sieben Prostatakarzinomproben.

Pos. Kontrolle = 10ng/μl Blut-DNA;

N = DNA aus Normalzellen;

T = DNA aus Tumorzellen.

In Abb. 4.14 ist beispielhaft die LOH-Analyse von *WDR11* an 7 Proben dargestellt. Die Patienten C, F und G waren heterozygot im untersuchten polymorphen Marker in *WDR11*, was an den gleichen Intensitäten der beiden Hauptbanden zu sehen ist (Patient C, Spuren 5 und 6; Patient F, Spuren 11 und 12; Patient G, Spuren 13 und 14). Diese hatten jedoch keine LOHs in den Tumorproben (Patient C, Spur 6; Patient F, Spur 12; Patient G, Spur 14). Die Personen A, B, D, E sowie die nicht gezeigten restlichen vier Patienten, die untersucht wurden, waren für diesen Marker homozygot. Mit der DNA aus den Tumorzellen des Patienten E konnten keine Produkte amplifiziert werden.

Dass nur 3 von 11 Proben heterozygot für den Marker waren, weist darauf hin, dass der Marker im *WDR11* niedrig polymorph war.

Polymorphismusanalyse des Markers im FGFR2-Gen

Recherchen ergaben, dass der Marker D10S1483 in *FGFR2* liegt. Dieser war bereits an 55 Proben untersucht worden und es konnte kein LOH detektiert werden (siehe: *LOH-Analyse auf 8p12-21 und 10q26*).

IV. 2 HPC2/ELAC2

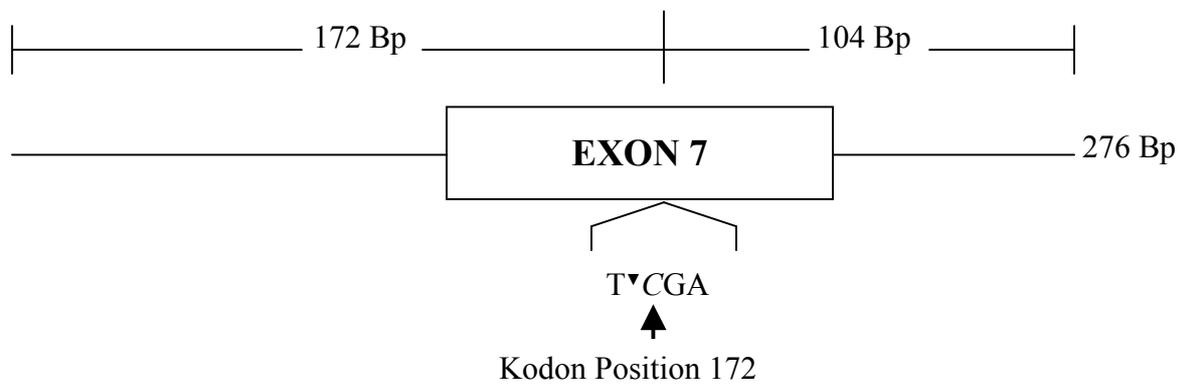
Im zweiten Teil der Dissertation wurde untersucht, ob Mutationen in Exon 7 und 17 von *HPC2/ELAC2* mit einem erhöhten Risiko für das Prostatakarzinom korreliert (*Tavtigian et al., 2001*). Mit DNA-Proben von kaukasoiden Patienten und Kontrollpersonen sollte das mögliche Risiko einer erhöhten Inzidenz mit Hilfe von Polymorphismusanalysen an PCR-Produkten beider Exons des putativen Prostatakarzinomgens untersucht werden.

Für die Untersuchungen wurden DNA-Proben aus Vollblut von 184 Prostatakarzinompatienten, die nach dem 60. Lebensjahr erkrankt waren, und 185 unselektionierten Kontrollpersonen verwendet. Die Blut-DNAs der Patienten wurden von Herrn Dr. Schultz (Urologisches Institut Düsseldorf) und Herrn Prof. Dr. Schäfer (Pathologisches Institut Berlin) und das Blut der Kontrollpersonen von Herrn Dr. Enczmann (Blutbank der Knochenmarkspendeezentrale der Universitätsklinik Düsseldorf) zur Verfügung gestellt.

IV. 2.1 Polymorphismusanalyse in HPC2/ELAC2

Restriktionsanalyse von Exon 7

Für die Amplifikation des 276 Bp großen Produkts von Exon 7 wurde ein Primerpaar in Intron 7 und 8 (m5B und m5Q) ausgewählt (*Tavtigian et al., 2001*). An Position 171-174 des PCR-Produkts befand sich bei dem Wildtyp (WT) eine Restriktionsenzymschnittstelle für Taq α I (T \blacktriangledown CGA), die gleichzeitig die kodierende Sequenz von Serin (TCG) war (Abb. 4.15). Mit diesem Enzym konnte das PCR-Produkt in zwei Fragmente von 172 und 104 Bp Größe geschnitten werden. War hingegen die Sequenz durch eine C \rightarrow T-Transition in TT \blacktriangledown G (kodierende Sequenz für Leucin) verändert, wurde die DNA nicht geschnitten. Durch diese Begebenheit konnten anhand von Restriktionsanalysen die Allele der einzelnen Personen für Exon 7 an der Position 172 bestimmt werden (Allelkombinationen: Serin/Serin; Leucin/Leucin; Serin/Leucin). Als Kontrolle diente jeweils das ungeschnittene PCR-Produkt (Abb. 4.16).



▼ = Schnittstelle von $Taq\alpha I$

Abb. 4.15: Die $Taq\alpha I$ -Schnittstelle in dem 276 Bp großen PCR-Produkt von Exon 7 (WT).

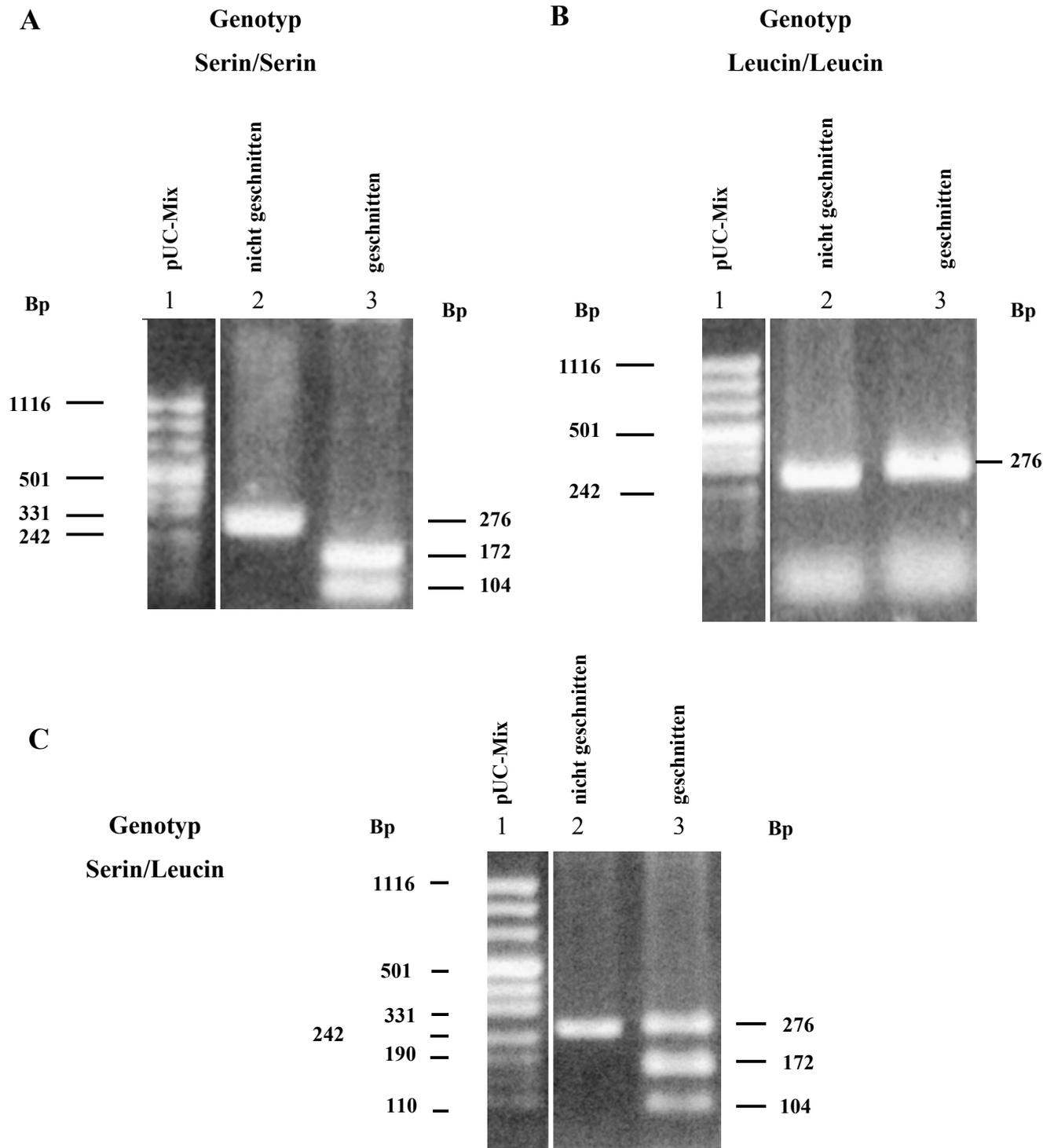


Abb. 4.16: Restriktionsanalyse des PCR-Produkts von Exon 7 in *HPC2/ELAC2* mit *TaqI*. Auf den 2% TAE-Agarosegelen wurden folgende Proben getrennt (jeweils Spuren 2 und 3): A) die homozygote Form Serin/Serin und B) die homozygote Form Leucin/Leucin. C) heterozygote Form Serin/Leucin. In Spur 1 ist jeweils der Größenmarker pUC-Mix zu sehen. Da sich die geschnittenen und ungeschnittenen Proben in verschiedenen Reaktionspuffern mit unterschiedlichen Salzkonzentrationen befinden (das ungeschnittene Produkt im PCR-Puffer mit 25mM $MgCl_2$; das geschnittene Produkt im Restriktionspuffer mit 50mM KCl), variiert das Laufverhalten der Produkte geringfügig im Gel.

Zur Verifizierung der Ergebnisse der geschnittenen PCR-Produkte von Exon 7 erfolgte eine Sequenzanalyse. Für diesen Zweck wurde repräsentativ die DNA je eines Patienten und einer Kontrollperson untersucht, die in der Restriktionsanalyse die gleichen Allelkombinationen aufwiesen (insgesamt sechs Personen).

In Abb. 4.17 sind exemplarisch die Sequenzanalysen der Taq α I-Restriktionsschnittstellen der PCR-Produkte von Exon 7 dreier Patienten wiedergegeben. Die Untersuchung der Nukleotidsequenzen zeigte, dass sich bei der WT-Variante von Exon 7 (1) an der Position 172 das Nukleotid Cytosin befindet. Bei den Trägern der heterozygoten Variante (2) ist an dieser Position in einem Allel Cytosin durch Thymin ersetzt worden. Daher erscheinen die Peaks, die bei einer Sequenzanalyse ein bestimmtes Nukleotid symbolisieren (blau: Cytosin, rot: Thymin) in der Abbildung gleich hoch. Bei dem homozygoten Mutationsträger wurde in beiden Allelen Cytosin durch Thymin ersetzt (3). Die Sequenzanalysen bestätigten in allen Fällen die durch die Restriktionsanalyse ermittelten Genotypen in Exon 7 der untersuchten Probanden.

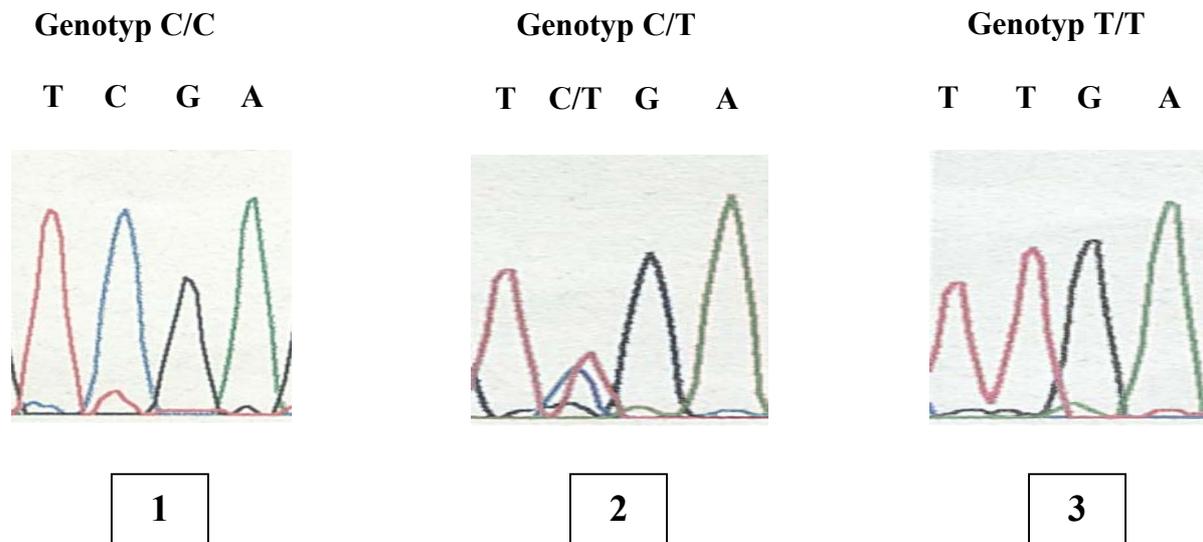


Abb. 4.17: In der Abbildung ist die Sequenzanalyse (rot: Thymin, schwarz: Guanin, grün: Adenin, blau: Cytosin) von Exon 7 um das Nukleotid 172 der homozygoten Form C/C (1; WT), der heterozygoten Form C/T (2) und der homozygoten Form T/T zu erkennen (3). Bei der heterozygoten Form C/T ist in einem Allel Cytosin durch Thymin ausgetauscht worden, so dass die absoluten Maxima für beide Nukleotide an der Stelle 172 gleich hoch sind.

