

**Aus der Urologischen Klinik des
Klinikums Augsburg**

Direktor: Prof. Dr. med. Rolf Harzmann

**Korrelation zwischen der Expression von MAGE-A Genen in
disseminierten Tumorzellen und etablierten Prognosefaktoren
bzw. dem Verlauf nach radikaler Prostatektomie beim lokal
begrenzten Prostatakarzinom**

**Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München**

**vorgelegt von
Björn Pommer
aus
Augsburg**

2008

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Rolf Harzmann

Mitberichterstatter: Prof. Dr. W. Zimmermann

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: PD Dr. med. Dorothea Weckermann

Dekan: Prof. Dr. med. Dietrich Reinhardt

Tag der mündlichen Prüfung: 24. Januar 2008

Gliederung

| | |
|---|-------|
| 1. Einleitung | S. 4 |
| 1.1 Disseminierte Tumorzellen beim kolorektalen Karzinom | S. 7 |
| 1.2 Disseminierte Tumorzellen beim Mammakarzinom | S. 8 |
| 1.3 Disseminierte Tumorzellen beim Prostatakarzinom | S. 9 |
| 1.4 Bedeutung von MAGE-Genen | S. 10 |
| 1.4.1 Bedeutung von MAGE-Genen beim Prostatakarzinom | S. 11 |
| 2. Patienten | S. 13 |
| 3. Methoden | S. 14 |
| 3.1 MAGE-PCR | S. 15 |
| 3.1.1 Auswahl der Primer | S. 15 |
| 3.1.2 Zelllinien | S. 16 |
| 3.1.3 Durchführung der Real-Time-PCR | S. 16 |
| 3.1.4 Berechnung, Evaluation und Statistik | S. 18 |
| 3.2 Immunzytochemie | S. 20 |
| 4. Ergebnisse | S. 22 |
| 4.1 Ergebnisse der präoperativen MAGE-Diagnostik | S. 22 |
| 4.2 Ergebnisse der MAGE-Analysen im postoperativen Verlauf (Risikoanalyse) | S. 24 |
| 5. Diskussion | S. 26 |
| 6. Zusammenfassung | S. 29 |
| 7. Literaturverzeichnis | S. 30 |
| 8. Anhang | S. 36 |
| 9. Danksagung | S. 51 |
| 10. Lebenslauf | S. 52 |

1. Einleitung

Das Prostatakarzinom ist in den westlichen Industrienationen die häufigste Krebserkrankung des Mannes (19% aller Malignome). Altersabhängig steigt die Inzidenz von 20 Neuerkrankungen / 100.000 Männer im 50. Lebensjahr bis zu 1.000 / 100.000 im Alter von 80 Jahren. Allein in Deutschland werden pro Jahr ca. 40.000 Neuerkrankungen und 12.000 Todesfälle registriert¹⁴. Obduktionsbefunde zeigen, dass die Prävalenz des Prostatakarzinoms noch höher ist: Bei 20- bis 40-jährigen werden latente Prostatakarzinome³⁰ in 29%, bei 60- bis 70-jährigen in 64% und bei 90-jährigen in bis zu 90% der Fälle gefunden. Das Life-time-risk, d.h. das Risiko, an einem Prostatakarzinom zu erkranken, liegt in Deutschland bei 16%¹⁹.

Aufgrund der hohen Prävalenz und Inzidenz hat die Früherkennung des Prostatakarzinoms wesentliche Bedeutung. Der Durchbruch auf diesem Gebiet gelang Wang und Mitarbeitern 1979 durch die Isolation des Prostata-spezifischen Antigens (PSA) aus dem Seminalplasma³³. Dieses Protein kommt dort in wesentlich höherer Konzentration als im Blut vor (bis zu 3 mg/dl). Es wird androgenabhängig fast ausschließlich in Prostataepithelzellen gebildet. Diese Serin-spezifische Protease weist strukturelle Ähnlichkeiten mit den Kallikreinen auf. PSA ist ein organspezifischer Marker und kein Tumormarker, da es in erhöhter Konzentration auch bei benignen Prostataerkrankungen nachweisbar ist: benigne Prostatahyperplasie, Prostatitis mit und ohne Harnwegsinfekt, Prostatainfarkt und auch bei Prostatairritationen beispielsweise nach langen Radtouren. Dennoch erlaubt die Höhe des PSA-Werts und vor allem der PSA-Verlauf Rückschlüsse darauf, ob eine benigne oder maligne Prostataerkrankung vorliegt³⁹. PSA ist der empfindlichste Parameter in der Früherkennung des Prostatakarzinoms⁴. Leider gibt es bislang keinen klar definierten Grenzwert, der es erlaubt, eindeutig zwischen benignen und malignen Prostataveränderungen zu differenzieren. Bei den meisten Testsystemen wird als PSA-Grenzwert 4 ng/ml angegeben, wobei immer berücksichtigt werden sollte, dass niedrige Werte ein Prostatakarzinom nicht ausschließen. Ein beachtlicher

Teil der pT2-Tumoren hat PSA-Werte unter 4 ng/ml und kann daher übersehen werden²¹.

