

### 3 Ergebnisse

Um eine Mikrosatellitenanalyse von Prostatakarzinomen zum LOH-Nachweis und anschließender Mutationsanalyse von PTEN durchführen zu können, benötigt man genomische DNA aus dem Tumorgewebe und des dazugehörigem Normalgewebe. In der Regel werden Tumorzellen aus dem Prostatakarzinom und Normalzellen aus Lymphozyten des Blutes gewonnen. Da es sich bei dieser Arbeit um eine retrospektive Studie handelt, war es nicht möglich Lymphozyten zu verwenden.

Die Normal- und Tumorzellen wurden durch manuelle Mikrodisektion (vgl.2.2.2) gewonnen. Hierfür wurden die Paraffinblöcke unter dem Mikroskop vom Pathologen begutachtet und Bereiche von Tumor- bzw. Normalgewebe gekennzeichnet. Mit dem Schlittenmikrotom konnten dann die Gewebe getrennt voneinander gewonnen werden. Bei der Probengewinnung wurde darauf geachtet, daß Tumorgewebe nicht mit Normalgewebe und Normalgewebe nicht mit Tumorgewebe verunreinigt wurde. Diese Anforderungen konnten durch sauber durchgeführte Mikrodisektion erfüllt werden.

Für die vorliegende Arbeit wurde DNA von 40 Patienten (jeweils Tumor- und Normalgewebe) aus Paraffinschnitten isoliert.

Die Tabelle 3.1 zeigt eine Übersicht der verwendeten DNA:

lfd. Nummer	interne Bezeichnung	Alter des Patienten	histopathologische Klassifizierung	Grading
1	006	59	pT2aN0	3
2	007	68	pT3pN0	3
3	008	58	pT3cpN2	3
4	150	56	pT4apN0	3
5	024	66	pT2cpN0	3
6	042	54	pT3apN0	3
7	047	57	pT3cpN0	3
8	553	59	pT2cpN0	3
9	060	54	pT4apN1	3
10	065	70	pT3cpN0	3
11	069	61	pT3pN0	3

lfd. Nummer	interne Bezeichnung	Alter des Patienten	histopathologische Klassifizierung	Grading
12	076	66	pT3cpN0	3
13	083	55	pT2cpN0	3
14	099	58	pT3cpN0	3
15	108	66	pT3cpN0	3
16	117	68	pT4apN1	3
17	149	55	pT3cpN2	3
18	172	54	pT3cpN2	3
19	188	59	pT3apN0	3
20	190	64	pT2cpN0	3
21	194	71	pT3cpN2	3
22	055	65	pT2cpN0	2
23	068	72	pT2cpN0	2
24	093	69	pT2cpN0	2
25	139	61	pT4apN1	2
26	1398	69	pT2bpN0	2
27	140	56	pT2bpN0	2
28	150	51	pT3apN0	2
29	159	65	pT2cpN0	2
30	167	68	pT2cpN0	2
31	168	66	pT3pN0	2
32	041	65	pT2pN0	1
33	043	64	pT3pN0	1
34	062	45	pT2cpN0	1
35	074	55	pT2pN0	1
36	087	65	pT2pN0	1
37	095	48	pT1pN0	1
38	104	65	pT3pN0	1
39	135	52	pT2pN0	1
40	184	67	pT2pN0	1

**Tabelle 3.1 Patienten-DNA**

Die Prostatakarzinome der vorliegenden Arbeit wiesen unterschiedliche histologische Klassifizierungen auf.

Prostatakarzinome unterschiedlichster Genese werden gemäß der **TNM-Klassifikation** eingeteilt. Diese TNM-Klassifikation wurde von der Union internationale contre le cancer (UICC) vorgeschlagen. Dabei beschreibt T (Tumor)

die Ausdehnung des Primärtumors, N (Nodulus) das Fehlen bzw. Vorhandensein von regionären Lymphknotenmetastasen und M (Metastasen) das von Fernmetastasen. Die pTNM-Klassifikation ist die histopathologische Klassifizierung. Die pT-, pN- und pM-Kategorien entsprechen den T-, N- und M- Kategorien

Nach der klinischen TNM-Klassifikation werden folgende Stadien des Prostatakarzinoms unterschieden:

### **T-Primärtumor**

TX: Primärtumor kann nicht beurteilt werden

T0: kein Anhalt für Primärtumor

T1: Tumor ist zufälliger histologischer Befund (inzidental)

T1a: nicht mehr als drei mikroskopische Karzinomherde

T1b: mehr als drei mikroskopische Karzinomherde

T2: Tumor klinisch oder makroskopisch vorhanden, auf die Drüse begrenzt

T2a: Tumor 1,5 cm oder weniger im größten Durchmesser, mit normalen Gewebe an zumindest drei Seiten

T2b: Tumor mehr als 1,5 cm im größten Durchmesser oder in mehr als in einem Lappen

T3: Tumor infiltriert in Apex der Prostata oder in oder jenseits der Prostatakapsel oder in Blasenhalshals oder Samenblase, ist jedoch nicht fixiert

T4: Tumor ist fixiert oder infiltriert Nachbarstrukturen, die bei T3 nicht aufgeführt sind

### **N-regionale Lymphknoten**

N1: Befall eines Lymphknotens

N2: Befall mehrerer regionärer Lymphknoten, jedoch nicht fixiert

N3: Fixation befallener regionärer Lymphknoten

N4: Befall entfernter Lymphknoten

### **M-Fernmetastasen**

M0: keine Fernmetastasen

M1: Fernmetastasen

Bei der Auswahl der Prostatakarzinome wurde darauf geachtet, daß alle Malignitätsgrade (Gradings) vertreten waren. Dem histopathologischen Aufbau der Prostatakarzinome entsprechen unterschiedliche Grade der Bösartigkeit.

