

## 4. Diskussion

Die vorliegende Arbeit soll einen Beitrag zur Klärung der Frage leisten, ob der Verlust des Tumorsuppressorgens PTEN, der bei verschiedenen anderen Tumoren nachgewiesen wurde, auch beim Prostatakarzinom zu beobachten ist und damit möglicherweise in einen Zusammenhang mit der Entstehung dieses Tumors gebracht werden kann.

Die Vermutung, daß zwischen Tumorentstehung und dessen Progression und dem Funktionsverlust des Tumorsuppressorgens PTEN ein kausaler Zusammenhang bestehen könnte, zeigen die Veröffentlichungen von *Boström et al.* (29) und *Wang et al.* (30). Diese beiden Arbeiten zählen zu den ersten Untersuchungen, bei denen ein hoher Anteil von Verlust von Heterozygotie (LOH) im PTEN bei bestimmten malignen Erkrankungen detektiert werden konnte.

Beide Arbeiten haben das Auftreten von LOH im Gen PTEN beim Glioblastoma multiforme (einem in höherem Alter auftretendem undifferenzierten malignen Hirntumor mit ausgeprägter Zellpolymorphie) untersucht. Nachdem eine erhöhte Rate von LOH im Tumor nachgewiesen werden konnte, wurde anschließend eine Mutationsanalyse der LOH aufweisenden Tumorgewebe durchgeführt.

*Wang et al.* konnten bei 74% seiner Patienten (bei 25 von 34 Patienten) den Verlust von Heterozygotie des Gen PTEN nachweisen. Bei der anschließenden Mutationsanalyse konnten 15 Mutationen (44%) detektiert werden.

*Boström et al.* untersuchten 36 Patienten. In diesem Patientenkollektiv lag das Vorkommen von LOH bei 69% (bei 25 von 36 Patienten). Auch hier wurde eine Sequenzierung der Tumorgewebe vorgenommen. Es konnten neun Mutationen (25%) nachgewiesen werden.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte geklärt werden, ob die am Glioblastoma multiforme von anderen Arbeitsgruppen gewonnenen Erkenntnisse analog beim Prostatakarzinom nachweisbar sind.

Hierzu wurde das Tumorgewebe von 40 Patienten unserer Klinik auf LOH in Umgebung des Gens PTEN untersucht. Die dafür benötigten Normal- und Tumorgewebe wurden durch manuelle Mikrodissektion von archivierten Paraffinblöcken gewonnen. Im Anschluß wurde die genomische DNA extrahiert und einer PCR-basierten Mikrosatelliten-Analyse unterzogen. Der Verlust von Heterozygotie trat bei 14 von 40 Patienten auf (35%).

Analysiert wurden 5 Loci, von denen ein Marker innerhalb des PTEN liegt, die anderen Marker flankieren das Gen proximal bzw. distal. Bei sechs von 14 Tumorgeweben (Patienten: 024, 149, 159, 093, 062, 068) konnten intragene Deletionen (Marker D10S2491) nachgewiesen werden. Bei dem Tumorgewebe 149 wurde eine umfangreiche Deletion entdeckt, die sich intragenisch beginnend bis distal ausdehnte. Acht Patienten (007, 135, 167, 083, 104, 117, 099, 055) wiesen LOH in den flankierenden DNA-Abschnitten proximal und distal vom Gen auf.

Vergleicht man die von uns an Prostatakarzinomen gewonnenen Daten zum LOH des PTEN mit denen anderer Gruppen, die ebenfalls Prostatumoren untersuchten, ergibt sich ein vergleichbares Bild.

*Pesche et al.* (31) analysierten 22 Patienten mit primären Prostatumoren hinsichtlich des Vorkommens von LOH im Gen PTEN. Es wurden neun Marker, einschließlich des auch von uns verwendeten D10S2491 zur Mikrosatelliten – Analyse eingesetzt. Bei zwölf Patienten wurde LOH nachgewiesen(55%), davon lag die Hälfte im Bereich des Gen PTEN.

*Dong et al.* (32) untersuchten bei 40 Patienten mit primären Prostatumoren LOH im Bereich des PTEN. Vergleichbar zu unserer Methodik isolierte diese Arbeitsgruppe das Tumor- und Normalgewebe der Patienten aus Paraffinblöcken per Mikrodissektion. Zusätzlich wurde Normalgewebe aus exstirpierten benignen Lymphknoten gewonnen. Mit zehn verwendeten Markern (auch der intragenisch liegende) wurde bei sieben von 40 Patienten LOH nachgewiesen (18%).