Es wird davon ausgegangen, dass 20 bis 30 % der Männer mit einem PSA-Wert zwischen 2 – 4 ng/ml bereits an einem Prostatakarzinom erkrankt sind²⁷.

Um die Aussagekraft des PSA-Werts zu erhöhen, werden weitere PSA-Parameter herangezogen (PSA-Velocity, PSA-Verdoppelungszeit, PSA-Density und verschiedene molekulare Formen des PSA).

Erhebliche Bedeutung hat das freie PSA. Je niedriger sein Anteil am Gesamt-PSA, desto höher die Wahrscheinlichkeit, dass ein Prostatakarzinom vorliegt. Umgekehrt ist der Anteil des komplexierten proteingebundenen PSA beim Prostatakarzinom höher.

PSA-Velocity

Bei der PSA-Velocity (PSA-Anstiegsgeschwindigkeit) geht man davon aus, dass maligne entartetes Gewebe mehr PSA produziert als benignes, weswegen der PSA-Wert schneller steigt. Ein PSA-Anstieg um mindestens 0,75 ng/ml/Jahr prognostiziert daher ein Prostatakarzinom mit einer Spezifität von 90% etwa neun Jahre vor der klinischen Diagnose⁶.

PSA-Verdoppelungszeit

Eine Variante der PSA-Velocity ist die PSA-Verdoppelungszeit (PSAVZ), die nach der Formel [PSAVZ (Monate) = Zeit (Monate) x log(2) / (log PSA 2 – log PSA 1)] berechnet wird. Sie ist damit unabhängig vom PSA-Ausgangswert. Für die Berechnung der PSAVZ sind mindestens zwei PSA-Bestimmungen, zum Beispiel im Abstand von drei Monaten, notwendig.

PSA-Density

Bei der PSA-Density (PSA-Dichte) handelt es sich um die Korrelation des PSA-Werts mit dem sonografisch gemessenen Prostatavolumen [ml]. Dabei geht man davon aus, dass das Prostatakarzinom etwa 10 mal mehr PSA produziert als benignes Prostatagewebe¹.

PSA spielt nicht nur die wichtigste Rolle in der Früherkennung des Prostatakarzinoms, es ist auch ein etablierter Prognosefaktor, da die Höhe des PSA-Werts mit der lokalen Tumorausdehnung und der Lymphknoten- bzw. Fernmetastasierung korreliert⁴. Auch für die Nachsorge hat PSA enorme Bedeutung. Es erlaubt Rückschlüsse auf Therapieeffekte bzw. einen Tumorprogress. Allerdings kann auch bei niedrigen PSA-Werten ein Tumorprogress vorliegen (15 – 34%)³¹.

Neben PSA ist die Tumordifferenzierung ein wichtiger Prognosefaktor. Inzwischen hat der 1960 von Gleason entwickelte Score auch international einen höheren Stellenwert als das Grading der WHO und das des pathologisch-urologischen Arbeitskreises (Helpap). Der Gleason-Score addiert jeweils zwei vorherrschende histologische Wachstumsmuster⁴.

Der dritte Prognosefaktor ist das Tumorstadium, das nach dem TNM-System klassifiziert wird. Das klinische Tumorstadium (cT) wird durch die digital-rektale Untersuchung, den transrektalen Ultraschall und ggf. durch weitere Bildgebung (Computertomographie, Magnetresonanztomographie) bestimmt. Das N-Stadium (regionäre Lymphknotenmetastasierung) wird durch die Bildgebung kaum je ausreichend erfasst. Demgegenüber liefert die Staging-Lymphadenektomie die wesentlichen Aussagen⁴. Fernmetastasen werden durch Skelettszintigraphie und / oder Computer- bzw. Magnetresonanztomographie erfasst oder ausgeschlossen.