In Tabelle 4.3 ist die Verteilung der Allelkombinationen bei den untersuchten Patienten und Kontrollpersonen dargestellt. Der prozentuale Anteil der Patienten bei denen das Exon 7 den Genotyp Ser/Ser hat, ist mit 50,5% höher als bei den Kontrollpersonen (45,4%). Der Anteil

der Ser/Leu-Genotypen ist bei den Patienten niedriger (40,8%; Kontrollpersonen 47,0%), wohingegen der homozygote Leu/Leu-Genotyp bei den Patienten häufiger auftrat als bei den Kontrollpersonen (8,7% zu 7,6%).

Exon 7	Patienten	Kontrollpersonen
Allelkombinationen	Anzahl (%)	Anzahl (%)
Ser/Ser	93 (50,5%)	84 (45,4%)
Ser/Leu	75 (40,8%)	87 (47,0%)
Leu/Leu	16 (8,7%)	14 (7,6%)
	184 (100,0%)	185 (100,0%)

Tabelle 4.3: Zusammenfassung der Ergebnisse der Restriktionsanalyse an PCR-Produkten von Exon 7 des putativen Prostatakarzinomgens HPC2/ELAC2

Analyse von Exon 17

Nach *Tavtigian et al., 2001* ist das Risiko einer Prostatakarzinominzidenz erhöht, wenn in Exon 17 eine Variation, die mit einem Basenaustausch in Exon 7 gekoppelt ist, auftritt. Aus diesem Grund wurden für die Polymorphismusanalysen in Exon 17 nur DNA-Proben der Personen verwendet, die Variationen in der Taq α I-Schnittstelle in Exon 7 aufwiesen. Es handelte sich dabei um 91 (75x Ser/Leu und 16x Leu/Leu; Tab. 4.3) der 184 Patienten (49,5%) und um 101 (87x Ser/Leu und 14x Leu/Leu; Tab. 4.3) der 185 Kontrollpersonen (54,6%). Die 418Bp große Region um Exon 17 wurde mit einem Primerpaar in Intron 17 und 18 (m15A/m15RFLP.R) amplifiziert und mit Fnu4H1 geschnitten (*Tavtigian et al., 2001*).

Das amplifizierte Produkt enthielt drei Erkennungsstellen für das Restriktionsenzym Fnu4H1 (GC \blacktriangledown NGC), in denen jeweils das Kodon für Alanin (GC \blacktriangle T) enthalten war (Abb. 4.18). Die aus der Restriktion resultierenden vier Fragmente waren 250, 68, 52 und 49Bp groß. Durch eine Transition in der Erkennungssequenz 352 des amplifizierten Produktes (GCT = Alanin \rightarrow A \blacktriangledown CT = Threonin) ging eine der Fnu4H1-Schnittstellen verloren. Anstelle der 68Bp und 52Bp großen Fragmente ergab die Restriktion des PCR-Produktes des veränderten Exon 17 ein 120Bp großes Fragment.

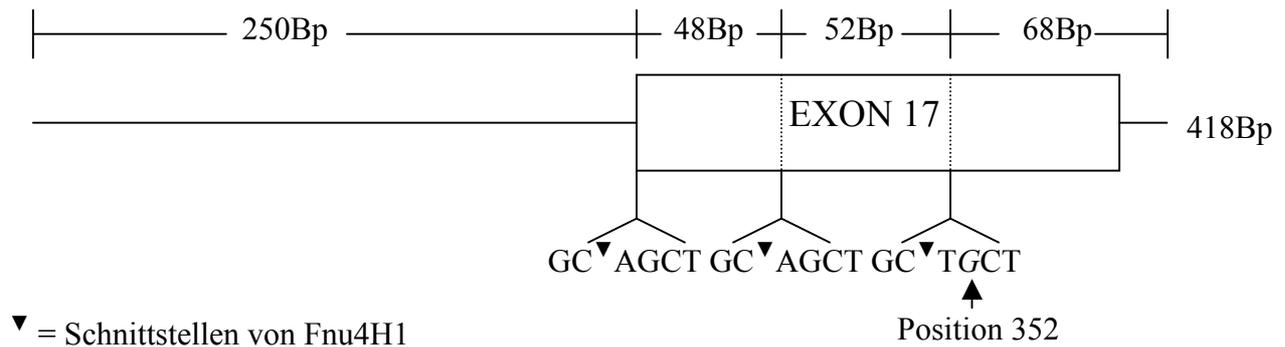


Abb. 4.18: Die Fnu4H1-Schnittstellen in dem 418Bp großen PCR-Produkt in Exon 17 (WT), Positionen: 249-254, 297-302 und 349-354.

Da die Fragmente der Größe von 52Bp und 48Bp des geschnittenen PCR-Produktes von Exon 17, die zur Identifizierung der Genotypen beitragen, auf einem Agarose- oder PAA-Gel nicht eindeutig differenziert werden können, wurde ein anderes Analyseverfahren gewählt. Für die Auswertung der amplifizierten PCR-Produkte wurde die DHPLC-Analyse eingesetzt, mit deren Hilfe heterozygote Variationen in PCR-Produkten identifiziert werden können.

Zur Interpretation der Ergebnisse der DHPLC-Analyse wurden die Proben von 10 Probanden sequenziert und die graphischen Darstellungen der DHPLC-Analyse den Sequenzen zugeordnet.

Ein Teil der Sequenzanalyse von Exon 17 ist in Abb 4.19 wiedergegeben. Die Untersuchung der Nukleotidsequenzen zeigte bei der nicht veränderten Variante von Exon 17 (1) an der Position 352 das Nukleotid Guanin. Bei dem heterozygoten Variationsträger (2) ist an dieser Position in einem Allel Guanin durch Adenin ersetzt worden. Daher erscheinen die Peaks, die bei einer Sequenzanalyse ein bestimmtes Nukleotid symbolisieren (schwarz: Guanin, grün: Adenin), auf der Abbildung gleich hoch.

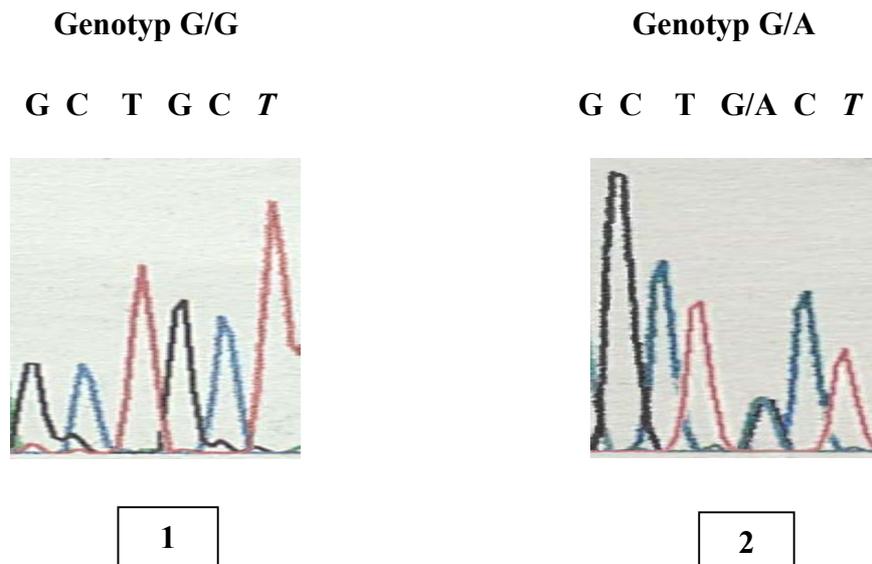


Abb. 4.19: Die Sequenzanalyse (rot: Thymin, schwarz: Guanin, grün: Adenin, blau: Cytosin) von Exon 17 um das Nukleotid 419 zeigt den homozygoten und heterozygoten Genotyp der Sequenz.

In Abb. 4.20 sind graphische Darstellungen von DHPLC-Analysen der PCR-Produkte von zwei verschiedenen Personen mit unterschiedlichen Varianten in Exon 17 dargestellt. Personen mit dem heterozygoten Genotyp (Alanin/Threonin) zeigten eine Kurve mit einem relativen und einem absoluten Maximum (Abb 4.20; Bild 1). Personen mit einem homozygoten Genotyp zeigten in der DHPLC-Analyse eine Kurve mit nur einem Maximum. Leider kann mit dieser Methode zwischen den homozygoten Genotypen Alanin/Alanin und Threonin/Threonin nicht unterschieden werden (Abb 4.20; Bild 2).

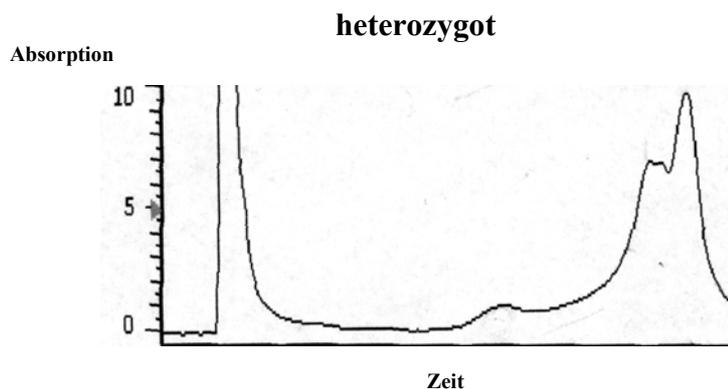
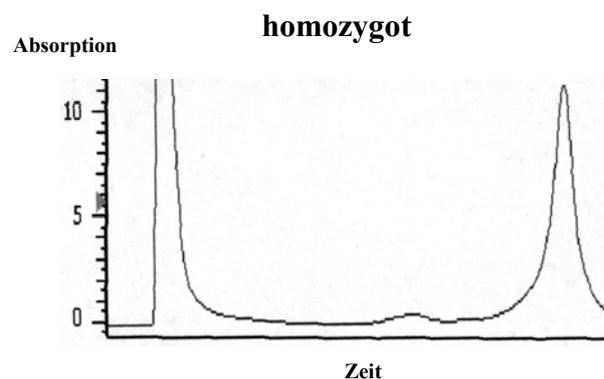
Bild 1**Bild 2**

Abb. 4.20: Graphische Darstellung der DHPLC-Analyse der PCR-Produkte von Exon 17 zweier verschiedener Probanden. In der Graphik ist die Absorption der Produkte in Abhängigkeit von der Zeit dargestellt: Bild 1) DNA eines Probanden mit heterozygoter Variante in Exon 17 (das relative stellt die Heteroduplices, das absolute Maximum die Homoduplices dar); Bild 2) DNA eines Probanden ohne Veränderungen in Exon 17 an der Position 419.

Da die homozygoten Genotypen Alanin/Alanin und Threonin/Threonin in der DHPLC-Analyse nicht zu unterscheiden waren, wurde eine Restriktionsanalyse mit dem Enzym Fnu4H1 durchgeführt. Bei der Restriktion des 418Bp großen PCR-Produkts (Abb. 4.18) des homozygoten Genotyps Alanin/Alanin sollten 250Bp, 68Bp, 52Bp und 48Bp große Fragmente entstehen. Auf einem 2% Agarosegel sind die drei Fragmente der Größe von 250Bp, 68Bp und 52/48Bp zusammen zu erkennen. Im Gegensatz dazu, ist beim homozygote Genotyp Threonin/Threonin die Fnu4H1-Restriktionsstelle auf der Position 352 des PCR-Produktes mutiert, so dass anstelle der 68Bp, 52Bp großen Fragmente ein 120Bp Fragment (zum 250Bp und 48Bp) welches auf dem Agarosegel deutlich von dem 68Bp großen Fragments des Alanin/Alanin Genotyps unterschieden werden kann.

Anhand der Restriktionsanalyse enthielt keine der untersuchten Proben den Genotyp Threonin/Threonin.

In der Tabelle 4.4 sind die Ergebnisse der DHPLC-Analyse der PCR-Produkte von Exon 17 zusammengefasst. Der prozentuale Anteil des heterozygoten Genotyps Ala/Thr bei den Patienten (3,3%) wich nur geringfügig von den Kontrollpersonen ab (3%). Der prozentuale Anteil der Patienten ohne Veränderungen in Exon 17 (96,7%) war geringfügig niedriger als bei den Kontrollpersonen (97%).