Es werden drei Grade der Malignität unterschieden:

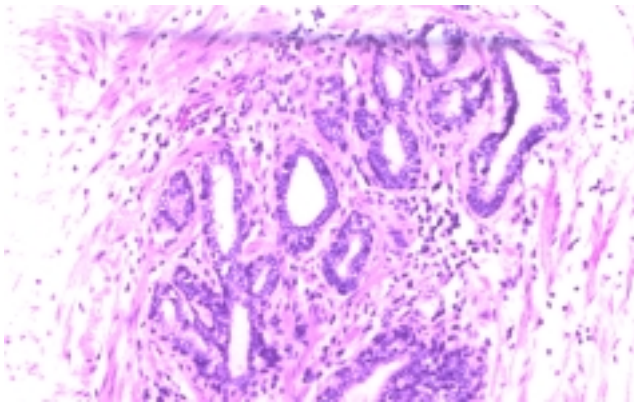


Abb.3.1  
G1: hochdifferenziert,  
leichte Anaplasie, geringe  
Metastasierungsrate

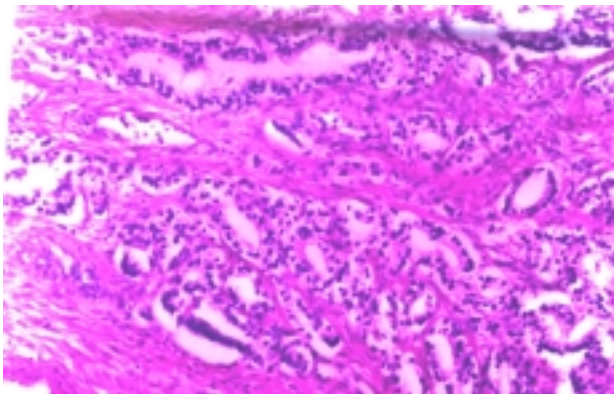


Abb.3.2  
G2: mäßig differenziert,  
mäßige Anaplasie und  
Metastasierungsrate

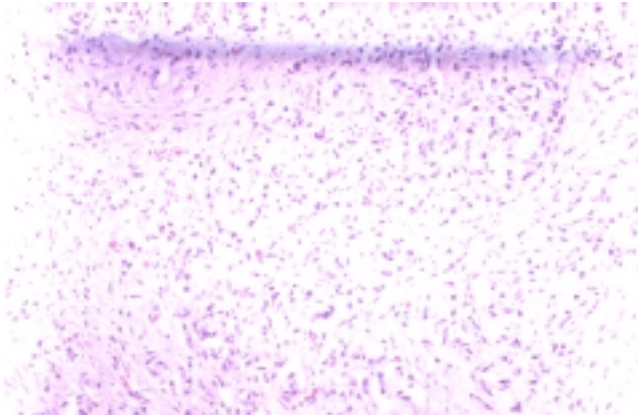


Abb.3.3  
G3: schlecht  
differenziert/undifferenziert,  
ausgeprägte Anaplasie,  
hohe Metastasierungsrate

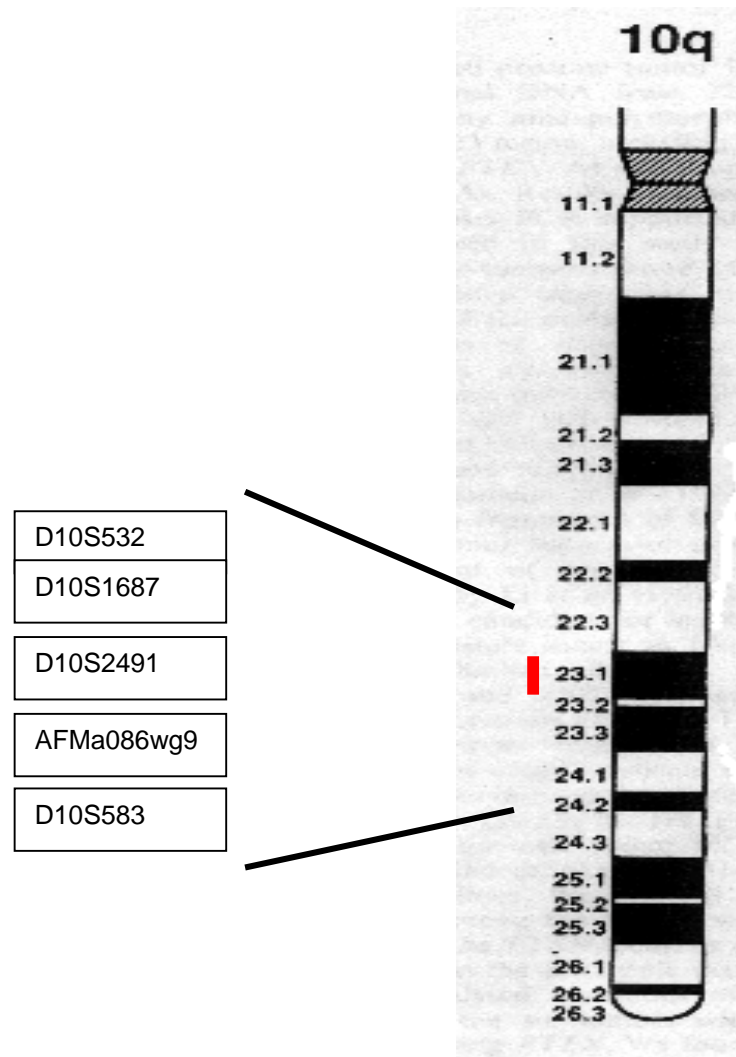
### 3.1 Untersuchungen zu LOH

Wie *Knudson* in seiner 2–Schritt–Hypothese postuliert, müssen zwei Ereignisse eintreten, um den Funktionsverlust eines Tumorsuppressorgens zu bewirken (siehe Einleitung S.6-8). Der Nachweis von LOH dient der Darstellung eines der beiden Ereignisse, d.h. des Verlusts eines Allels des Tumorsuppressorgens. Erst wenn LOH nachgewiesen wurde, kann in einer weiteren Untersuchung das Auftreten des anderen Ereignisses gezeigt werden.

Um LOH nachzuweisen wurde die genomische DNA aller 40 Patienten, jeweils Normalgewebe getrennt von Tumorgewebe, amplifiziert (vgl.2.2.4). Die PCR der insgesamt 80 Patientenproben wurde mit fünf fluoreszenzmarkierten Primerpaaren, die im Bereich des PTEN lokalisiert sind, durchgeführt. Die PCR der auf 50 ng/µl eingestellten Patienten–DNA verlief über 35 Zyklen mit einer vorangestellten Denaturierungsphase bei 95°C für 5min, einem Zyklus von 94°C für 60s, 55°C für 60s, 72°C für 60s und einer abschließenden Synthesephase bei 72°C für 7 min. Für jeden Patienten wurden somit zehn unterschiedliche PCR–Reaktionen hergestellt (jeweils fünf PCR–Reaktionen für Normal– und Tumorgewebe).