Die Bedeutung disseminierter Tumorzellen im Knochenmark geriet in den letzten Jahren mehr und mehr in den Mittelpunkt des Interesses. Diese Zellen werden als Vorläufer späterer Knochenmetastasen angesehen. Sie werden durch

Immunzytochemie (Zytokeratinfärbung) oder - mit höherer Sensitivität - molekulare Nachweismethoden (PCR) detektiert²³.

1.1 Disseminierte Tumorzellen beim kolorektalen Karzinom

Beim kolorektalen Karzinom spielen disseminierte Tumorzellen eine besondere Rolle, da 30% bis 60 % kurativ operierter Patienten an den Folgen einer Metastasierung sterben¹⁵. Offensichtlich sind in diesen Fällen Tumorzellen im Körper zurückgeblieben, die präoperativ nicht nachweisbar waren. Sie sind vermutlich Ausgangspunkt einer späteren Metastasierung, können somit prognostisch wichtig sein¹¹ und korrelieren signifikant mit Tumorstadium, Tumorausbreitung und Tumormarkern³⁸.

1992 berichteten Lindemann et al.²⁴ über wegen eines kolorektalen Karzinoms radikal operierte Patienten, bei denen disseminierte Tumorzellen im Knochenmark immunzytochemisch nachweisbar waren. Der postoperative Verlauf war deutlich schlechter als bei Patienten mit immunzytochemisch negativem Knochenmark. 32% der Tumorpatienten hatten CK18-positive Knochenmarkzellen. Der immunzytochemische Befund erwies sich als unabhängiger Prognosefaktor für das tumorfreie Überleben ($p=0.0035$). Weitere unabhängige Prognosefaktoren waren eine Tumordinfiltration über die Muscularis hinaus ($p=0.0224$), der regionale Lymphknotenbefall ($p=0.0173$) und eine schlechte Tumordifferenzierung ($p=0.0112$). Demgegenüber waren Patientenalter ($p=0.84$) und Tumorlokalisierung (Kolon oder Rektum) prognostisch irrelevant ($p=0.40$). In der Untersuchung von Lindemann et al. hatten Patienten mit lokal begrenztem Befund (pT1-2 nach der TNM-Klassifikation von 1987) und Patienten mit Organüberschreitung (pT3-4) dann einen schlechteren Verlauf, wenn disseminierte Tumorzellen im Knochenmark nachweisbar waren ($p=0.053$ bzw. $p=0.034$). Bemerkenswerterweise hatten Patienten mit lokal begrenzter Tumorerkrankung und positivem Knochenmark einen schlechteren Verlauf als Patienten mit Organüberschreitung und negativem Knochenmark.

Bukholm et al.⁵ untersuchten die Relevanz disseminierter Tumorzellen in mesenterialen Lymphknoten bei Patienten mit kolorektalem Karzinom im Stadium UICC II (pT3-4 pN0 M0). In ihrem Kollektiv hatten lymphknotenpositive Patienten eine um ca. 30% niedrigere Überlebensrate als solche ohne Lymphknotenmetastasen. Bukholm zeigte, dass bei lymphknotennegativen Patienten (Stadium UICC II) isolierte Tumorzellen in mesenterialen Lymphknoten in 37,8 % der Fälle nachweisbar sind. Der Befund reduzierte die Überlebenswahrscheinlichkeit um etwa 30%. Das Risiko, am kolorektalen Karzinom zu sterben, war um den Faktor 3,8 höher. Die Bukholm- Studie unterstreicht die prognostische Bedeutung von isolierten Tumorzellen in Lymphknoten.

1.2 Disseminierte Tumorzellen beim Mammakarzinom

Auch für das Mammakarzinom existieren zahlreiche Belege für die Relevanz disseminierter Tumorzellen. Janni und Mitarbeiter¹⁷ zeigten, dass früh detektierte disseminierte Tumorzellen Jahre später zum Rezidiv führen. Der Knochenmarkstatus hat gerade beim Mammakarzinom prognostische Bedeutung für das fernmetastasenfreie und das Gesamtüberleben. Eine Studie hat gezeigt, dass der Knochenmarkbefund etablierten Prognosefaktoren (Tumorstadium, Lymphknotenstatus, Tumordifferenzierung) überlegen ist⁸. Andere Autoren konnten dies nicht bestätigen²⁵.

Bei der Primärdiagnose des Mammakarzinoms gilt die prognostische Bedeutung isolierter Knochenmark-Tumorzellen als gesichert¹⁷. Deren Nachweis zum Zeitpunkt der Diagnose korreliert laut Braun et al. mit einer schlechteren Prognose³. Bei Patientinnen im Stadium I, II oder III (pT1-4, pN0-2, M0) ist das Rezidivrisiko erhöht².