Exon 17	Patienten	Kontrollpersonen
Allelkombinationen	Anzahl (%)	Anzahl (%)
Ala/Ala	88 (96,7%)	98 (97%)
Ala/Thr	3 (3,3%)	3 (3%)
Thr/Thr	0	0
	91 (100%)	101 (100%)

Tabelle 4.4: Zusammenfassung der Ergebnisse der DHPLC-Analyse der PCR-Produkte von Exon 17 des putativen Prostatakarzinomgenes *HPC2/ELAC2*

Zusammenfassung der Analysen von Exon 7 und 17 des HPC2/ELAC2-Gens

Für die Auswertung der Genotypen von Exon 7 und 17 wurden die Ergebnisse in der Tabelle 4.5 zusammengefasst.

Genotypen		Patienten	Kontrollpersonen
Exon 7	Exon 17	Anzahl (%)	Anzahl (%)
Ser/Ser	Ala/Ala	93 (50,5%)	84 (45,4%)
Ser/Ser	Ala/Thr	0	0
Ser/Ser	Thr/Thr	0	0
Ser/Leu	Ala/Ala	73 (39,7%)	84 (45,4%)
Ser/Leu	Ala/Thr	2 (1,1%)	3 (1,6%)
Ser/Leu	Thr/Thr	0	0
Leu/Leu	Ala/Ala	15 (8,2%)	14 (7,6%)
Leu/Leu	Ala/Thr	1 (0,5%)	0
Leu/Leu	Thr/Thr	0	0
		91 (49,5%)	101 (54,6%)
		184 (100,0%)	185 (100,0%)

Tabelle 4.5: Die Verteilung der Genotypen bei den untersuchten Patienten und Kontrollpersonen. In Klammern ist die prozentuale Verteilung innerhalb einer Probandengruppe dargestellt.

Die Auswertung der Restriktionsergebnisse von Exon 7 und der DHPLC-Ergebnisse von Exon 17 ergab, dass bei den Prostatakarzinompatienten ein geringerer Anteil von Mutationen

in beiden Exons festzustellen war (49,5%) als bei den Kontrollpersonen (54,6%). Der prozentuale Anteil von Mutationen in beiden Exons (Genotypen Ser/Leu-Ala/Thr bzw. Leu/Leu-Ala-Thr) ist bei den Patienten (Ser/Leu-Ala/Thr: 1,1% + Leu/Leu-Ala-Thr: 0,5% = 1,6%) identisch mit den der Kontrollpersonen (Ser/Leu-Ala/Thr: 1,6%). Der Genotyp Leu/Leu-Thr/Thr, nach *Tavtigian et al., 2001* eine Konstellation für eine höhere Karzinominzidenz, wurde bei keinem der untersuchten 369 Personen detektiert.

IV. 2.2 Berechnung der Haplotypenfrequenz

Die Aussagekraft der ermittelten Werte der Polymorphismusanalyse von IV. 2.1 ist abhängig von der Verteilung der Allele innerhalb der untersuchten Gruppen. Diese Allelverteilung wurde statistisch nach Hardy-Weinberg bestimmt. Weichen die ermittelten Beobachtungswerte (IV. 2.1) von den statistisch ermittelten Erwartungswerten signifikant ab, dann wären die untersuchten Probandengruppen für die Polymorphismusanalyse ungeeignet gewesen.

Da die Variationen in zwei Exons desselben Gens und nicht in zwei verschiedenen Genen auftraten, wurden nicht die Allel-, sondern die Genotypenverteilungen innerhalb der Probandengruppen berücksichtigt.

*Die ermittelte Genotypenverteilung bei 184 Prostatakarzinompatienten und 185
Kontrollpersonen*

*= A (Alanin), L (Leucin), S (Serin), T (Threonin)

** = Die Erwartungs- und Beobachtungswerte < 2 wurden mit der nächst größeren Klasse zusammengefasst (Sachs, 1992).

Patienten

Genotypen*	Beobachtungswert	Erwartungswert	Einzelwerte zum χ^2	Haplotypenfrequenz
S-A/S-A	93	92,54	0,0023	S-A = 0,7092
S-A/L-A	73	73,75	0,0076	L-A = 0,2826
L-A/L-A	15	14,69	0,0065	L-T = 0,0082
S-A/L-T**	2	2,16	} 3,01	0,0000
L-A/L-T**	1	0,85		
L-T/L-T**	0	0,00		
	}			
	$\Sigma = 184$	$\Sigma = 183,99$	$\chi^2 = 0,0164$	$\Sigma = 1,0000$

Tabelle 4.6: Die statistische Auswertung der Genotypenverteilung bei den untersuchten Patienten.

Kontrollpersonen

Genotypen*	Beobachtungswert	Erwartungswert	Einzelwerte zum χ^2	Haplotypenfrequenz
------------	------------------	----------------	--------------------------	--------------------

S-A/S-A	84	87,87	0,1704	S-A = 0,6892
S-A/L-A	84	77,19	0,6008	L-A = 0,3027
L-A/L-A	14	16,95	0,5134	L-T = 0,0081
S-A/L-T	0	0	0,0000	
L-A/L-T	3	2,99	0,0000	
L-T/L-T	0	0	0,0000	
	$\Sigma = 185$	$\Sigma = 185,00$	$\chi^2 = 1,2846$	$\Sigma = 1,0000$

Tabelle 4.7: Die statistische Auswertung der Genotypenverteilung bei den Kontrollpersonen.

Die ermittelten Werte ergaben unter Hinzunahme der Tabelle der χ^2 -Verteilung (Fisher & Yates, 1963) folgende Aussagen über die Signifikanz der Ergebnisse: Bei einem Freiheitsgrad von 1 und einem berechneten Erwartungswert von mindestens 2, unter gleichzeitiger Berücksichtigung der Irrtumswahrscheinlichkeit von 5%, musste der χ^2 -Wert geringer als 3,84 sein (Fisher & Yates, 1963). Der χ^2 -Wert der Kontrollpersonen wurde mit 1,2846 und der des Patientenkollektivs mit $\chi^2 = 0,0164$ bestimmt. Somit waren die Unterschiede zwischen Beobachtungs- und Erwartungswert bei beiden untersuchten Probandengruppen nicht signifikant, so dass die Probandengruppen für die Polymorphismusanalyse geeignet waren und die ermittelten Ergebnisse in IV. 2.1 aussagekräftig sind.

Vergleich der Genotypenhäufigkeit von Patienten und Kontrollpersonen

Anhand der im oberen Abschnitt ermittelten Werte, konnte ein χ^2 -Vergleich der Allelkombinationshäufigkeiten von Patienten und Kontrollkollektiv durchgeführt werden. Daraus ergaben sich folgende Beobachtungs (B)- und Erwartungswerte (E):

Ermittelte Beobachtungs (B)- und Erwartungswerte (E) der Genotypenverteilung bei den untersuchten Patienten und der Kontrollgruppe

		N1				
		S-A/ S-A	S-A/ L-A	L-A/ L-A	S-A/L-T* + L-A/L-T + L-T/L-T	Σ (B)
Patienten	B	93	73	15	3	184
	N2					

	E	88,3	78,3	14,5	3	
Kontrolle	B	84	84	14	3	185
	E	88,7	78,7	14,5	2,5	
$\Sigma (B)$		167	157	29	6	369

Tabelle 4.9: Genotypenverteilung bei den untersuchten Patienten und der Kontrollgruppe

N1 = Genotypen N2 = Probandengruppen

B = Beobachtungswert E = Erwartungswert

* = Erwartungswerte < 2 wurden mit der nächst größeren Klasse zusammengefasst (Sachs, 1992)

Die Signifikanz der ermittelten Werte wurde durch die Summe aller χ^2 der Genotypen nach *R.Fisher*, und *F.Yates, 1963* bestimmt.

Die Summe der ermittelten χ^2 -Werte für die Genotypen

	Patienten	Kontrollgruppe
S-A/S-A	0,2502	0,2490
S-A/L-A	0,3587	0,3569
L-A/L-A	0,0172	0,0172
S-A/L-T + L-A/L-T + L-T/L-T	0,000	0,1000
	$\Sigma = 1,2492$	

Tabelle 4.10: Summe der ermittelten χ^2 -Werte für die Genotypen.

Bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5% und zwei Freiheitsgraden war der χ^2 -Wert beider Probandengruppen mit 1,2492 unter der Signifikanzgrenze von 5,99 (nach der Tabelle von *Fisher & Yates, 1963*).

Das bedeutet, dass die Unterschiede der Verteilung der Genotypen zwischen den Patienten und den Kontrollpersonen nicht signifikant waren. Somit hat die Polymorphismusanalyse des *HPC2/ELAC2*-Gens kein erhöhtes Prostatakarzinomrisiko ergeben.

V. Diskussion

Im Rahmen dieser Arbeit wurden somatische und hereditäre Formen von Prostatakarzinomen anhand von LOH- und Polymorphismusanalysen untersucht. Für die LOH-Analyse wurde DNA aus Paraffinpräparaten von Tumoren von 55 Patienten extrahiert, und für die Polymorphismusanalyse stand Vollblut-DNA von 369 Personen zur Verfügung.

V. 1 Deletionen in der Region 10q26 in Zellen von Prostatakarzinomen

Durch molekularbiologische und zytogenetische Untersuchungen in malignem Prostatagewebe wurden in mehr als 40% aller untersuchten Prostatatumoren Deletionen auf dem langen Arm des Chromosoms 10 detektiert (*Nupponen et al., 1998*). Von diesen Deletionen könnten auch TSGs betroffen sein, so dass diese chromosomalen Aberrationen von besonderer Bedeutung für die Tumorgenese des Prostatakarzinoms sind. In unserer Arbeitsgruppe konnte durch LOH-Analysen in Tumorzellen fortgeschrittener Prostatakarzinome der Bereich der Deletionen auf 5cM in 10q26 zwischen den Markern D10S209 und D10S587 eingegrenzt werden.

Aufgabe im ersten Teil der Dissertation war es, mit aus Paraffinpräparaten extrahierter DNA von 55 Prostatakarzinomen Deletionen in der Region 10q26 mit Hilfe der LOH-Analyse weiter einzugrenzen. Dazu wurden modifizierte DNA-Extraktions- und Amplifikationsmethoden erfolgreich etabliert.

Aufgrund der variablen Ausdehnung der Tumoreale der Prostatakarzinome wurden die 55 Patienten in zwei Gruppen unterteilt: Die erste Patientengruppe (30 Personen) hatte nicht zusammenhängende Tumorbereiche mit einzelnen Drüsen, die aus 30–50 malignen Zellen bestanden. Diese Zellen wurden mit einem LCM-Gerät mikrodisektiert. Die Tumoreale des zweiten Patientenkollektivs (25 Personen) waren zusammenhängend und enthielten mehrere hundert maligne Zellen, die mit Hilfe eines Skalpell isoliert werden konnten. Die LOH-Analysen wurden mit extrahierter DNA aus den isolierten Zellen durchgeführt.

Kontrollregion 8p12-23

Um kontrollieren zu können, ob das isolierte Material aus einer reinen Tumorphosphation bestand und für die LOH-Analyse in 10q26 geeignet war, wurden zunächst LOH-Analysen in der Region 8p12-23 durchgeführt. Deletionen auf dem kurzen Arm von Chromosom 8 sind,

im Gegensatz zu Deletionen auf Chromosom 10, primäre Ereignisse der Prostatakarzinogenese (*Yaremko et al., 1995, Emmert-Buck et al., 1995, Cheng et al., 1999*).

Im Genom der Tumorzellen der ersten Patientengruppe (30 Personen) konnten weder bei Karzinomen mit einem Malignitätsgrad von T2 (ein Patient) noch bei Personen mit T3-Karzinomen (29 Personen) LOHs in 8p detektiert werden.

Der Grund hierfür könnte die geringe DNA-Menge sein (maximal 250pg), die aus den 30-50 mikrodisssektierten, monoklonalen Tumorzellen eines nicht zusammenhängenden Karzinomgewebes extrahiert wurden. *Sieben et al., 2000* postulierte in seiner Arbeit, dass bei einer kleinen DNA-Menge (0,05ng) bis zu 16,5% der Ergebnisse aus Fehlamplifikationen bestanden, während bei einer DNA-Menge von 25ng die Ergebnisse reproduzierbar waren. Ursachen für die Fehlamplifikationen können Primerfehlbindungen an der DNA bei den ersten Zyklen der PCR-Reaktion sein, wodurch ein LOH maskiert werden kann. Das Risiko einer erhöhten Anzahl von Fehlamplifikaten ist bei größeren DNA-Mengen (> 300 Zellen) minimiert (*Sieben et al., 2000*).

Die LOH-Untersuchungen an einer größeren Anzahl von Karzinomzellen war aufgrund der Heterogenität und der Polyklonalität des Prostatakarzinoms nicht möglich. Es musste davon ausgegangen werden, dass die Karzinomzellen aus Folgeschnitten des gleichen Tumoreareals nicht gleichen monoklonalen Ursprungs waren und somit nicht für die gleiche LOH-Analyse verwendet werden konnten (*Gittes et al., 1991; Gleason et al., 1992*).