Von den Primerpaaren liegen jeweils zwei proximal (D10S532 und D10S1687) und distal (AFMa086wg9 und D10S583) vom Gen, ein Primerpaar (D10S2491) weist eine intragenische Lage auf. Die Sequenzen für das intragenische Primerpaar D10S2491 wurden erst während der laufenden Experimente veröffentlicht.

Die Abbildung 3.4 zeigt die Lage der einzelnen Primer (28) in bezug auf das **Gen PTEN**:



**Abb. 3.4: Lokalisation der Primer**

Die Überprüfung der PCR erfolgte durch die Auftrennung der PCR-Fragmente in einem 1,5 %igen Agarosegel (vgl.2.2.4).

Entsprechend den Angaben in Material und Methoden (vgl.2.2.5) wurden die PCR-Produkte der einzelnen Patientenproben (getrennt nach Tumor- und Normalgewebe) im DNA-Sequenzautomat ABI 377A analysiert.

Bei der durchgeführten Mikrosatelliten-Analyse wiesen 14 von 40 Patienten (35 %) im Bereich von mindestens einem Loci den Verlust von Heterozygotie auf.

LOH wurde durch den Verlust von mehr als 2/3 der Intensität der Bande des betroffenen Allels definiert. Da die Produktmenge und damit die „Peak“-Höhe der einzelnen Mikrosatelliten nicht in allen Experimenten konstant war, wurden durch Erhöhung oder Verminderung die Anteile der einzelnen PCR-Produkte im Analysengemisch so korrigiert, daß sie mit dem Programm Genotyper<sup>®</sup> ausgewertet werden konnten.

Bei der Auswertung der Mikrosatelliten-Analysen ist die Kenntnis des sogenannten „Plus A Artefakts“ hilfreich, welches zum Auftreten von „Stotterbanden“ führen kann. Die Taq-Polymerase hinterläßt während der PCR ein Adenylsäurerest am 3'-Ende der doppelsträngigen DNA (5–10%). Ist nur ein Ende der DNA betroffen beträgt der Längenunterschied eine Base, befindet sich der Adenylsäurerest an beiden DNA-Strängen verlängert sich das PCR-Produkt um zwei Basen. Beachtet werden muß, daß die Amplifikation (wie jede chemische Reaktion) nicht vollständig abläuft, so daß das PCR-Produkt an sich eine gewisse Variation der Länge erfährt. Diese Gegebenheiten können bei der Mikrosatelliten-Analyse insbesondere bei CA-repeats zum Auftreten von einer Reihe zusätzlicher „peaks“ führen, die einen Längenunterschied unterschiedlichster Anzahl von Basenpaaren aufweisen (die sogenannten Stotterbanden). Da die Produktmenge der Artefakte aber wesentlich geringer ist als das eigentliche PCR-Produkt ist die Höhe (und damit die Konzentration) der Ausschläge maßgeblich und wird entsprechend vom Programm Genotyper<sup>®</sup> berücksichtigt.

Ein weiterer Aspekt ist, daß die Mikrosatelliten-Analyse bei homozygoten Genloci keine Aussage darüber erlaubt, ob beim Tumorgewebe ein Allel verloren gegangen ist oder nicht. Diese Genloci wurden von uns als Homozygotie/nicht informativ bezeichnet (vgl. Tab.3.2).

Die Abbildungen 3.5 bis 3.11 auf den folgenden Seiten zeigen ausgewählte DNA von Patienten, die den Verlust von Heterozygotie der spezifischen Primerpaare und das Auftreten der Stotterbanden veranschaulichen:



**Primerpaar D10S532 / Patient 159**

Normalgewebe

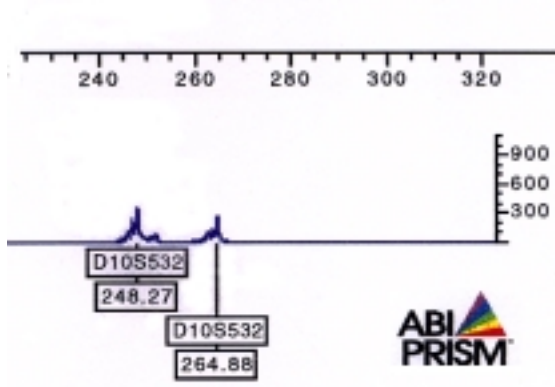


Abb. 3.5

Tumorgewebe ( LOH )

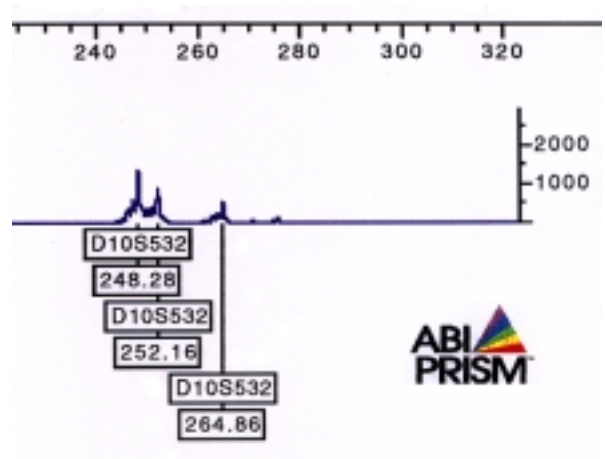


Abb. 3.6

**Primerpaar D10S2491 / Patient 159**

Normalgewebe

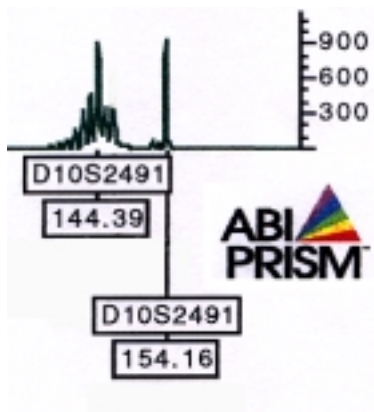


Abb. 3.7

Tumorgewebe ( LOH )