*Orikasa et al.* (33) untersuchten 45 Patientenproben, von denen 27 sofort nach der Prostatektomie bei  $-80^{\circ}\text{C}$  eingefroren wurden. Die anderen 18 Proben wurden nach der Prostataexstirpation formalinfixiert und in Paraffin eingebettet. 18 Patientenproben, von denen ausreichend Material zur Verfügung stand, wurden der

Mikrosatelliten–Analyse unterzogen. *Orikasa et al.* verwendeten neben anderen Markern nicht nur den intragenischen D10S2491, sondern einen weiteren intragenisch liegendem Marker D10S2492. Hier wiesen 2 von 18 Patienten (11%) den Verlust von Heterozygotie bei einem oder mehreren Loci auf. Am kryokonserviertem Material von 12 dieser Patientenproben wurde zusätzlich eine Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH–Analyse) durchgeführt. Die Ergebnisse dieser beiden Untersuchungsmethoden waren identisch.

*Cairns et al.* (19) führten die bisher umfangreichste Studie mit 80 Patienten zum LOH des PTEN bei primären Prostatakarzinomen durch. Das Tumorgewebe wurde durch manuelle Mikrodisektion des gefrorenen Sektats, das Normalgewebe aus Leukozyten des peripheren Blutes gewonnen. Elf Loci kamen bei der Mikrosatellitenanalyse zum Einsatz, inklusive des intragenisch liegendem D10S2491. Das Kriterium für LOH war der Verlust von Heterozygotie bei mindestens zwei Loci. LOH trat bei 26 Patienten (32%) auf. Bei 23 Patienten wurde LOH im Bereich des PTEN (d.h. intragenisch) gefunden. Proximal des Gens wurde bei zwei, distal des Gens bei einem Patienten LOH nachgewiesen.

*Rubin et al.* (34) untersuchten 67 Patienten auf Verlust von Heterozygotie im Gen PTEN. Die Tumorzellen wurden nach Begutachtung durch einen Pathologen manuell oder lasergestützt aus Paraffinblöcken mikrodisektiert. Als Normalgewebe wurden Lymphozyten verwendet, die nach histologischer Untersuchung aus benignen Lymphknoten durch manuelle Mikrodisektion gewonnen wurden. Die anschließende Mikrosatelliten–Analyse wurde mit fünf Markern (u.a. der intragenisch liegende Locus) durchgeführt werden. Die LOH-Rate lag bei 24%.

Alle Autoren vermuteten einen kausalen Zusammenhang zwischen dem Auftreten von primären Prostatakarzinomen und dem Vorkommen von LOH des Gens PTEN.

Legt man die Theorie über die Funktionsweise von Tumorsuppressorgenen zugrunde überrascht der doch geringe Verlust von Heterozygotie beim Gen PTEN. Man würde bei einem kausalen Zusammenhang zwischen dem Funktionsverlust des Tumorsuppressorgens PTEN und dem Auftreten von Prostatakarzinomen erwarten, daß Tumorzellen, die heterozygot an dem Genlocus sind, den Verlust des zweiten

Allels (d.h. nach Knudsons „Zwei-Schritt-Hypothese“ das Auftreten des 2. Ereignisses) zu einem weit höheren Prozentsatz zeigen.

Einen Grund für den geringen Verlust von LOH im Gen PTEN könnte in der Probengewinnung liegen. Tumor- und Normalgewebe wurden in unserer Arbeit durch manuelle Mikrodissektion gewonnen. Die in Paraffinblöcken befindlichen Prostatagewebe wurden von einem Pathologen zu Beginn der Mikrodissektion begutachtet. Normal- und Tumorgewebe wurden separat voneinander gewonnen, indem die entsprechenden Gewebe markiert und dann durch waagerechte Schnittführung (Schnittdicke: 30µm) vom Paraffinblock getrennt wurden.

Tumor- und Normalzellen sind nicht immer exakt zu separieren. Zudem wurden die Paraffinblöcke während der Bearbeitung nicht wiederholt auf Vorhandensein von Tumorgewebe überprüft. Daher ist es durchaus möglich, daß Tumorzellen durch Normalgewebe verunreinigt wurden. Bei zu großem Anteil an Normalzellen in Proben der Tumorzellen wird die Mikrosatelliten-Analyse keinen Aufschluß über den Verlust von Heterozygotie liefern können. Anstatt den Verlust eines Allels im Tumorgewebe anzuzeigen, würde man für Tumor- und Normalgewebe den scheinbar unveränderten Zustand des Vorhandenseins beider Allele registrieren. In Anbetracht der Tatsache, daß *Rubin et al.* die lasergestützte Mikrodissektion anwandten, könnte man hier LOH Werte vermuten, die der Realität am nächsten kommen, da bei dieser Methode die Verunreinigung des Tumorgewebes mit Normalgewebe als nahezu ausgeschlossen eingeschätzt werden kann. Die von *Rubin et al.* ermittelten 24% können somit als Richtwert für vergleichende Studien angesehen werden.