Anhand der beschriebenen Faktoren wurde für weitere Analysen ein zweites Patientenkollektiv untersucht, deren Prostatakarzinome zusammenhängende Tumoreareale besaßen und aus mehreren hundert monoklonalen Tumorzellen bestand (> T3), oder bei denen das Tumoreal des Paraffinschnittes zugeschnitten werden konnten (T2-Karzinome). Des Weiteren sollten in den zu untersuchenden Karzinombereichen mindestens 80% maligne Drüsenzellen lokalisiert sein, damit die Kontamination mit Normalzellen keine große Auswirkung auf die LOH-Ergebnisse hat (*Williams et al., 1999*).

Insgesamt wurden im zweiten Patientenkollektiv Tumore von 25 Personen untersucht, von denen bei 64% der Fälle (16 Patienten) LOHs in der Kontrollregion 8p12-23 detektiert werden konnten: 6 von 10 Patienten (60%) mit einem Karzinom mit dem Malignitätsgrad T2 und bei 10 von 15 Personen (67%) mit einem T3-Karzinom. Die ermittelten Ergebnisse des zweiten untersuchten Kollektivs entsprachen tendenziell dem von *Leube et al., 2002* (14 von

26 Patienten: 54%) und anderer Arbeitsgruppen, die sich mit LOH-Analysen in der Region 8p12-23 bei Prostatakarzinomen mit einem Malignitätsgrad von T3 befasst haben:

Cheng et al., 1999: 14 von 24 Patienten (58%);

Washburn et al., 2000: 28 von 45 Patienten (62%);

Matsuyama et al., 2001: 47 von 97 Patienten (61%);

Vocke et al., 1999: 70 von 97 Patienten (72%).

Durch die ermittelten Ergebnisse konnte gezeigt werden, dass die im Rahmen dieser Arbeit etablierten Methode für die LOH-Analyse mit extrahierter DNA aus Paraffinschnitten geeignet war.

Kontrollregion 10q26

Deletionen auf Chromosom 10 in der Region 10q26 wurden in Tumorzellen von Patienten mit Prostatakarzinomen erst ab einem fortgeschrittenen Krebsstadium (ab T3) detektiert (*Bates et al., 1996*), da es sich um ein sekundäres Tumoreignis handelt, das in späteren Phasen der Tumorprogression auftritt (*Emmert-Buck et al., 1995, Cheng et al., 1999*). Aus diesen Gründen war die Detektionsrate von LOHs in T3-Karzinomen in der Region 10q26 niedriger als in 8p12-23.

In dieser Arbeit konnte nur in einem von 30 untersuchten Tumoren, zusätzlich zum LOH in der Kontrollregion 8p12-23, eine Deletion in 10q26 zwischen den Markern D10S209 und D10S587 (3,33%) nachgewiesen werden. Mit Hilfe bekannter Genomsequenzen (www.genome.ucsc.edu November 2002) wurde diese Deletion in der Region 10q26 von 5Mb auf 2,37Mb eingegrenzt.

Arbeitsgruppen, die sich mit LOH-Analysen in 10q26 beschäftigt haben, detektierten generell niedrigere LOH-Raten in 10q als in 8p:

Leube et al., 2002 konnten bei Untersuchungen in 10q bei 13 von 59 Tumoren (26%) und *Bissola et al. 2002* bei 34 von 76 Patienten (24%) LOHs detektieren. Bei *Alers et al., 2000* und *Doll et al., 1999* wurde sogar nur bei einem von 23 Patienten (4%) bzw. keinem einzigen Patienten (0 von 18 Personen) LOH in 10q in Tumorzellen detektiert, obwohl dies mit der DNA aus den gleichen Tumorzellen in der Region 8p möglich war. Anzumerken ist, dass diese Resultate mit DNA aus Tumorproben eines gesamten Paraffinschnittes, bei dem die Zellen mit einem Skalpell isoliert worden sind, erhalten wurden.

Die Detektion von Deletionen in 10q26 könnte erhöht werden, wenn a) mehr Karzinome mit zusammenhängenden Tumorarealen für die LOH-Analyse zur Verfügung stehen würden oder b) Karzinome im fortgeschritteneren Stadium als T3 zur Untersuchung verwendet werden. Hierfür wäre eine enge Zusammenarbeit mit spezialisierten Pathologen für das Prostatakarzinom dringend erforderlich, um die Tumorareale bzw. Tumorzellen in den Schnittpräparaten genau identifizieren zu können. Des Weiteren müssten Patienten mit Tumoren fortgeschritteneren Stadiums ($> T3$) operiert werden. Dies ist jedoch in der Regel nicht der Fall. Selbst wenn die zuvor erwähnten Maßnahmen vollzogen würden, wäre nicht vorherzusagen, wie viele Karzinome untersucht werden müssten, um einerseits Deletionen in 10q26 zu finden und diese Deletionen auch noch bis auf einen Marker eingrenzen zu können.

LOH-Analysen in Genen von 10q26

Da die LOH-Analysen der Region 10q26 bis dato mit polymorphen Markern erfolgten, die nicht in Genen lokalisiert waren, wurde nach polymorphen Markern in Genen der Region 10q26 durch Zuhilfenahme der bekannten Genomsequenzen gesucht. Bei den bekannten Genen handelte es sich um *WDR11*, *FGFR2*, *TACC2*, *PRSS11* und *BUB3*. Alle 5 Gene hätten bei einer Modifikation Einfluss auf die unkontrollierte Proliferation von Zellen haben können. Die exprimierten Proteine sind entweder in die Segregation der Chromosomen während der S-Phase (*TACC2*, Gergely et al., 2000; *BUB3*, Fraschini et al., 2001) oder in die Differenzierung und Proliferation der Zellen (*WDR11*, Chernova et al., 2001; *FGFR2*, Naimi et al., 2002; *PRSS11*, Zumbrunn et al., 1997) involviert.

Nach den Vorgaben von Cornelis et al., 1992, nach denen nur an hoch polymorphen Markern mit CA-Wiederholungen LOH-Analysen durchgeführt werden können, hatte keines der untersuchten Gene, außer *FGFR2*, in 10q26 Mikrosatelliten, welche die vollständigen Kriterien erfüllten, um eine LOH-Analyse durchführen zu können. Im Intron von *WDR11*, einem putativen TSG, das durch Inaktivierung bei der Tumorgenese verschiedener Karzinome (Glioblastom) involviert ist (Chernova et al., 2001), konnte ein polymorpher Marker mit 10 CA-Wiederholungen detektiert werden. Dieser wurde eingesetzt um nach Deletionen zu suchen. Bei den LOH-Untersuchungen an Prostatakarzinompatienten konnten keine Deletionen in *WDR11* detektiert werden.

D10S1483

Wie schon in V .1.6 geschildert worden ist, konnte in dem polymorphen Marker D10S1483, der im *FGFR2* liegt, bei einem Patienten eine Deletion festgestellt werden. Fraglich ist, ob es sich bei *FGFR2* um ein TSG handelt, dessen Inaktivierung bzw. Deletion eine Rolle in der Tumorgenese des Prostatakarzinoms spielt. *FGFR2* wird in Epithelzellen, sowie von Prostataadrüsenzellen, exprimiert. Der Ligand FGF7, ein in Stromazellen exprimiertes Protein, bindet an die Isoform FGFR2(IIIb). Durch diese Interaktion scheint die Differenzierung der Epithelzellen kontrolliert zu sein (*Yan et al., 1993* und *Ropiquet et al., 1999*). In malignen Prostataadrüsenzellen ist die Expression von FGFR2(IIIb) herunterreguliert und die Interaktion mit FGF7 kann deshalb nicht stattfinden. Durch alternatives Spleißen ist dann hauptsächlich FGFR2(IIIc) als Rezeptor auf der Zelloberfläche vorhanden. Der Ligand von FGFR2(IIIc) ist FGF2, durch deren Interaktion die Proliferation des Adenokarzinoms initiiert wird (*Naimi et al., 2002*).

RNA- und Protein-Expressionsanalysen würden eine genauere Charakterisierung der Funktion des Gens ermöglichen. Für die Erstellung von RNA-Expressionsprofilen eignen sich besonders High Density Microarrays (Biochips) (*Heiskanen et al., 2001*). Bei dieser „GeneChip-Technologie“ ist es möglich, mit relativ geringen gesamt-RNA-Ausgangsmengen von 100ng nicht nur *FGFR2*, sondern auch bis zu 40.000 Gene und EST's auf ihre Expression hin zu überprüfen. Vergleiche zwischen Normalgewebe und Patientengewebe mit Defekten im entsprechenden Gen ermöglichen dabei Rückschlüsse auf Stoffwechselwege und einzelne Gene, die möglicherweise von *FGFR2* beeinflusst werden. Für Expressionsanalysen auf Proteinebene eignet sich vor allem die Auftrennung der Proteine mittels 2 D-Gelelektrophorese (*Kohl et al., 2002*). Auch hierbei können Unterschiede zwischen Normalgewebe und Tumor identifiziert werden. Die exakte Charakterisierung der veränderten Proteine kann anschließend mittels MALDI-ToF-Technik erfolgen (*Pappin et al., 2003*). Bei dieser Technik werden durch eine Massenspektrometrie hochmolekulare Biopolymere analysiert. Weiterhin wäre es möglich an Kontrollorganismen (z.B. Mäuse) morphologischen Veränderungen durch den Ausfall des entsprechenden Gens zu untersuchen („knock out“ Mäuse) (*De Moerlooze et al., 2000*).

V.2 Familiäre Prädisposition des Prostatakarzinoms: *HPC2/ELAC2*

Nach einer Studie von *Tavtigian et al., 2001* an 2523 Personen (372 Prostatakarzinompatienten und 2151 Kontrollpersonen) nordeuropäischer Abstammung in Utah, USA, die durch Stammbaumanalysen ausgewählt wurden, besteht ein erhöhtes Risiko an einem Prostatakarzinom zu erkranken, wenn in *HPC2/ELAC2* ein Ala541Thr-Polymorphismus in Exon 17 gekoppelt mit einem Ser217Leu-Polymorphismus in Exon 7 auftritt. Demzufolge würde es sich bei *HPC2/ELAC2* um ein Prostatakarzinom-Suszeptibilitätsgen handeln.

In diesem Teil der Dissertation sollte festgestellt werden, ob die Prostatakarzinominzidenz für die kaukasoide Bevölkerung in der Region Düsseldorf ebenfalls erhöht ist, wenn die zuvor erwähnten Polymorphismen in *HPC2/ELAC2* auftreten. Zu diesem Zweck wurde die Allelfrequenz dieser beiden Polymorphismen von *HPC2/ELAC2* an 184 kaukasoiden Prostatakarzinompatienten und 185 Kontrollpersonen untersucht.

Die prozentuale Verteilung des Genotyps Ser-Ala/Ser-Ala (beide untersuchten Exons in *HPC2/ELAC2* sind nicht mutiert) war bei den Patienten höher (50,5%) als bei den Kontrollpersonen (45,4%). Die Verteilung der Genotypen Ser-Ala/Leu-Thr und Leu-Ala/Leu-Thr war hingegen bei beiden untersuchten Gruppen mit jeweils 1,6% identisch. Der sehr seltene Genotyp Leucin-Threonin/Leucin-Threonin konnte nicht detektiert werden. In weiteren Arbeitsgruppen, die sich mit den gleichen Polymorphismen in *HPC2/ELAC2* beschäftigen (*Simard et al., 2002, Suarez et al., 2001, Vesprin et al., 2001, Wang et al., 2001* und *Xu et al., 2001*), konnten bei insgesamt 4145 untersuchten Personen (1547 Patienten und 2598 Kontrollpersonen) nur 155 Personen (3,7%) mit dem Genotyp Leucin-Threonin/Leucin-Threonin detektiert werden. Die Individuen mit diesem Genotyp waren jedoch prozentual nahezu gleichmäßig auf die untersuchten Gruppen verteilt (60 Patienten = 3,9%; 95 Kontrollpersonen = 3,6%), so dass auch in diesen Fällen nicht von einem erhöhten Prostatakrebsrisiko gesprochen werden konnte.

Die beobachtete Genotypenverteilung in den untersuchten Personengruppen wird in dieser Arbeit ebenfalls statistisch nach Hardy-Weinberg bestätigt. Demnach sind die χ^2 -Werte für die Patienten mit 0,0164 und für die Kontrollpersonen mit 1,2846 deutlich niedriger als der

Schwellenwert von 3,84, wonach ein Unterschied zwischen der beobachteten und berechneten Allelverteilung nicht mehr rein zufällig wäre.

Erwähnenswert ist, dass zuzüglich der statistischen Auswertung bei den Patienten weniger Personen mit einem Ala541Thr-Ser217Leu-Polymorphismus detektiert worden sind als Kontrollpersonen.