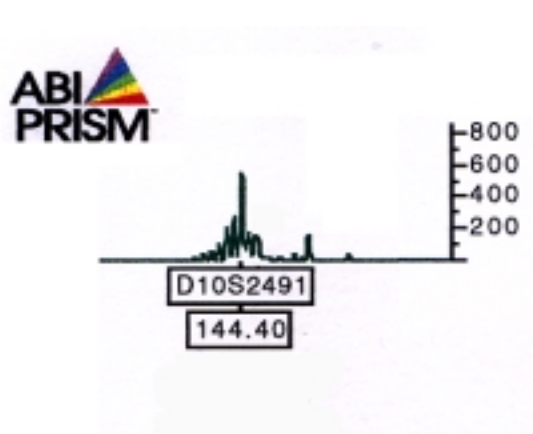


Abb. 3.8

**Primerpaar AFMa086wg9 / Patient 149**

Normalgewebe

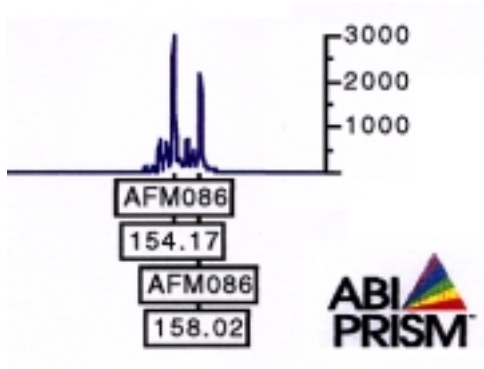


Abb. 3.8

Tumorgewebe ( LOH )

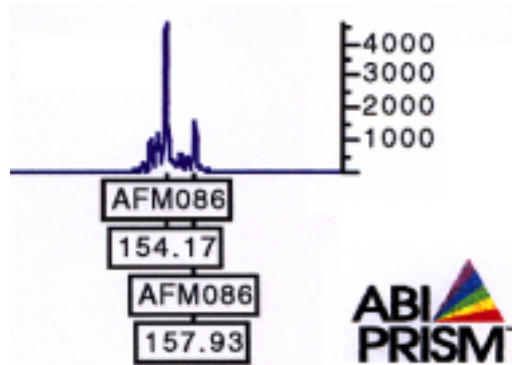


Abb. 3.9

**Primerpaar D10S583 / Patient 117**

Normalgewebe

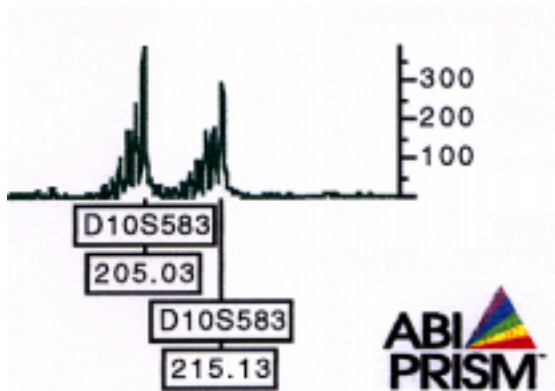


Abb. 3.10

Tumorgewebe ( LOH )

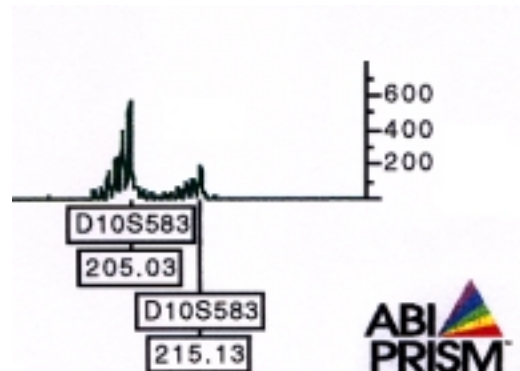
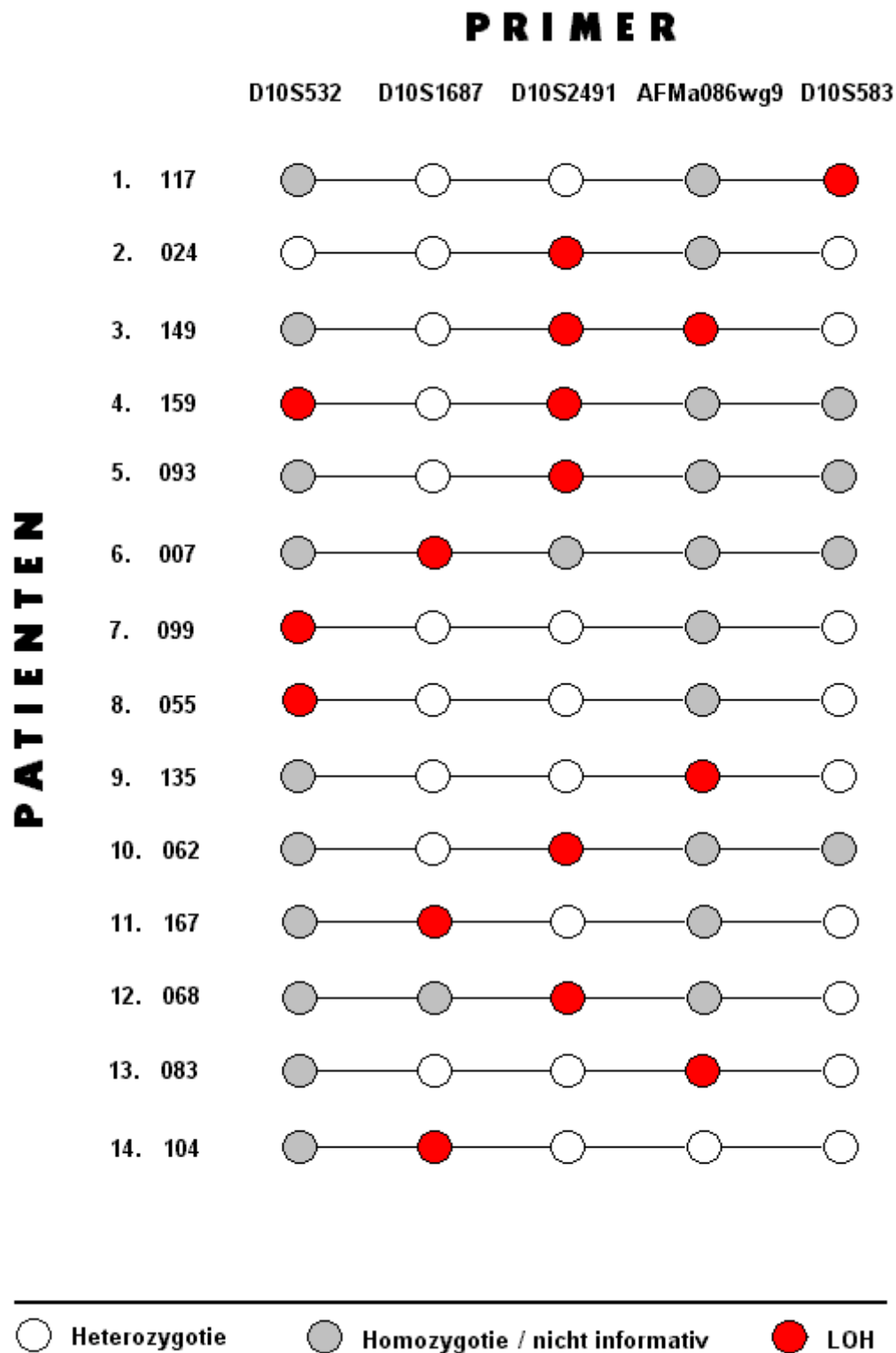


Abb. 3.11

In Tabelle 3.2 sind die Ergebnisse zur Untersuchung von LOH zusammengefaßt:



*Tabelle 3.2: Nachweis von LOH*

Es wurde von uns ein Vergleich zwischen der histopathologischen Klassifizierung und dem Auftreten von Verlust der Heterozygotie vorgenommen.