Aus diesem Grund ist es durchaus denkbar, daß nicht nur PTEN an der Entstehung des Prostatakarzinoms beteiligt ist, sondern verschiedene Faktoren für die Tumorphathogenese verantwortlich sind.

Ein wichtiger Aspekt war die Auswahl der Loci für die Mikrosatelliten-Analyse. Die von uns im Zusammenhang mit dem Prostatakarzinom diskutierten Arbeiten zum PTEN setzen eine unterschiedliche Anzahl von Mikrosatelliten-Loci ein (*Pesche et al.* benutzten 9, *Dong et al.* 5, *Cairns et al.* 11 und *Rubin et al.* sowie wir jeweils 5 Primer), wobei die Primer sowohl proximal als auch distal lagen.

Die intragenisch gelegenen Mikrosatelliten D10S2491/92 wurden erst nach Beginn unserer Arbeiten publiziert, konnten jedoch von uns noch berücksichtigt werden. Bei der Analyse der Loci zeigte sich, daß LOH nicht nur beim intragenisch liegenden Locus D10S2491 auftritt, sondern ebenso bei den dem Gen PTEN flankierenden Loci.

*Pesche et al.* und *Cairns et al.* diskutieren den Verlust von Heterozygotie im Gen PTEN, dargestellt vom Loci D10S2491. *Pesche et al.* wies bei 12 von 22 Patienten LOH nach (55%), wobei 6 Patienten (28%) den Verlust von Heterozygotie im Gen PTEN zeigten. Bei *Cairns et al.* lag das Auftreten von LOH etwas niedriger. 26 von 80 Patienten wiesen LOH auf (32%). Von diesen 26 Patienten zeigten aber 23 (28%) den Verlust des Loci D10S2491. Von unseren 40 Patienten zeigten 14 Patienten LOH (35%), davon 6 (15%) intragenisch.

Postuliert man eine kausale Rolle des Gen PTEN bei der Entstehung von Prostatakarzinomen, so würde theoretisch eine alleinige Mikrosatelliten-Analyse des Locus D10S2491 genügen, da dieser eine intragenische Lage aufweist. Wie oben bereits erwähnt, wurde unsere Arbeit zu einem Zeitpunkt begonnen, an dem der intragenische Locus noch nicht bekannt war. Nach Bekanntwerden des intragenischen Locus wurde dieser in die Arbeit integriert.

Bei einem Vergleich alternativer Methoden zur Feststellung größerer Deletionen konnte Orikasa et al. in seiner Arbeit nachweisen, daß die Ergebnisse der Mikrosatelliten-Analyse denen der FISH-Analyse (fluorescence-in-situ-Hybridisierung) entsprachen. Bei der FISH-Analyse wird die Nucleotidsequenz des Gen PTEN in Anwesenheit eines fluoreszenz-markierten Nucleotids in Form einer „nick translation“ synthetisiert und direkt an Metaphasenchromosomen angelagert (hybridisiert). Die Hybridisierung erfolgt über komplementäre Basenpaarung und ist deshalb für längere Sequenzen so spezifisch, daß Stellen, die Fluoreszenzmarkierung zeigen, dem gesuchten Gen entsprechen. Es kann davon ausgegangen werden, daß beide Methoden zum Nachweis von LOH verwendet werden können.

Hinsichtlich ein von uns vorgenommener Vergleich der histopathologischen Klassifizierung mit dem Auftreten von Verlust der Heterozygotie zeigte sich in unserer Arbeit keine signifikante Erhöhung von LOH bei Tumorgeweben mit Lymphknotenmetastasen.

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 (36 %). Das Vorkommen von LOH bei den 7 Patienten, bei denen neben der Prostata auch die Beckenlymphknoten infiltriert waren, betrug 29%, d.h. 2 von 7 Patienten (s. Tabelle 3.3).