Der Rückschluss aus dieser Beobachtung ist, dass es keine Verbindung zwischen einem Ser217Leu/Ala541Thr-Genotyp und einem erhöhten Prostatakarzinomrisiko bei Personen aus dieser Region gibt. Wenn es einen Zusammenhang zwischen beiden untersuchten Polymorphismen und einer Prostatakarzinominzidenz gegeben hätte, wäre eine gleichmäßige prozentuale Verteilung der Genotypen zwar bei den Kontrollpersonen, jedoch nicht bei den Patienten zu erwartengewesen. Die beobachtete Allelfrequenz würde bei den Patienten, aufgrund der erhöhten Anzahl der Polymorphismen in Exon 7 und 17, signifikant von dem theoretisch berechneten Wert abweichen. Dies ist jedoch nicht der Fall.

Die Ergebnisse dieser Arbeit bestätigen somit die Aussagen von *Simard et al., 2002*, *Rokman et al., 2001*, *Suarez et al., 2001*, *Vesprin et al., 2001*, *Wang et al., 2001* und *Xu et al., 2001*, wonach in den untersuchten Populationen in den USA (*Suarez, Xu, Wang*) Kanada (*Simard, Vesprin*) oder Europa (*Rokman*) ebenfalls kein Zusammenhang zwischen den untersuchten Polymorphismen in *HPC2/ELAC2* und einem erhöhten Prostatakrebsrisiko bestand.

Tavtigian et al., 2001 stützte seine These einer erhöhten Prostatakarzinominzidenz bei einer Missensemutation in Exon 17, die mit einer Punktmutation in Exon 7 gekoppelt auftritt, anhand seiner Studie, bei der im Patientenkollektiv in 19,1% der Fälle Mutationen in beiden Exons detektiert wurden und bei den Kontrollpersonen nur in 7,4%. Er bestätigte die von *Rebbeck et al., 2000* vermutete große Relevanz für eine erhöhte Karzinominzidenz bei Mutation beider Exons (Patienten 7,5%; Kontrollpersonen 3,5%), wobei besonders der homozygote Thr/Thr-Polymorphismus in Exon 17 (bei einem gleichzeitigen Ser217Leu-Polymorphismus) hervorgehoben wurde.

Die Auswahl der von *Tavtigian* untersuchten Personen erfolgte über die *Utah Population Database*. Ein wichtiger Aspekt bei dieser Untersuchung ist, dass ca. 73 % der Bevölkerung Mitglieder der mormonischen Glaubensgemeinschaft sind (*Brockhaus, 1998*). Die autarke

Lebensweise und divergierenden sozialen Umstände, wie z.B. noch praktizierte Polygamie, verhinderte in der Vergangenheit die Vermischung benachbarter Populationen mit den Mormonen. Somit können Genotypen und Phänotypen auch in zum Teil isolierten Populationen unterschiedlich präsent sein, so dass bis dato nur bei einem kleinen Teil der untersuchten Patientengruppen (*Tavtigian* und *Rebbeck*) die Mutationen in Exon 7 und 17 in *HPC2/ELAC2* als Ursachen für die Initiation und Progression des Prostatakarzinoms gewertet wurden (*Simard et al., 2002*).

Ein weiterer kritischer Punkt der untersuchten Population in Utah war, dass die Patienten anhand von Stammbaumanalysen ausgewählt wurden. Der enge Verwandtschaftsgrad der Patienten und deren untersuchte Anzahl könnte die Ergebnisse der *HPC2/ELAC2*-Analyse beeinflussen. Dadurch würden die Aussage über *HPC2/ELAC2* als Prostatakarzinom-Suszeptibilitätsgen nicht zutreffen. Um eine allgemeine Aussage über die Karzinom induzierenden Eigenschaften des mutierten Gens treffen zu können, wäre es notwendig gewesen, für diese Studien Patienten zu untersuchen, die nicht miteinander verwandt waren (wie es in dieser Doktorarbeit praktiziert wurde).

Demnach handelt es sich bei der Studie von *Tavtigian et al., 2001* um eine lokale, mormonenspezifische Genotypenverteilung, die in anderen Populationen so nicht vorzukommen scheint.

Damit eine generelle Aussage über *HPC2/ELAC2* als mögliches Prostatakarzinomgen getroffen werden kann, scheint es notwendig zu sein weitere Polymorphismen in anderen Bereichen des Gens zu untersuchen.

Aufgrund der hoch konservierten C-terminalen Region des Proteins *HPC2/ELAC2* und der hohen Homologie der Aminosäuresequenz mit Proteinfamilien, die in sämtlichen Eukaryonten und Prokaryonten ubiquitär sind, scheint *HPC2/ELAC2* eine wichtige biologische Funktion zuzustehen. Mutationen, die zu Konformationsänderung des Proteins führen, könnten Bedingungen begünstigen, welche die Initiation der Tumorgenese ermöglichen würden (*Simard et al., 2002*).

Zu den engen Proteinfamilien, die mit *HPC2/ELAC2* eine hohe Homologie aufweisen, scheinen das PSO2 (SNM1) DNA-Reparaturprotein, sowie eine 73kD große Untereinheit des

mRNA 3'-Ende schneidenden (*cleavage*) und *polyadenylierenden* Spezifitätsfaktors, CPSF73 (*Simard et al., 2002*), zu gehören. CPSF73 bindet an das Hexanukleotid AAUAAA des transkribierten Produkts und katalysiert die Spaltung der mRNA am 3'-Ende. Anschließend stimuliert CPSF73 die Poly(A)-Polymerase zur Synthetisierung des Poly(A)-Stranges am 3'-Ende der mRNA (*Jenny et al., 1994*).

Anhand der Sequenzhomologien und der beschriebenen Aufgaben von PSO2 (SNM1) und CPSF73, scheint die Beobachtung von *Xue et al., 2000* den Verdacht zu bestätigen, dass *HPC2/ELAC2* in die Initiation und die Progression des Prostatakarzinoms involviert ist. *Xue et al., 2000* beschreibt in seiner Arbeit, dass durch gekoppelte Missensemutationen im *HPC2/ELAC2* und im Androgenrezeptor (*AR*)-Gen das Krebsrisiko um ein Fünffaches erhöht ist. Ein Zusammenhang wäre darin zu erkennen, dass *HPC2/ELAC2* die Translation von *AR* beeinflusst, was auf die fehlerhafte 3'-Polyadenylierung der mRNA zurückzuführen sein könnte.

VI. Zusammenfassung

Die bearbeiteten Themen meiner Dissertation umfassten den Bereich somatische und hereditärer Mutationen des Prostatakarzinoms.

Eine Ursache für die Entwicklung somatischer Mutationen des Prostatakarzinoms könnte u.a. auch Deletionen von *Tumor-Suppressorgen* (TSG) sein. Der Verlust solcher Gene kann zu unkontrollierter Proliferation und Differenzierung der Zelle führen. Das Ziel war, durch LOH (*Loss of Heterozygosity*)-Analysen an Paraffinpräparaten von Prostatakarzinompatienten Deletionen in der Region 10q26 einzugrenzen. Für diese Verfahren wurden Schnittpräparate aus in Paraffin eingebettetem Tumorgewebe angefertigt und die Tumorzellen mit Hilfe eines *Laser Capture Microdissection* (LCM)-Gerätes oder mit einem Skalpell manuell isoliert. Anschließend wurde die DNA aus den isolierten Zellen mit Proteinase K extrahiert, unspezifisch in einer I-PEP präamplifiziert, anschließend spezifisch mit polymorphen Markern amplifiziert und auf einem Polyacrylamidgel (*Licor*) analysiert. In der Region 10q26 konnte durch LOH-Analysen der deletierte Bereich auf 10q26 bis auf den Marker D10S1679 eingegrenzt werden. D10S1679 ist distal vom putativen TSG *FGFR2* lokalisiert. Der Beweis, ob die detektierte Deletion einen Einfluss auf die Expression von *FGFR2* hat, muss anhand von Expressionsanalysen verifiziert werden.

Der zweite Teil meiner Doktorarbeit befasste sich mit der Polymorphismusanalyse eines putativen Prostatakarzinomgens. Durch Kopplungsanalysen in den USA konnte eine hereditäre Prädisposition *HPC2/ELAC2* auf Chromosom 17 in der Region 17p12.1 lokalisiert werden, bei der durch Missensemutation in Exon 17 (Ala541Thr) und bei einer gleichzeitig auftretenden Punktmutation in Exon 7 (Ser217Leu), eine erhöhte Prostatakarzinominzidenz festgestellt wurde. Anhand von Stichproben der hiesigen kaukasoiden Bevölkerung (185 Patienten und 184 Kontrollpersonen) sollte untersucht werden, ob es sich bei *HPC2/ELAC2* um ein Prostatakarzinom-Suszeptibilitätsgen handelte. Diese Analyse wurde mit genomischer DNA (Blut) durchgeführt. Zu den angewandten Methoden gehörten die Restriktionsanalyse, die DHPLC (*Denaturing High Performance Liquid Chromatography*) und die Sequenzanalyse. Die prozentuale Verteilung des auf beiden Exons mutierten *HPC2/ELAC2* war bei den Prostatakarzinompatienten und den Kontrollpersonen identisch (jeweils 1,6%). Demnach konnte *HPC2/ELAC2* nicht als putatives Prostatakarzinomgen in der hiesigen Region bestätigt werden.

Literatur

- Aaltonen LA, Peltomaki P, Leach FS, Sistonen P, Pylkkanen L, Mecklin JP, Jarvinen H, Powell SM, Jen J, Hamilton SR.*, (1993) Clues to the pathogenesis of familial colorectal cancer. *Science* 7; 260: 812 - 816.
- Alers JC, Rochat J, Krijtenburg PJ, Hop WC, Kranse R, Rosenberg C, Tanke HJ, Schroder FH, van Dekken H.*, (2000) Identification of genetic markers for prostatic cancer progression. *Lab Invest* 80: 931 - 942.
- Ashley DJ.*, (1969) The two "hit" and multiple "hit" theories of carcinogenesis. *Br J Cancer* 23: 313 - 328.
- Batova A, Diccianni MB, Yu JC, Nobori T, Link MP, Pullen J, Yu A.*, (1997) Frequent and selective methylation of p15 and deletion of both p15 and p16 in T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Res.* 1; 57: 832 - 836.
- Berry R, Schroeder JJ, French AJ, McDonnell SK, Peterson BJ, Cunningham JM, Thibodeau SN, Schaid DJ.*, (2000) Evidence for a prostate cancer-susceptibility locus on chromosome 20. *Am J Hum Genet.* 67: 82 – 91.
- Berthon P, Valeri A, Cohen-Akenine A, Drelon E, Paiss T, Wöhr G, Latil A, Millasseau P, Mellah I, Cohen N, Blanche H, Bellane-Chantelot C, Demenais F, Teillac P, Le Duc A, de Petroni R, Hautmann R, Chumakov I, Bachner L, Maitland NJ, Lidereau R, Vogel W, Fournier G, Mangin P, Cussenot O.*, (1998) Predisposing gene for early-onset prostate cancer, localized on chromosome 1q42.2-43. *Am J Hum Genet.* 62: 1416 – 1424.
- Bichler KH, Kleinknecht S, Nelde HJ, Strohmaier WL.*, (1991) Tumor necrosis factor in benign and malign tissue of the kidney. *Urol Res.* 19 (6): 367 - 373.
- Bishop JM.*, (1987) The molecular genetics of cancer. *Science* 16; 235: 305 - 311.
- Borg A.*, (2001) Hereditary prostate cancer: a new piece of the puzzle. *Nat Med.* 7: 153 - 155.
- Bostwick DG, Brawer MK.*, (1987) Prostatic intra-epithelial neoplasia and early invasion on prostate cancer. *Cancer* 59: 788 – 794.
-

-
- Bova GS, MacGrogan D, Levy A, Pin SS, Bookstein R, Isaacs WB.**, (1996) Physical mapping of chromosome 8p22 markers and their homozygous deletion in a metastatic prostate cancer. *Genomics* 35: 46 - 54.
- Bostrom J, Cobbers JM, Wolter M, Tabatabai G, Weber RG, Lichter P, Collins VP, Reifenberger G.**, (1998) Mutation of the PTEN (MMAC1) tumor suppressor gene in a subset of glioblastomas but not in meningiomas with loss of chromosome arm 10q. *Cancer Research* 58: 5254 - 5257.
- Brawley OW, Knopf K, Thompson I.**, (1998) The epidemiology of prostate cancer part II: the risk factors. *Semin Urol Oncol.* 16 (4): 193 - 201.
- Cairns P, Okami K, Halachmi S, Halachmi N, Esteller M, Herman JG, Jen J, Isaacs WB, Bova GS, Sidransky D.**, (1997) Frequent inactivation of PTEN/MMAC1 in primary prostate cancer. *Cancer Res.* 57 (22): 4997 - 5000.
- Carey TE, Van Dyke DL, Worsham MJ.**, (1993) Nonrandom chromosome aberrations and clonal populations in head and neck cancer. *Anticancer Res.* 13: 2561 - 2567.
- Carter BS, Ewing CM, Ward WS, Treiger BF, Aalders TW, Schalken JA, Epstein JI, Isaacs WB.**, (1990) Allelic loss of chromosomes 16q and 10q in human prostate cancer. *Proc Natl Acad Sci.* 87: 8751 - 8755.
- Chanfreau G, Noble SM, Guthrie C.**, (1996) Essential yeast protein with expected similarity to subunits of mammalian cleavage and polyadenylation specificity factor (CPSF). *Science* 274: 1511 - 1514.
- Cheng L, Bostwick DG, Li G, Wang Q, Hu N, Vortmeyer AO, Zhuang Z.**, (1999) Allelic imbalance in the clonal evolution of prostate carcinoma. *Cancer* 93: 2017 - 2022.
- Cheung VG, Nelson SF.**, (1996) Whole genome amplification using a degenerate oligonucleotide primer allows hundreds of genotypes to be performed on less than one nanogram of genomic DNA. *PNAS* 85: 14676 - 14679.
-