Von den von uns untersuchten 40 Patienten beschränkte sich der Tumor bei 33 Patienten auf die Prostata, den Blasenhalshals und/oder der Samenblase (Stadium pT1-4pN0pM0). Bei 7 der Patienten waren nicht nur die Prostata, sondern auch die Beckenlymphknoten befallen (Stadium pT1-4pN1-2pM0). Von den 33 Patienten trat LOH bei 12 Patienten auf (Patienten 083, 099, 007, 024, 055, 068, 093, 159, 167, 062, 104, und 135). Das sind 36 %. Das Vorkommen von LOH bei den 7 Patienten, bei denen neben der Prostata auch die Beckenlymphknoten infiltriert waren, betrug 29 % (Patienten 117 und 149).

Die Tabelle 3.3 zeigt eine Übersicht (die Patienten, bei denen die Beckenlymphknoten infiltriert waren sind grau unterlegt):

lfd. Nummer	eigene Bezeichnung	Auftreten von LOH	histopathologische Klassifizierung	Grading
1	<b>060</b>	-	PT4apN1	3
2	<b>117</b>	ja	PT4apN1	3
3	<b>008</b>	-	pT3cpN2	3
4	<b>149</b>	ja	PT3cpN2	3
5	<b>172</b>	-	PT3cpN2	3
6	<b>194</b>	-	pT3cpN2	3
7	<b>047</b>	-	pT3cpN0	3
8	<b>553</b>	-	pT2cpN0	3
9	<b>006</b>	-	PT2a pN0	3
10	<b>065</b>	-	pT3cpN0	3
11	<b>069</b>	-	pT3pN0	3
12	<b>076</b>	-	pT3cpN0	3
13	<b>083</b>	ja	pT2cpN0	3
14	<b>099</b>	ja	pT3c pN0	3
15	<b>108</b>	-	pT3cpN0	3
16	<b>007</b>	ja	pT3 pN0	3
17	<b>150</b>	-	pT4apN0	3
18	<b>024</b>	ja	PT2cpN0	3

lfd. Nummer	eigene Bezeichnung	Auftreten von LOH	histopathologische Klassifizierung	Grading
19	188	-	pT3apN0	3
20	190	-	pT2cpN0	3
21	042	-	pT3apN0	3
22	055	ja	pT2cpN0	2
23	068	ja	pT2cpN0	2
24	093	ja	pT2cpN0	2
25	139	-	pT4apN1	2
26	1398	-	pT2b pN0	2
27	140	-	pT2b pN0	2
28	150	-	pT3apN0	2
29	159	ja	pT2c pN0	2
30	167	ja	pT2cpN0	2
31	168	-	pT3pN0	2
32	041	-	pT2pN0	1
33	043	-	pT3pN0	1
34	062	ja	pT2cpN0	1
35	074	-	pT2pN0	1
36	087	-	pT2pN0	1
37	095	-	pT1pN0	1
38	104	ja	pT3 pN0	1
39	135	ja	pT2 pN0	1
40	184	-	pT2pN0	1

**Tabelle 3.3: Vorkommen von LOH abhängig von der histopathologischen Klassifizierung und Grading**

### 3.2 Nachweis von Mutationen bei Tumorgeweben mit LOH

Das Auftreten von LOH in 35 % der untersuchten Patientenproben berechtigt eine weitergehende Mutationsanalyse der DNA, die den Nachweis der Inaktivierung des zweiten Allels (z.B. durch Punktmutation) zur Folge haben kann. Um ein mutmaßliches TSG wie das PTEN in einen kausalen Zusammenhang mit der Ätiologie eines Tumors zu bringen, muß nach *Knudsons „2-Schritt-Hypothese“* bewiesen werden, daß neben dem zweiten Ereignis (Verlust von Heterozygotie) auch das erste Ereignis (meist eine Mutation durch Basenaustausch oder Deletion) am

noch vorhandenen Allel stattgefunden hat (siehe Einleitung S.6-8). Um den Nachweis zu führen, daß das erste Ereignis stattgefunden hat, wurden alle LOH aufweisenden Tumorproben sequenziert.