Von den 80 Patienten, die *Cairns et al.* untersuchten, befanden sich 60 Patienten höchstens im Stadium pT3pN0pM0. Der Prostatatumor beschränkte sich hier auf die Prostata selbst, auf den Blasenhalshals oder die Samenblase. Bei den übrigen 20 Patienten wurde neben dem Prostatatumor der Befall von Beckenlymphknoten festgestellt (Stadium pT3pN1-3pM0). Das Auftreten von LOH bei den 60 Patienten, bei denen der Tumor auf Prostata, Samenblase und Blasenhalshals beschränkt war, betrug 18 % (11 von 60). Im Gegensatz dazu wiesen 12 von 20 Patienten, bei denen auch Beckenlymphknoten betroffen waren, LOH auf (60 %).

*Auch Rubin et al.* haben nachgewiesen, daß das Auftreten von LOH bei Prostatakarzinomen mit malignen Lymphknotenbefall höher ist als bei Prostatakarzinomen, bei denen die Lymphknoten nicht betroffen sind. *Rubin et al.* hatten ihr Patientenkollektiv in 44 Patienten mit negativem Lymphknotenbefall (pT2-3pN0pM0) und 23 Patienten mit positivem Lymphknotenbefall (pT3pN1-2pM0) eingeteilt. Von den 44 Patienten mit negativem Lymphknotenbefall wiesen sechs Patienten (14%) LOH auf. Bei den 23 Patienten mit positivem Lymphknotenbefall konnte bei 10 Patienten (43%) LOH detektiert werden.

Auch wenn die Arbeiten von *Cairns et al.* und *Rubin et al.* zeigen, daß Prostatakarzinome, bei denen die Beckenlymphknoten infiltriert sind häufiger LOH aufweisen, können wir diesen Sachverhalt so mit unserer Arbeit nicht bestätigen.

Vergleichen wir in unserer Arbeit das Vorkommen von LOH bezüglich des Differenzierungsgrades der Tumorgewebe, so ist beim Grading 2 das Auftreten von

LOH mit 50 % am größten, gefolgt von Grading 1 mit 33 % und Grading 3 mit 29 % (siehe Tab. 4.1). Dieser Sachverhalt kann als Anhaltspunkt dafür genommen werden, daß das Vorkommen von LOH nicht vom Differenzierungsgrad abhängt.

Die Sequenzierung der DNA aus den LOH-positiven Tumorgeweben, wurde eingesetzt um den Funktionsverlust (z.B. durch Punktmutation) des anderen (noch vorhandenen) Allels darzustellen. Gemäß Knudsons „Zwei-Schritt-Hypothese“ findet am ersten Allel eine (in der Regel Punkt-) Mutation statt um dann im Tumorstadium den Verlust des zweiten Allels (in Form einer größeren Deletion) stattfinden zu lassen.

In der vorliegenden Arbeit wurden alle 14 Tumorgewebe, bei denen LOH auftrat (unabhängig davon, ob LOH intra- oder extragenisch lag), sequenziert.

Von den nach Sequenzierung ermittelten Punktmutationen befanden sich drei im Exon 8 (Patienten 117, 068 und 104), eine im Exon 2 (Patient 099) und in dem Intron 2 (zwischen Exon 2 und Exon 3) der Patienten 167, 068 und 104 (identische Mutationen). Bei vier dieser Patienten (104/Exon 8 und 099/Exon 2) führten die Mutationen zu einem Austausch der Aminosäuresequenz, die Mutationen der Patienten 068 und 117 (beide im Exon 8) resultierten in der Umwandlung in ein Stop-Codon. In zwei Fällen (007 und 117) fand eine Substitution statt, d.h. die Aminosäuresequenz wurde nicht verändert, sondern blieb erhalten.

Von sechs Tumorgeweben, bei denen LOH innerhalb des Gen PTEN auftrat wies nur eines Punktmutationen auf. Auffallend an diesem Tumorgewebe 068 waren die Mutation im Exon 8, und die Mutation im Intron zwischen Exon 2 und Exon 3. Es handelte sich hier um das einzige Tumorgewebe, bei dem zwei Mutationen auftraten. Mutationen konnten in 29% der Fälle detektiert werden, davon 7% intragenisch liegende Mutationen.

*Pesche et al.* sequenzierte zehn von zwölf Tumorgeweben, bei denen LOH auftraten. Es wurde eine Mutation bei einem Tumorgewebe gefunden, dessen LOH im Bereich des Gen PTEN lag (10%). Die Mutation bestand aus einer Deletion eines Basenpaares des Codon 244 im Exon 7. Diese frameshift-Mutation führte zu einem Einbau eines Stop-Codons in der Aminosäuresequenz.