- Chinen K, Isomura M, Izawa K, Fujiwara Y, Ohata H, Iwamasa T, Nakamura Y.** (1996) Isolation of 45 exon-like fragments from 8p22-8p21.3, a region that is commonly deleted in hepatocellular, colorectal, and non-small cell lung carcinomas. *Cytogenet Cell Genet.* 75: 190 - 196.
- Chernova OB, Hunyadi A, Malaj E, Pan H, Crooks C, Roe B, Cowell JK.** (2001) A novel member of the WD-repeat gene family, WDR11, maps to the 10q26 region and is disrupted by a chromosome translocation in human glioblastoma cells. *Oncogene* 20: 5378 - 5392.
- Cornelis F, Hashimoto L, Loveridge J, MacCarthy A, Buckle V, Julier C, Bell J.** (1992) Identification of a CA repeat at the TCRA Locus using yeast artificial chromosomes: a general method for generating highly polymorphic markers at chosen loci, *Genomics* 13: 820 – 825.
- Cairns P, Okami K, Halachmi S, Halachmi N, Esteller M, Herman JG, Jen J, Isaacs WB, Bova GS, Sidransky D.** (1997) Frequent inactivation of PTEN/MMAC1 in primary prostate cancer. *Cancer Res.* 15; 57 (22): 4997 - 5000.
- Davies P, Eaton CL, France TD, Phillips ME.** (1988) Growth factor receptors and oncogene expression in prostate cells. *Am J Clin Oncol.* 11:S 1 - 7.
- De Moerlooze L, Spencer-Dene B, Revest J, Hajihosseini M, Rosewell I, Dickson C.** An important role for the IIIb isoform of fibroblast growth factor receptor 2 (FGFR2) in mesenchymal-epithelial signalling during mouse organogenesis. *Development.* 2000 Feb;127(3):483-92.
- Dhom G, Hautumm B.** (1975) Morphologie des Kinischen Stadiums 0 des Prostatakarzinoms (incidental carcinoma). *Urologie A* 14: 105 – 111.
- Diaz-Cano SJ, Brady SP.** (1997) DNA extraction from formalin-fixed, paraffin-embedded tissues: protein digestion as a limiting step for retrieval of high-quality DNA. *Diagn Mol Pathol.* 6 (6): 342 – 346.

- Dietmaier W, Hartmann A, Wallinger S, Heinmoller E, Kerner T, Endl E, Jauch KW, Hofstadter F, Ruschoff J.**, (1999) Multiple mutation analyses in single tumor cells with improved whole genome amplification. *Am J Pathol.* 154: 83 - 95.
- Dirks W, Rome D, Ringel F, Jager K, MacLeod RA, Drexler HG.**, (1999) Expression of the growth arrest-specific gene 6 (GAS6) in leukemia and lymphoma cell lines. *Leuk Res.* 23 (7): 643 - 651.
- Doll JA, Zhu X, Furman J, Kaleem Z, Torres C, Humphrey PA, Donis-Keller H.**, (1999) Genetic analysis of prostatic atypical adenomatous hyperplasia (adenosis). *Am J Pathol.* 155: 967 - 971
- El-Naggar AK, Coombes MM, Batsakis JG, Hong WK, Goepfert H, Kagan J.**, (1998) Localization of chromosome 8p regions involved in early tumorigenesis of oral and laryngeal squamous carcinoma. *Oncogene* 16: 2983 - 2987.
- Emmert-Buck MR, Vocke CD, Pozzatti RO, Duray PH, Jennings SB, Florence CD, Zhuang Z, Bostwick DG, Liotta LA, Linehan WM.**, (1995) Allelic loss on chromosome 8p12-21 in microdissected prostatic intraepithelial neoplasia. *Cancer Res.* 15; 55 (14) : 2959 - 2962.
- Epplen JT.**, On simple repeated GATCA sequences in animal genomes. *J Hered.* (1988); 79 (6): 409 - 417.
- Feilotter HE, Nagai MA, Boag AH, Eng C, Mulligan LM.**, (1998) Analysis of PTEN and the 10q23 region in primary prostate carcinomas. *Oncogene* 16: 1743 - 1748.
- Feng S, Wang F, Matsubara A, Kan M, McKeehan WL.**, (1997) Fibroblast growth factor receptor 2 limits and receptor 1 accelerates tumorigenicity of prostate epithelial cells. *Cancer Res.* 1; 57: 5369 - 5378.
- Findlay I, Ray P, Quirke P, Rutherford A, Lilford R.**, (1999) Allelic drop-out and preferential amplification in single cells and human blastomeres: Implications for preimplantation diagnosis of sex and cystic fibrosis. *Hum Report.* 10: 1609 – 1618.
- Foulds L.**, (1958) The natural history of cancer. *J Chronic Dis.* 8: 2- 37.

-
- Garvin J Jr, Bendit I, Nisen PD.**, (1990) N-myc oncogene expression and amplification in metastatic lesions of stage IV-S neuroblastoma. *Cancer*. 65 (11): 2572 - 2575.
- Gittes RF.**, (1991) Carcinoma of the prostate. *N Engl J Med*. 24; 324 : 236 - 245.
- Gleason DF.**, (1966) Classification of prostatic carcinomas. *Cancer Chemother*. 50: 125 – 130.
- Gleason DF.**, (1992) Histologic grading of prostate cancer: a perspective. *Hum Pathol*. 23: 273 – 279.
- Goodrich DW, Lee WH.**, (1990) The molecular genetics of retinoblastoma. *Cancer Surv*. 9 (3): 529 - 554.
- Gorstein F, Anderson TL.**, (1991) Malignant mixed mesodermal tumors: carcinoma, sarcoma, or both? *Hum Pathol*. 22 (3): 207 - 209.
- Gray IC, Phillips SM, Lee SJ, Neoptolemos JP, Weissenbach J, Spurr NK.** (1995) Loss of the chromosomal region 10q23-25 in prostate cancer. *Cancer Res*. 55 (21): 4800 - 4803.
- Grifo JA, Tang YX, Munne S, Krey L.**, (1996) Update in preimplantation genetic diagnosis: successes, advances, and problems. *Curr Opin Obstet Gynecol*. 8 (2): 135 - 138.
- Gustafson CE, Wilson PJ, Lukeis R, Baker E, Woollatt E, Annab L, Hawke L, Barrett JC, Chenevix-Trench G.**, (1996) Functional evidence for a colorectal cancer tumor suppressor gene at chromosome 8p22-23 by monochromosome transfer. *Cancer Res*. 56: 5238 - 5245.
- Haase E, Riehl D, Mack M, Brendel M.**, (1994) Molecular cloning of SNM1, a yeast gene responsible for a specific Stepp in the repair of cross linked DNA. *Mol Gen Genet* 218: 64 – 71.
- Handyside AH, Delhanty JD.**, (1997) Preimplantation genetic diagnosis: strategies and surprises. *Trends Genet*. 7: 270 - 275.
-

- Hanus MC, Zagars GK, Pollack A.**, Familial prostate cancer: outcome following radiation therapy with or without adjuvant androgen ablation. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* (1999) 15; 43: 379 - 383.
- Heiskanen M, Kononen J, Barlund M, Torhorst J, Sauter G, Kallioniemi A, Kallioniemi O.**, (2001) CGH, cDNA and tissue microarray analyses implicate FGFR2 amplification in a small subset of breast tumors. *Anal Cell Pathol.*; 22 (4): 229 - 234.
- Hite JM, Eckert KA, Cheng KC.**, (1996) Factors affecting fidelity of DNA synthesis during PCR amplification of d(C-A)_n; d(G-T)_n microsatellite repeats. *Nucl Acids Res.* 24: 2429 – 2434.
- Hohbach C, Dhom G.**, (1980) Pathology of prostatic cancer. *Scand J Urol Nephrol.* 55: 37 - 47.
- Hsing AW.**, (2000) International trends and patterns of prostate cancer incidence and mortality. *Int J Cancer.* 1; 85: 60 - 67.
- Huang PC, Rosenberg E.**, (1966) Depurination of DNA Base Composition via Depurination. *Analytical Biochemistry* 16: 107 - 113.
- Huang SF, Hsu HC, Fletcher JA.**, (1999) Investigation of chromosomal aberrations in hepatocellular carcinoma by fluorescence in situ hybridization. *Cancer Genet Cytogenet.* 111: 21 - 27.
- Hugel A, Wernert N.**, (1999) Loss of heterozygosity (LOH), malignancy grade and clonality in microdissected prostate cancer. *Br J Cancer.* 79: 551 - 557.
- Hughes SJ, Glover TW, Zhu XX, Kuick R, Thoraval D, Orringer MB, Beer DG, Hanash S.**, (1998) A novel amplicon at 8p22-23 results in overexpression of cathepsin B in esophageal adenocarcinoma. *Proc Natl Acad Sci.* 95: 12410 - 12415.
- Jenkins RB, Qian J, Lieber MM, Bostwick DG.**, (1997) Detection of c-myc oncogene amplification and chromosomal anomalies in metastatic prostatic carcinoma by fluorescence in situ hybridization. *Cancer Res.* 1; 57: 524 - 531.

-
- Jenny A, Hauri HP, Keller W.**, (1994) Characterization of cleavage and polyadenylation specificity factor and cloning of its 100kD subunit. *Mol Cell Biol.* 14: 8183 – 8190.
- Jenny A., Minvielle-Sebastia L., Preker P.J., Keller W.**, (1996) Sequence similarity between the 73-kilodalton protein of mammalian CPSF and a subunit of yeast polyadenylation factor I. *Science* 274, 1514 – 1517.
- Jones PA.**, (1999) The DNA methylation paradox. *Trends Genet.* 15: 34 - 37.
- Jones RB, Carstens RP, Luo Y, McKeehan WL.**, (2001) 5'- and 3'-terminal nucleotides in the FGFR2 ISAR splicing element core have overlapping roles in exon IIIb activation and exon IIIc repression. *Nucleic Acids Res.* 29 (17): 3557 - 3565.
- Jones RB, Wang F, Luo Y, Yu C, Jin C, Suzuki T, Kan M, McKeehan WL.**, (2001) The nonsense-mediated decay pathway and mutually exclusive expression of alternatively spliced FGFR2IIIb and -IIIc mRNAs. *J Biol Chem.* 276 (6): 4158 - 4167.
- Kagan J, Liu J, Stein JD, Wagner SS, Babkowski R, Grossman BH, Katz RL.**, (1998) Cluster of allele losses within a 2.5 cM region of chromosome 10 in high-grade invasive bladder cancer. *Oncogene* 16: 909 - 913.
- Karran P, Bignami M.**, (1994) DNA damage tolerance, mismatch repair and genome instability. *Bioessays* 16: 833 - 839.
- Klein CA, Schmidt-Kittler O, Schardt JA, Pantel K, Speicher MR, Riethmuller G.**, (1999) Comparative genomic hybridization, loss of heterozygosity, and DNA sequence analysis of single cells. *PNAS* 96: 4494 - 4499.
- Knudson AG Jr, Strong LC.**, (1972) Mutation and cancer: a model for Wilms' tumor of the kidney. *J Natl Cancer Inst.* 48: 313 - 324.
- Kohl R, Antoine M, Reimers K, Kiefer P.**, (2002) FGF3 attached to a phospholipid membrane anchor gains a high transforming capacity. Implications of microdomains for FGF3 cell transformation. *J Biol Chem* Sep 6; 277 (36) : 32760 - 32767.
-