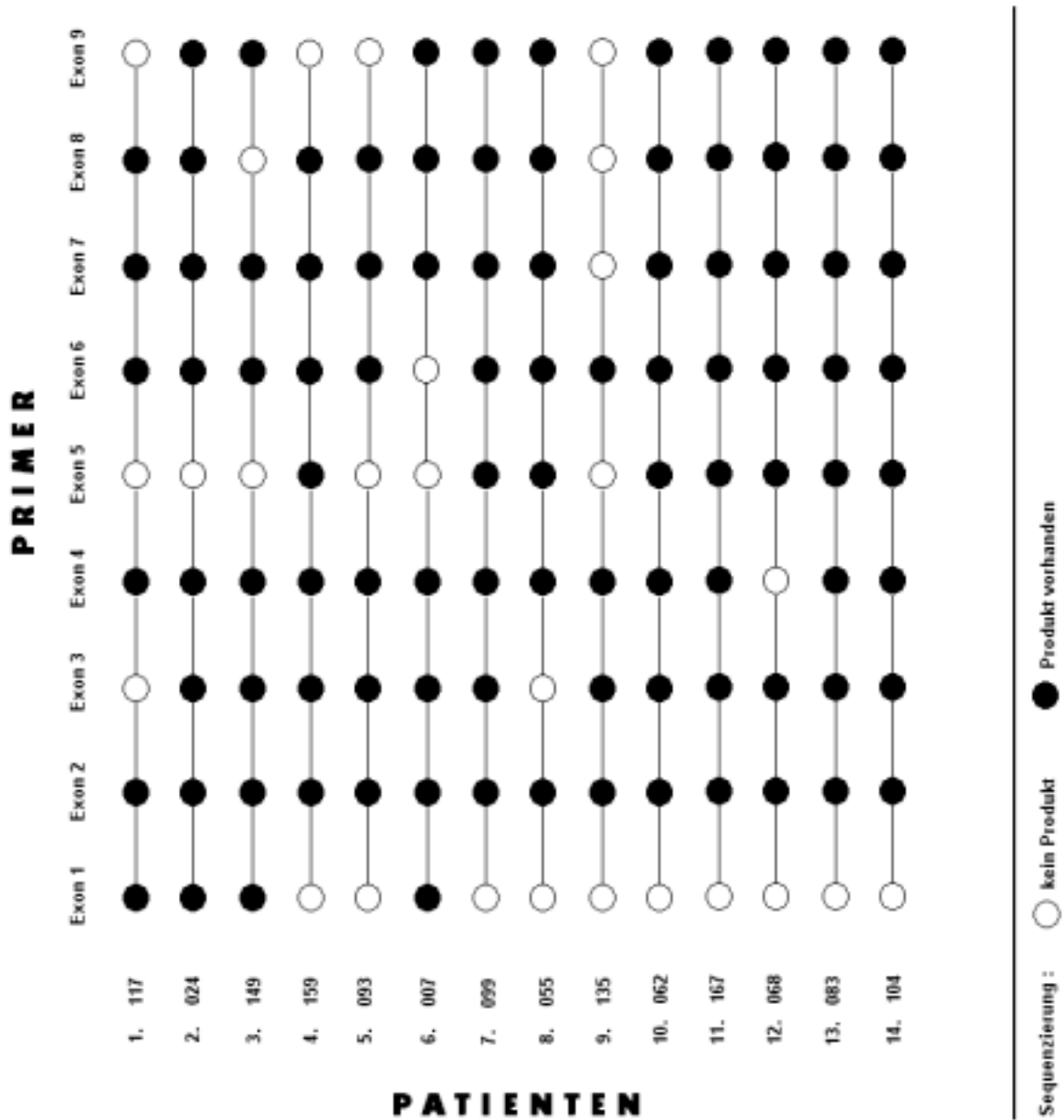
Hierfür wurden die genomischen DNA (jeweils Tumor- von Normalgewebe getrennt) unter der Verwendung der exonspezifischen Primerpaare aller neun Exons des Gen PTEN amplifiziert. Die anschließende Sequenzierung erfolgte mit dem DNA Sequenzautomaten ABI 377A (vgl.2.2.6).

Konnten die PCR-Produkte nicht direkt sequenziert werden, wurde eine vorherige Klonierung der PCR-Produkte (vgl.2.2.7) durchgeführt.

Der Nachweis von Mutationen erfolgte nach dem Vergleich der Sequenzen beider Richtungen (5'-3' – und 3'-5' – Richtung) mit der publizierten Wildtyp-Sequenz (EMBL accession number: U93051).

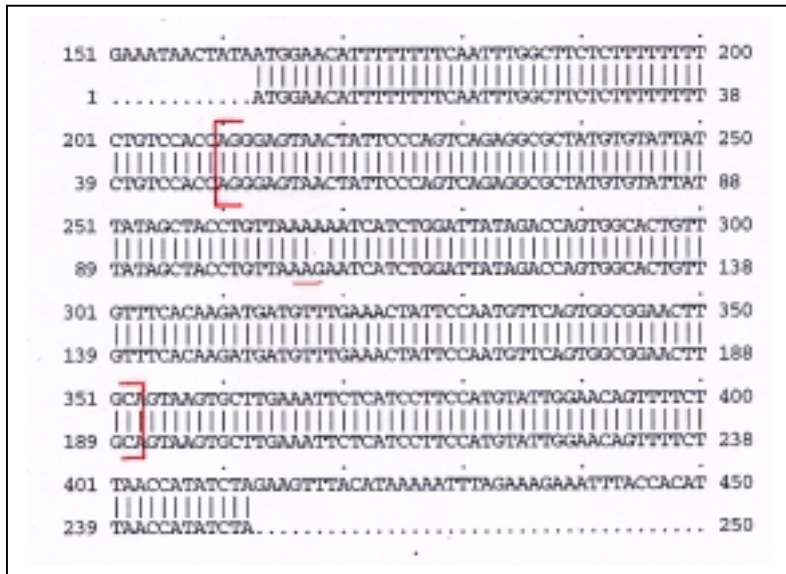
80% aller in Frage kommenden PCR-Produkte konnten sequenziert und ausgewertet werden.

Die nachfolgende Tabelle 3.4 zeigt einen Überblick über die Sequenzierung aller LOH aufweisenden Tumorproben:

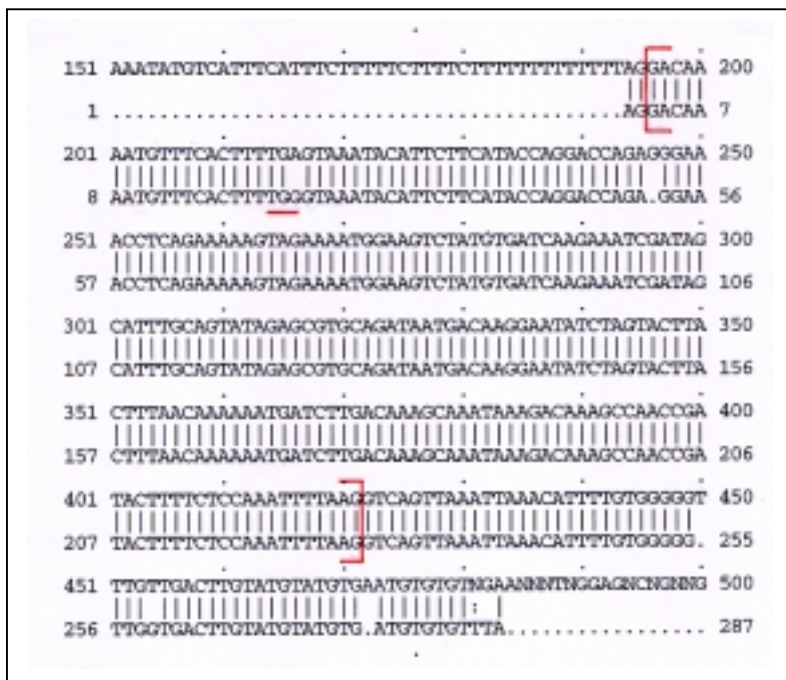


**Tabelle 3.4: Sequenzierung der LOH aufweisenden Patientenproben**

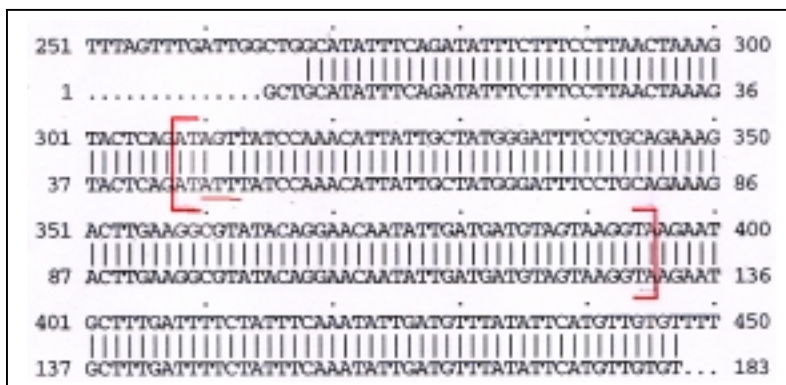
Die Abbildungen 3.12 bis 3.19 auf den folgenden Seiten zeigen die detektierten Mutationen der LOH aufweisenden Patientenproben (die obere Sequenz ist die zu untersuchende Patienten-DNA, während der untere DNA-Strang die Datenbank-/Konsensus-Sequenz darstellt) :



**Abb. 3.12:**  
 Patient 007/ exon 6  
 Basenaustausch  
 AAG → AAA  
 Aminosäuresequenz  
 K 183 → K  
 An der 183. Amino-  
 säure kodieren  
 die Basen AAG und  
 AAA für die gleiche  
 AS K ( Lysin ).

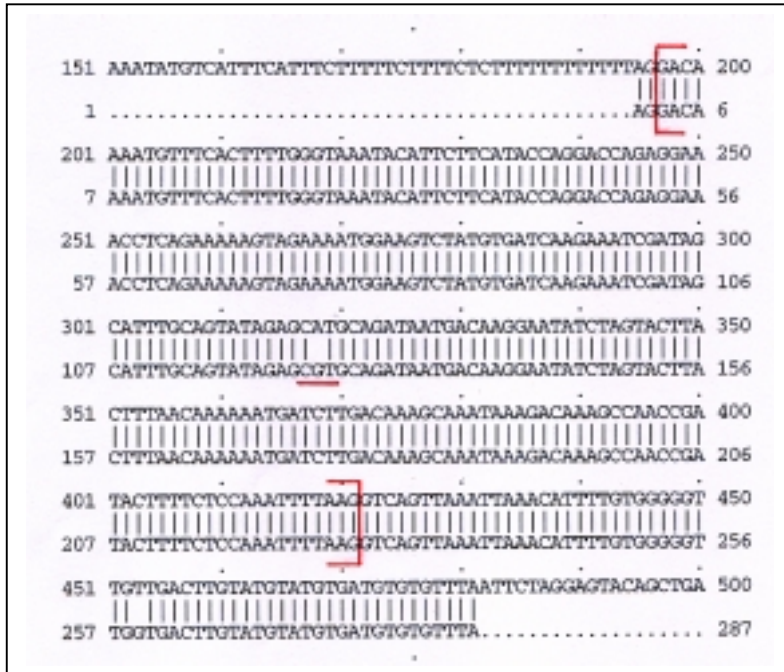


**Abb. 3.13:**  
 Patient 068 / exon8  
 Basenaustausch  
 TGG → TGA  
 Aminosäuresequenz  
 W 274 → #  
 An der 274. AS  
 kodieren die Basen  
 nicht für die AS  
 Tryptophan (W),  
 sondern für die  
 Termination (#).

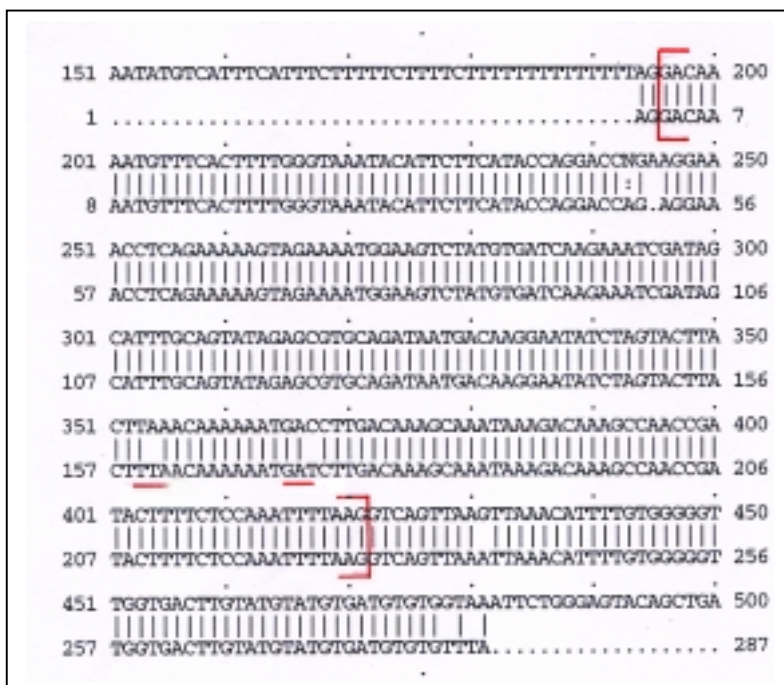


**Abb. 3.14:**  
 Patient 099 / exon2  
 Basenaustausch  
 ATT → AGT  
 Aminosäuresequenz  
 I 28 → S  
 An der 28. AS  
 kodieren die Basen  
 nicht für die AS  
 Isoleucin(I), sondern  
 für Serin (S).