Die nachfolgende Sequenzierung aller 40 Tumorgewebe bei *Dong et al.* ergab eine Punktmutation eines Tumorgewebes im Exon 9, welches LOH nicht im Loci D10S2491 aufwies. Die Aminosäure Valin wurde durch Asparaginsäure ersetzt. Die Funktion der jetzt neu entstandenen Aminosäuresequenz bzw. Genprodukt wurde vom Autor nicht näher erläutert.

Bei *Orikasa et al.* zeigte die im Anschluß durchgeführte Sequenzierung aller 45 Tumorgewebe keine Mutationen.

*Cairns et al.* sequenzierte 17 der 23 Tumorgewebe, bei denen LOH intragenisch auftrat. Detektiert wurden vier Punktmutationen (Mutationsrate von 24%). Es waren drei Deletionen und eine Termination. Durch den Verlust von Basenpaaren unterschiedlicher Anzahl (Deletion von 1–9 Basenpaaren) in den verschiedenen DNA-Abschnitten (Exon 7, Exon 8 und Intron zwischen Exon 2 und Exon 3) wird der Leserahmen so verschoben (frameshift-Mutation), daß die daraus resultierende Aminosäuresequenz kein funktionelles Genprodukt kodieren (Nonsense-Mutation). Diese Veränderung der Aminosäuresequenz führte in Exon 6 zum Einbau eines Stop-Codons.

Tumorproben, die im Bereich von mindestens zwei Loci (einer von ihnen war der intragenisch liegende) LOH aufwiesen, wurden von *Rubin et al.* sequenziert. Von den vier Tumorproben konnte eine Mutation im Intron nachgewiesen werden.

Das Auftreten von Mutationen bei Tumorgeweben mit intragenisch nachweisbarem LOH ist insgesamt betrachtet gering (bei *Pesche et al.* 10%, bei *Cairns et al.* 24%, bei uns 7% und bei *Dong et al.*, *Orikasa et al.* und *Rubin et al.* wurden keine Mutationen detektiert).

Eine Ursache könnte darin liegen, daß homozygote Genloci bei der gewählten Analysemethode nicht ausgewertet werden können, Knudsons „Zwei-Schritt-Hypothese“ aber auch für Genloci im homozygoten Zustand gültig ist.

Ein anderer Aspekt ist, daß 20% der Tumorgewebe nicht sequenzierbar waren. Obwohl ausreichende Mengen DNA zur Verfügung standen, war es bei einem Teil der betreffenden Tumorgewebe nicht möglich PCR-Produkte zu amplifizieren. Eine naheliegende Erklärung hierfür könnte darin bestehen, daß diese Sequenzbereiche der DNA deletiert waren und damit keine Primeranlagerung stattfinden konnte.



Die Tatsache, daß das Vorkommen von LOH bei primären Prostatatumoren nur bei 11–55% (intragenisch auftretenden LOH 15%-28%) und das Auftreten von Mutationen bei sequenzierten Tumorgeweben mit LOH bei 0–29% (bei Tumorgeweben mit intragenisch auftretenden LOH 7%-24%) lag, läßt weitere Vermutungen zu. Vorstellbar ist, daß die Veränderung des Gen PTEN doch nur ein Teilaspekt im Rahmen eines Prozesses für die Entstehung von Tumoren ist, bei dem mehrere Gene beteiligt sind.

Die Entstehung des Prostatakarzinoms wäre vergleichbar der Entstehung des Kolon-Karzinoms, bei dessen Genese mindestens sechs aufeinanderfolgende Schritte der Tumorigenese in unterschiedlichen Genen beschrieben wurden (3). *Fearon und Vogelstein* (35) konnten u.a. veranschaulichen, daß hierbei Mutationen von zwei Onkogenen (Ras-Gene KRAS1 und KRAS2) sowie vier Tumorsuppressorgenen (APC, MCC, p53 und DCC) von Bedeutung sind.

Welche Rolle das Gen PTEN in der Entstehung von primären Prostatakarzinomen einnimmt kann mit dieser Studie nicht abschließend beurteilt werden. Weitere Studien sind notwendig, damit der Beitrag von PTEN zur Ätiologie von primären Prostatakarzinomen objektiv beurteilt werden kann.

Insbesondere biochemisch-zellbiologische Untersuchungen der letzten Zeit verdeutlichen die bedeutsame Weiterentwicklung auf diesem Gebiet. Nach Abschluß unserer experimentellen Arbeiten waren Antikörper, die gegen das Gen PTEN gerichtet sind, kommerziell erhältlich. Damit eröffnet sich die Möglichkeit mit Hilfe der Immunhistochemie eine schnelle und effiziente Diagnostik durchführen zu können.