-
- Kraus J, Pantel K, Pinkel D, Albertson DG, Speicher MR.**, (2003) High-resolution genomic profiling of occult micrometastatic tumor cells. *Genes Chromosomes Cancer* 36: 159 - 166.
- Latini JM, Rieger-Christ KM, Wang DS, Silverman ML, Libertino JA, Summerhayes IC.**, (2001) Loss of heterozygosity and microsatellite instability at chromosomal sites 1Q and 10Q in morphologically distinct regions of late stage prostate lesions. *J Urol.* 166: 1931 - 1936.
- Leube B, Drechsler M, Muhlmann K, Schafer R, Schulz WA, Santourlidis S, Anastasiadis A, Ackermann R, Visakorpi T, Muller W, Royer-Pokora B.**, (2002) Refined mapping of allele loss at chromosome 10q23-26 in prostate cancer. *The Prostate* 50: 135 - 144.
- Li J, Yen C, Liaw D, Podsypanina K, Bose S, Wang SI, Puc J, Miliaresis C, Rodgers L, McCombie R, Bigner SH, Giovanella BC, Ittmann M, Tycko B, Hibshoosh H, Wigler MH, Parsons R.**, (1997) PTEN, a putative protein tyrosine phosphatase gene mutated in human brain, breast, and prostate cancer. *Science.* 275 (5308) : 1943 - 1947.
- Lissens W, Sermon K.**, (1997) Preimplantation genetic diagnosis: current status and new developments. *Hum Reprod.* 8: 1756 - 1761.
- Lin SR, Hsu CH, Tsai JH, Wang JY, Hsieh TJ, Wu CH.**, (2000) Decreased GTPase activity of K-ras mutants deriving from human functional adrenocortical tumours. *Br J Cancer.* 82 (5): 1035 - 1040.
- Liu X, Pawson T.**, (1994) Biochemistry of the Src protein-tyrosine kinase: regulation by SH2 and SH3 domains. *Recent Prog Horm Res.* 49: 149 - 160.
- MacGrogan D, Levy A, Bova GS, Isaacs WB, Bookstein R.**, (1996) Structure and methylation-associated silencing of a gene within a homozygously deleted region of human chromosome band 8p22. *Genomics* 35: 55 - 65.
-

- Maier D, Zhang Z, Taylor E, Hamou MF, Gratzl O, Van Meir EG, Scott RJ, Merlo A.**, (1998) Somatic deletion mapping on chromosome 10 and sequence analysis of PTEN/MMAC1 point to the 10q25-26 region as the primary target in low grade and high grade gliomas. *Oncogene* 16: 3331 – 3335.
- Moch H, Schraml P, Bubendorf L, Richter J, Gasser TC, Mihatsch MJ, Sauter G.**, (1998) Intratumoral heterogeneity of von Hippel-Lindau gene deletions in renal cell carcinoma detected by fluorescence in situ hybridization. *Cancer Res.* 58: 2304 - 2039.
- Miano ML, Ferrini U.**, (1969) Acid depurination of DNA-polycation complexes. *Biochim Biophys Acta.*: 749 - 751.
- Matsuyama H, Pan Y, Oba K, Yoshihiro S, Matsuda K, Hagarth L, Kudren D, Naito K, Bergerheim US, Ekman P.**, (2001) Deletions on chromosome 8p22 may predict disease progression as well as pathological staging in prostate cancer. *Clin Cancer Res.* 7: 3139 - 3143.
- McCarthy DH.**, (2001) Prostate-specific-antigen (PSA) testing. *Prog Transplant.* 11 (4): 244.
- Mollenhauer J, Wiemann S, Scheurlen W, Korn B, Hayashi Y, Wilgenbus KK, von Deimling A, Poustka A.**, (1997) DMBT1, a new member of the SRCR superfamily, on chromosome 10q25.3-26.1 is deleted in malignant brain tumours. *Nat Genet.* 17: 32 - 39.
- Mourant AE, Godber MJ, Kopec AC, Tills D, Woodhead BG.**, (1976) Genetical studies at high and low altitudes in Ethiopia. *Proc R Soc Lond B Biol Sci.* 27; 194: 17 - 22.
- Nagase S, Yamakawa H, Sato S, Yajima A, Horii A.**, (1997) Identification of a 790-kilobase region of common allelic loss in chromosome 10q25-q26 in human endometrial cancer. *Cancer Res.* 57: 1630 - 1633.
- Naimi B, Latil A, Fournier G, Mangin P, Cussenot O, Berthon P.**, (2002) Down-Regulation of (IIIb) and (IIIc) isoforms of fibroblast growth factor receptor 2 (FGFR2) is associated with malignant progression in human prostate. *Prostate* 1; 52: 245 – 252.

- Navidi W, Arnheim N.*, (1991) Using PCR in preimplantation genetic disease diagnosis. *Hum Reprod.* 6 (6): 836 - 849.
- Nelson KA, Witte JS.*, (2002) Androgen Receptor CAG Repeats and Prostate Cancer. *Am J Epidemiology.* 155; 10: 883 - 890.
- Nieborowska-Skorska M., Slupianek A, Skorski T.*, (2000) Progressive changes in the leukemogenic signaling in BCR/ABL-transformed cells. *Oncogene.* 19 (36): 4117 - 24.
- Niegemann E, Brendel M.*, (1994) A single amino acid change in SNM1-encoded protein leads to thermoconditional deficiency for DNA cross-link repair in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mutation Res.* 315: 275 – 279.
- Nigro JM, Baker SJ, Preisinger AC, Jessup JM, Hostetter R, Cleary K, Bigner SH, Davidson N, Baylin S, Devilee P.*, (1989) Mutations in the p53 gene occur in diverse human tumour types. *Nature* 7; 342: 705 - 708.
- de Nooij-van Dalen AG, van Buuren-van Seggelen VH, Lohman PH, Giphart-Gassler M.*, (1998) Chromosome loss with concomitant duplication and recombination both contribute most to loss of heterozygosity in vitro. *Genes Chromosomes Cancer* 21: 30 - 38.
- Norberg M.*, (1994) Transrectal ultrasound and core biopsies for the diagnosis of prostate cancer. A study of pretreatment investigation strategy for patients with suspected prostate cancer. *Acta Radiol Suppl.* 393: 1-21.
- Nupponen NN, Hyytinen ER, Kallioniemi AH, Visakorpi T.*, (1998) Genetic alterations in prostate cancer cell lines detected by comparative genomic hybridization. *Cancer Genet Cytogenet* 101: 53 - 57.
- Ono K, Miyakawa A, Fukuda M, Shiiba M, Uzawa K, Watanabe T, Miya T, Yokoe H, Imai Y, Tanzawa H.*, (1999) Allelic loss on the short arm of chromosome 8 in oral squamous cell carcinoma. *Oncol Rep.* 6: 785 – 789.
- Pappin DJ.*, Peptide mass fingerprinting using MALDI-TOF mass spectrometry. *Methods Mol Biol.* 2003; 211: 211 - 219.

-
- Peiffer SL, Herzog TJ, Tribune DJ, Mutch DG, Gersell DJ, Goodfellow PJ.**, (1995) Allelic loss of sequences from the long arm of chromosome 10 and replication errors in endometrial cancers. *Cancer Res.* 55: 1922 - 1926.
- Pineau P, Nagai H, Prigent S, Wei Y, Gyapay G, Weissenbach J, Tiollais P, Buendia MA, Dejean A.**, (1999) Identification of three distinct regions of allelic deletions on the short arm of chromosome 8 in hepatocellular carcinoma. *Oncogene* 18: 3127 - 3134.
- Prochownik EV, Eagle Grove L, Deubler D, Zhu XL, Stephenson RA, Rohr LR, Yin X, Brothman AR.**, (1998) Commonly occurring loss and mutation of the MX11 gene in prostate cancer. *Genes Chromosomes Cancer.* 22 (4): 295 - 304.
- Rohrbach H, Haas CJ, Baretton GB, Hirschmann A, Diebold J, Behrendt RP, Lohrs U.**, (1999) Microsatellite instability and loss of heterozygosity in prostatic carcinomas: comparison of primary tumors, and of corresponding recurrences after androgen-deprivation therapy and lymph-node metastases. *Prostate* 15; 40: 20 - 27.
- Rosini P, Bonaccorsi L, Baldi E, Chiasserini C, Forti G, De Chiara G, Lucibello M, Mongiat M, Iozzo RV, Garaci E, Cozzolino F, Torcia MG.**, (2002) Androgen receptor expression induces FGF2, FGF-binding protein production, and FGF2 release in prostate carcinoma cells: role of FGF2 in growth, survival, and androgen receptor down-modulation. *Prostate* 1; 53: 310 - 321.
- Ropiquet F, Huguenin S, Villette JM, Ronfle V, Le Brun G, Maitland NJ, Cussenot O, Fiet J, Berthon P.**, (1999) FGF7/KGF triggers cell transformation and invasion on immortalised human prostatic epithelial PNT1A cells. *Int J Cancer.* 19; 82 (2): 237 - 243.
- Roth BJ.**, (1999) Androgen-independent prostate cancer: not so chemorefractory after all. *Semin Oncol.* 26: 43 - 50.
- Roylance R, Spurr N, Sheer D.**, (1997) The genetic analysis of prostate carcinoma. *Semin Cancer Biol.* 8: 37 - 44.
-

- Qian J, Jenkins RB, Bostwick DG.**, (1995) Chromosomal anomalies in atypical adenomatous hyperplasia and carcinoma of the prostate using fluorescence in situ hybridization. *Urology* 46: 837 - 842.
- Sachs L**, *Angewandte Statistik*. Siebte Ausgabe, Springer Verlag, 1992
- Sakr WA, Macoska JA, Benson P, Grignon DJ, Wolman SR, Pontes JE, Crissman JD.**, (1994) Allelic loss in locally metastatic, multisampled prostate cancer. *Cancer Res.* 54: 3273 - 3277.
- Sato K, Qian J, Slezak JM, Lieber MM, Bostwick DG, Bergstralh EJ, Jenkins RB.**, (1999) Clinical significance of alterations of chromosome 8 in high-grade, advanced, nonmetastatic prostate carcinoma. *J Natl Cancer Inst.* 15; 91: 1574 - 1580.
- Sellner W.**, *Fixierung histologischer Präparate Mikroskopische Technik/Romeis*, 17. Auflag: 83 - 87 (1989).
- Sunwoo JB, Holt MS, Radford DM, Deeker C, Scholnick SB.**, (1996) Evidence for multiple tumor suppressor genes on chromosome arm 8p in supraglottic laryngeal cancer. *Genes Chromosomes Cancer* 16: 164 - 169.
- Schroeder FH, Blom JH, Hop WC, Mostofi FK.**, (1985) Grading of prostatic cancer (I): An analysis of the prognostic significance of single characteristics. *Prostate* 6: 81 - 100.
- Sieben NL, ter Haar NT, Cornelisse CJ, Fleuren GJ, Cleton-Jansen AM.**, (2000) PCR Artefacts in Loh and MSI Analysis of microdissected tumor cells. *Nethalie Human Pathologie* 31; 1141 – 1149.
- Simard J, Dumont M, Soucy P, Labrie F.**, (2002) Perspective: Prostate Cancer Susceptibility Genes. *Endocrinology* 143 (6): 2029 – 2040.
- Smith JR, Freije D, Carpten JD, Gronberg H, Xu J, Isaacs SD, Brownstein MJ, Bova GS, Guo H, Bujnovszky P, Nusskern DR, Damber JE, Bergh A, Emanuelsson M, Kallioniemi OP, Walker-Daniels J, Bailey-Wilson JE, Beaty TH, Meyers DA, Walsh PC, Collins FS, Trent JM, Isaacs WB.**, (1996) Major susceptibility locus for prostate cancer on chromosome 1 suggested by a genome wide search. *Science* 274: 1371 - 1374.

- Stamey TA.**, (1992) Diagnosis of prostate cancer: a personal view. *J Urol.* 147: 830 - 832.
- Steck PA, Lin H, Langford LA, Jasser SA, Koul D, Yung WK, Pershouse MA.**, (1999) Functional and molecular analyses of 10q deletions in human gliomas. *Genes Chromosomes Cancer* 24 (2): 135 - 143.
- Strauss B.**, (1991) The „A-Rule“ of mutagen specificity: a consequence of DNA polymerase bypass of non-instructional lesions? *Bioassays* 13, 2: 79 – 84.
- Takito J, Yan L, Ma J, Hikita C, Vijayakumar S, Warburton D, Al-Awqati Q.**, (1999) Hensin, the polarity reversal protein, is encoded by DMBT1, a gene frequently deleted in malignant gliomas. *Am J Physiol.* 277: F277 - 289.
- Takanishi DM Jr, Kim SY, Kelemen PR, Yaremko ML, Kim AH, Ramesar JE, Horrigan SK, Montag A, Michelassi F, Westbrook CA.**, (1997) Chromosome 8 Losses in Colorectal Carcinoma: Localization and Correlation With Invasive Disease. *Mol Diagn.* 2: 3 – 10.
- Tanaka M, Koul D, Davies MA, Liebert M, Steck PA, Grossman HB.**, (2000) MMAC1/PTEN inhibits cell growth and induces chemosensitivity to doxorubicin in human bladder cancer cells. *Oncogene.* 19 (47): 5406 - 5412.
- Tavtigian SV, Simard J, Teng DH, Abtin V, Baumgard M, Beck A, Camp NJ, Carillo AR, Chen Y, Dayananth P, Desrochers M, Dumont M, Farnham JM, Frank D, Frye C, Ghaffari S, Gupte JS, Hu R, Iliev D, Janecki T, Kort EN, Laity KE, Leavitt A, Leblanc G, McArthur-Morrison J, Pederson A, Penn B, Peterson KT, Reid JE, Richards S, Schroeder M, Smith R, Snyder SC, Swedlund B, Swensen J, Thomas A, Tranchant M, Woodland AM, Labrie F, Skolnick MH, Neuhausen S, Rommens J, Cannon-Albright LA.**, (2001) A candidate prostate cancer susceptibility gene at chromosome 17p. *Nat Genet.* 27: 172 - 180.
- Tanaka M, Koul D, Davies MA, Liebert M, Steck PA, Grossman HB.**, (2000) MMAC1/PTEN inhibits cell growth and induces chemosensitivity to doxorubicin in human bladder cancer cells. *Oncogene.* 19 (47): 5406 - 5412.