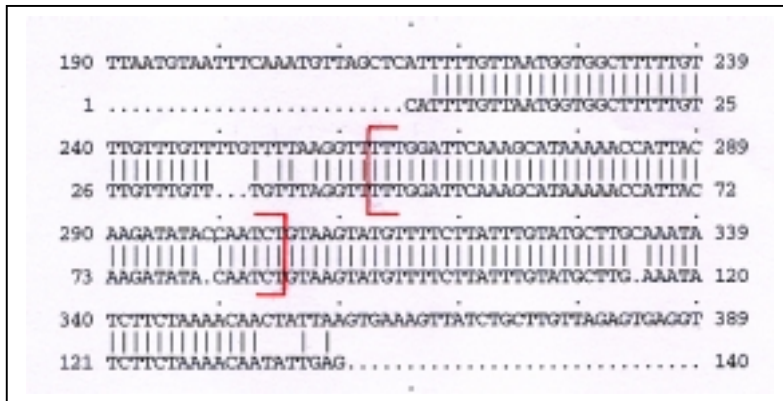




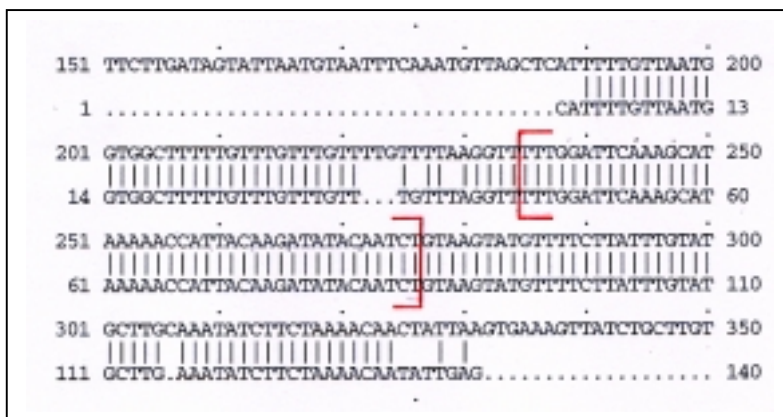
**Abb. 3.15:**  
 Patient 104 / exon 8  
 Basenaustausch  
 CGT → CAT  
 Aminosäuresequenz  
 R 308 → H  
 An der 308. AS  
 kodieren die Basen  
 nicht für die AS  
 Arginin (R), sondern  
 für Histidin (H).



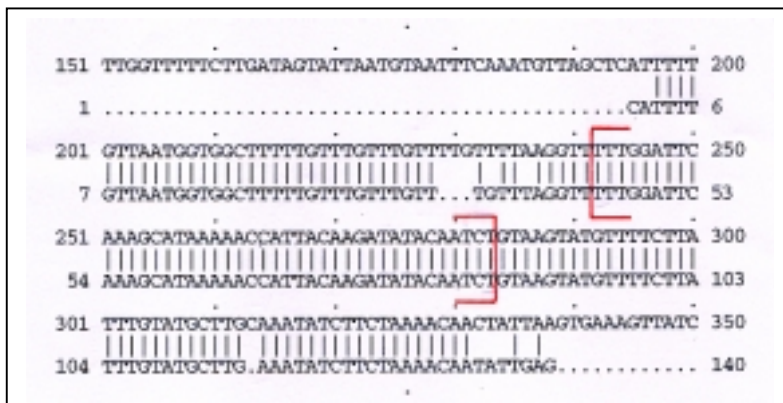
**Abb. 3.16:**  
 Patient 117 / exon 8  
 Bei diesem Patient  
 liegen zwei  
 Mutationen vor.  
 1. Basenaustausch  
 TTA → TAA  
 Aminosäuresequenz  
 L 320 → #  
 An der 320. AS  
 kodieren die Basen  
 nicht für die AS  
 Leucin(L), sondern für  
 die Termination (#).  
 2. Basenaustausch  
 GAT → GAC  
 Aminosäuresequenz  
 D 324 → D  
 An der 324. AS  
 kodieren die Basen  
 GAT und GAC für die  
 AS Asparaginsäure  
 (D).



**Abb. 3.17:**  
 Patient 104 / Intron  
 zwischen Exon 2  
 und Exon 3  
 Die rote Markierung  
 begrenzt das Exon 3.



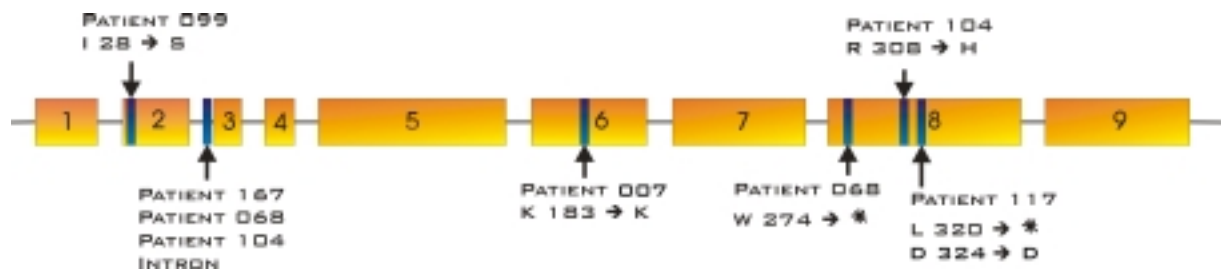
**Abb. 3.18:**  
 Patient 167 / Intron  
 zwischen Exon 2  
 und Exon 3  
 Die rote Markierung  
 begrenzt das Exon 3.



**Abb. 3.19:**  
 Patient 068 / Intron  
 zwischen Exon 2  
 und Exon 3  
 Die rote Markierung  
 begrenzt das Exon 3.

**Gemeinsamer  
 Kommentar:**  
 Basenaustausch  
 G → T und T → A  
 bei allen drei  
 Patienten.

Die folgende Abbildung 3.20 gibt eine Übersicht über Lage und Art der Mutationen der betreffenden LOH aufweisenden Patientenproben:



**Abb. 3.20: Lokalisation der Mutationen**

Von 14 Patienten, die LOH aufwiesen, konnten bei vier Patienten Punktmutationen detektiert werden.

Bei zwei dieser Patienten (104 und 099) führten die Mutationen zu einem Austausch der Aminosäuresequenz, in den beiden anderen Fällen (068 und 117) resultierten die Mutationen in den Einbau eines Stop-Codons.

In drei weiteren Fällen (167, 068, 104) wurden drei identische exonnahe Mutationen in Introns nachgewiesen, die möglicherweise ein verändertes „Splicing“ (Umwandlung eines primären RNA-Transkripts durch Herausschneiden von Introns und Zusammenfügen von Exons) zur Folge haben können.

Bei zwei Tumorproben (007 und 117) fand eine Substitution statt, doch kodierte die mutierte Nucleotid-Sequenz für die gleiche Aminosäure. Die Aminosäuresequenz blieb unverändert.