- Teng DH, Hu R, Lin H, Davis T, Iliev D, Frye C, Swedlund B, Hansen KL, Vinson VL, Gumper KL, Ellis L, El-Naggar A, Frazier M, Jasser S, Langford LA, Lee J, Mills GB, Pershouse MA, Pollack RE, Tornos C, Troncso P, Yung WK, Fujii G, Berson A, Steck PA.**, MMAC1/PTEN mutations in primary tumor specimens and tumor cell lines. *Cancer Res.* 1997; 57 (23): 5221 - 5225.
- Thiagalingam S, Laken S, Willson JK, Markowitz SD, Kinzler KW, Vogelstein B, Lengauer C.**, (2001) Mechanisms underlying losses of heterozygosity in human colorectal cancers. *PNAS* 27; 98: 2698 - 2702.
- Tindall KR, Kunkel TA.**, (1988) Fidelity of DNA synthesis by the *Thermus aquaticus* DNA Polymerase. *Biochemistry* 27: 6008 – 6013.
- Trybus TM, Burgess AC, Wojno KJ, Glover TW, Macoska JA.** (1996) Distinct areas of allelic loss on chromosomal regions 10p and 10q in human prostate cancer. *Cancer Res.* 56 (10): 2263 - 2267.
- Van Dyke DL, Worsham MJ, Benninger MS, Krause CJ, Baker SR, Wolf GT, Drumheller T, Tilley BC, Carey TE.**, (1994) Recurrent cytogenetic abnormalities in squamous cell carcinomas of the head and neck region. *Genes Chromosomes Cancer* 9: 192 - 206.
- Varella-Garcia M, Gemmill RM, Rabenhorst SH, Lotto A, Drabkin HA, Archer PA, Franklin WA.**, (1998) Chromosomal duplication accompanies allelic loss in non-small cell lung carcinoma. *Cancer Res.* 15; 58: 4701 - 4707.
- Verma RS, Manikal M, Conte RA, Godec CJ.**, (1999) Chromosomal basis of adenocarcinoma of the prostate. *Cancer Invest.* 17: 441 – 447.
- Vesprini D, Nam RK, Trachtenberg J, Jewett MA, Tavtigian SV, Emami M, Ho M, Toi A, Narod SA.**, (2001) HPC2 variants and screen-detected prostate cancer. *Am J Hum Genet.* 68: 912 - 917.
- Verlinsky Y.**, (1996) Preimplantation genetic diagnosis. *J Assist Reprod Genet.* 13 (2): 87 - 89.

- Vocke CD, Pozzatti RO, Bostwick DG, Florence CD, Jennings SB, Strup SE, Duray PH, Liotta LA, Emmert-Buck MR, Linehan WM.**, (1996) Analysis of 99 microdissected prostate carcinomas reveals a high frequency of allelic loss on chromosome 8p12-21. *Cancer Res.* 56: 2411 - 2416.
- Washburn JG, Wojno KJ, Dey J, Powell IJ, Macoska JA.**, (2000) 8pter-p23 deletion is associated with racial differences in prostate cancer outcome. *Clin Cancer Res.* 6: 4647 - 4652.
- Wang JC, Radford DM, Holt MS, Helms C, Goate A, Brandt W, Parik M, Phillips NJ, DeSchryver K, Schuh ME, Fair KL, Ritter JH, Marshall P, Donis-Keller H.**, (1999) Sequence-ready contig for the 1.4-cM ductal carcinoma in situ loss of heterozygosity region on chromosome 8p22-p23. *Genomics* 60: 1 – 11.
- Wang SI, Puc J, Li J, Bruce JN, Cairns P, Sidransky D, Parsons R.**, (1998) Somatic mutations of PTEN in glioblastomas multiform. *Cancer Research* 58: 2500 – 2503.
- Wiegand P, Domhove J, Brinkmann B.**, (1996) DNA-Degradation in formalinfixiertem Gewebe, *Pathologie*: 451 - 454.
- Williams C, Ponten F, Moberg C, Soderkvist P, Uhlen M, Ponten J, Sitbon G, Lundberg J.**, (1999) A high frequency of sequence alternations is due to formalin fixation of archival specimens. *American Journal of Pathology* 155, 5: 1467 - 1471.
- Wolf, C.M.**, (1960) An investigation of the familial aspects of carcinoma of the prostate. *Cancer* 13: 361 - 364.
- Wright K, Wilson PJ, Kerr J, Do K, Hurst T, Khoo SK, Ward B, Chenevix-Trench G.**, (1998) Frequent loss of heterozygosity and three critical regions on the short arm of chromosome 8 in ovarian adenocarcinomas. *Oncogene* 17: 1185 - 1188.
- Wu CL, Roz L, Sloan P, Read AP, Holland S, Porter S, Scully C, Speight PM, Thakker N.**, (1997) Deletion mapping defines three discrete areas of allelic imbalance on chromosome arm 8p in oral and oropharyngeal squamous cell carcinomas. *Genes Chromosomes Cancer* 20: 347 - 353.

- Wu W, Kemp BL, Proctor ML, Gazdar AF, Minna JD, Hong WK, Mao L.**, (1999) Expression of DMBT1, a candidate tumor suppressor gene, is frequently loss in lung cancer. *Cancer Res.* 59: 1846 - 1851.
- Xu J, Zheng SL, Hawkins GA, Faith DA, Kelly B, Isaacs SD, Wiley KE, Chang B, Ewing CM, Bujnovszky P, Carpten JD, Bleecker ER, Walsh PC, Trent JM, Meyers DA, Isaacs WB.**, (1998) Evidence of prostate cancer susceptibility locus on the X chromosome. *Nat Genet.* 20: 175 – 179.
- Xu J, Zheng SL, Hawkins GA, Faith DA, Kelly B, Isaacs SD, Wiley KE, Chang B, Ewing CM, Bujnovszky P, Carpten JD, Bleecker ER, Walsh PC, Trent JM, Meyers DA, Isaacs WB.**, (2001) Linkage and association studies of prostate cancer susceptibility: evidence for linkage at 8p22-23. *Am J Hum Genet.* 69: 341 – 350.
- Xu J, Zheng SL, Chang B, Smith JR, Carpten JD, Stine OC, Isaacs SD, Wiley KE, Henning L, Ewing C, Bujnovszky P, Bleecker ER, Walsh PC, Trent JM, Meyers DA, Isaacs WB.**, (2001) Linkage of prostate cancer susceptibility locus on chromosome 1. *Hum Genet.* 108: 335 – 345.
- Yamakawa H, Nagase S, Yuki M, Shiwaku HO, Furukawa T, Yoshinaga K, Soeda E, Hoshi M, Hayashi Y, Sato S, Yajima A, Horii A.**, (1998) Identification of a 100-kb region of common allelic loss on chromosome bands 10q25-q26 in human endometrial cancer. *Genes Chromosomes Cancer* 23: 74 - 77.
- Yan G, McBride G, McKeenan WL.**, (1993) Exon skipping causes alteration of the COOH-terminus and deletion of the phospholipase C gamma 1 interaction site in the FGF receptor 2 kinase in normal prostate epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 194 (1): 512 - 518.
- Yaremko ML, Kutza C, Lyzak J, Mick R, Recant WM, Westbrook CA.**, (1996) Loss of heterozygosity from the short arm of chromosome 8 is associated with invasive behavior in breast cancer. *Genes Chromosomes Cancer* 16: 189 - 195.

Yokota T, Yoshimoto M, Akiyama F, Sakamoto G, Kasumi F, Nakamura Y, Emi M., (1999)

Localization of a tumor suppressor gene associated with the progression of human breast carcinoma within a 1-cM interval of 8p22-p23.1. *Cancer* 85: 447 - 452.

Zurborn KH, Sondermann I, Gross WL., (1985) Decrease of paraprotein secretion despite

progressive tumor cell proliferation by cytostatic drug therapy of plasmacytoma. *Internist* 26 (9): 584 - 586.

Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die von mir vorgelegte Dissertation selbständig angefertigt, die benutzten Quellen und Hilfsmittel vollständig angegeben und die Stellen der Arbeit, die anderen Werken im Wortlaut oder Sinn nach entnommen sind, in jedem Einzelfall als Entlehnung kenntlich gemacht habe; dass diese Dissertation noch nicht veröffentlicht worden ist sowie, dass ich einer solchen Veröffentlichung vor Abschluss der Promotion nicht vornehmen werde. Die Bestimmungen der Promotionsordnung sind mir klar. Die von mir vorgelegte Dissertation ist von Frau Prof. Dr. Royer-Pokora betreut worden.

Düsseldorf, den 27. 11. 2003

Igor Gerasimovski

Danksagung

Mein besonderer Dank meiner Betreuerin und Doktormutter Frau Prof. Dr. Royer-Pokora für die freundliche Überlassung des Themas, ihrer Betreuung, ihre engagierte Unterstützung, viele wichtige Anregungen, ihr zur Verfügung gestelltes Wissen, ihre tatkräftige Hilfe und ständige Gesprächsbereitschaft.

Herrn Prof. Dr. Rüter möchte ich herzlich für die Durchsicht meiner Dissertation und die angeregte Diskussion bedanken.

Ich möchte mich auch bei all denen bedanken, die durch ihre Unterstützung und ihre Hilfe zum Erfolg dieser Arbeit beigetragen haben. Mein Dank gilt deshalb Herrn Prof. Dr. Wernert vom Pathologischen Institut in Bonn für die Begutachtung der Paraffinpräparate der Prostatakarzinompatienten, und Herrn Dr. Schulz (Urologische Klinik Düsseldorf) und Herrn Dr. Enczman (Institut für Transplantationsdiagnostik und Zelltherapie) für das Überlassen der Blut-DNA-Proben für die Polymorphismusanalyse von *HPC2/ELAC2*.

Mein Dank gilt auch allen Mitarbeitern und Kollegen im Institut für Humangenetik und Anthropologie für ihre angenehme Zusammenarbeit und viele Hilfestellungen und der Korrektur dieser Arbeit; besonders bedanken möchte ich mich bei Hilde, Ralph, Anke, Gerald, Steffi, Yasmin, Melissa und Edith.

Von ganzem Herzen möchte ich meinen Eltern danken, die mir meinen Werdegang ermöglicht haben und meinem kleinen Schatz Niklas, der mir in dieser Zeit sehr viel Kraft gegeben hat.

Zum Schluss danke ich meinem Ego, das sich nie unterkriegen ließ!

Lebenslauf

Persönliche Daten

Igor Gerasimovski
geboren am 11.10.1970 in Bocholt
ledig, 1 Kind

Promotion

08/1999–03.02/2003 Am „Institut für Humangenetik und Anthropologie“ in Düsseldorf
Themen:
*„Analyse von genomischen Veränderungen in Prostatakarzinomen
der Tumor-Suppressorregion 10q26 und eines putativen
Prostatakarzinom–Suszeptibilitätsgens HPC2/ELAC2“*

Hochschulbildung

10/1992–08/1994 Vordiplom auf der „Carl–von–Ossietzky“–Universität in Oldenburg

09/1994–12/1997 Hauptstudium an der „Heinrich–Heine“-Universität in Düsseldorf
mit den Schwerpunkten Molekulare Genetik und Biochemie

01/1998–12/1998 Diplomarbeit am „Diabetes Forschungsinstitut“ in Düsseldorf.
Thema:
*„Relevanz der Proteinase C– α –Expression für die Aktivierung
kultivierter Endothelzellen durch Stressfaktoren“*

Ausbildung

07/1990–07/1992 Ausbildung zum Zierpflanzengärtner im Gärtnereibetrieb
„Willing“ in Bocholt

Berufstätigkeit

- 03/1995 – 04/1995 Mitarbeiter im Labor (Blutgruppentypisierung) des *St. Agnes-Hospitals* in Bocholt
- 10/1992 – 12/1997 In den Semesterferien Werksstudent in der Produktion von Stromspeichergeräten bei dem Elektronunternehmen *Theo Benning* in Bocholt und im Semester Aushilfe beim Dachdeckerunternehmen *Kitschenberg* in Düsseldorf.
- 01/1999 – 03/1999 Aushilfskraft bei der Firma *Fahrrad Rose* in Bocholt
- 03/1999 – 05/1999 Werksstudent bei der *Bayer AG* in Monheim im *Institut für Pflanzenschutz* bei Herrn Dr. Drewes.

Schulbildung

- 07/1977–09/1979 Grundschule „Banovic Strahinja“ in Belgrad
- 10/1979–06/1981 Grundschule „Klemens–August“ in Bocholt
- 07/1981–06/1987 Erwerb der Fachhochschulreife auf der „Israhel–van–Meckenem“–Realschule in Bocholt
- 07/1987–06/1990 Erwerb der Hochschulreife auf dem „Euregio–Gymnasium“ in Bocholt

Düsseldorf, den 27. 11. 2003