Die klinische Relevanz disseminierter Tumorzellen wird durch die derzeit übliche adjuvante Behandlung limitiert. 2003 wurde in einer Konsensuskonferenz beschlossen, dass auch Knochenmark-negative Patientinnen leitliniengerecht adjuvant behandelt werden sollten¹³. Ein positiver Knochenmarkbefund könnte allerdings eine Indikation für eine vor allem endokrine adjuvante Therapie bei

Patientinnen sein, die normalerweise nicht adjuvant behandelt werden würden. Da dieses Patientenkollektiv weniger als 5 % des Gesamtkollektivs ausmacht, stellt sich die Frage, ob die prognostische Information des Knochenmarkbefunds den Aufwand der immunzytochemischen Knochenmarkdiagnostik als Routineuntersuchung rechtfertigt.

Die Persistenz disseminierter Tumorzellen nach Beendigung der adjuvanten Therapie bzw. in der Nachsorge hat noch größere prognostische Relevanz. Beleg dafür ist eine Untersuchung von Wiedswang und Mitarbeitern⁴⁰, bei der ein signifikanter Unterschied von rezidivfreiem ($p=0.0003$) und Gesamtüberleben ($p=0.0008$) zwischen Knochenmark-positiven und -negativen Patientinnen nachweisbar war. Der Knochenmarkbefund erwies sich als unabhängiger Prognosefaktor ($p=0.002$).

Die größte prognostische Aussagekraft hat der Knochenmarkbefund 2 bis 3,5 Jahre nach der Erstdiagnose. In Zukunft könnten persistierende Tumorzellen ein Surrogatmarker für die Notwendigkeit einer sekundären adjuvanten Therapie sein (z. B. Verlängerung der endokrinen Behandlung oder Wechsel des Therapeutikums). Desweiteren kann durch den Nachweis und die Quantifizierung der Tumorzellen das Ansprechen der Patientinnen auf die zytostatische oder hormonelle Therapie überwacht werden⁹.

1.3 Disseminierte Tumorzellen beim Prostatakarzinom

Verschiedene Arbeitsgruppen haben sich mit dem Nachweis und der prognostischen Bedeutung von disseminierten Tumorzellen im Knochenmark von Patienten mit lokal begrenztem Prostatakarzinom befasst.

Ein großes Kollektiv mit langem Follow-up überblickt die Arbeitsgruppe von Weckermann und Klein. Sie zeigten, dass CK18-positive Tumorzellen beim Prostatakarzinom prognostisch irrelevant sind.

Demgegenüber stellen Panzytokeratin-positive Zellen – wenn sie zum Zeitpunkt der Primärtumorresektion im Knochenmark nachgewiesen werden – einen unabhängigen Prognosefaktor dar^{34,35,36}.

Postoperativ verlieren diese Zellen an Bedeutung, so dass sich dieser Marker (Panzytokeratin-positiver Knochenmarkbefund) nicht als Korrelat für den klinischen Verlauf eignet³⁷.

1.4 Bedeutung von MAGE-Genen

MAGE-Gene (melanoma antigen-encoding genes²⁹) wurden erstmals in Zusammenhang mit malignen Melanomen beschrieben²⁶ und umfassen vier Gengruppen, die auf dem X-Chromosom kodiert werden⁴¹.

Die MAGE-A Gene sind in der Region q28, die MAGE-B Gene in p21.3, die MAGE-C Gene in q26 und die MAGE-D Gene in der Region p11 des X-Chromosoms lokalisiert. MAGE-A, -B und -C Gene werden von vielen Tumoren exprimiert, nicht aber von gesunden Geweben (Ausnahme Hoden- und Plazentagewebe). MAGE-D Gene sind ubiquitär vorhanden. MAGE-D3 ist identisch mit Trophinin, einem Protein, das an der Implantation von Embryonen beteiligt ist⁷.

MAGE-Gene kodieren für Proteine, über deren physiologische Funktion bislang nichts bekannt ist²³. Die Expression von MAGE-Genen scheint ein frühes Ereignis in der Karzinogenese zu sein, da das Vorhandensein von einzelnen MAGE-Genen bereits in dysplastischen Läsionen beschrieben wurde³².

MAGE-A Gene werden in die Untergruppen MAGE-A1 bis MAGE-A12 unterteilt. Sieben MAGE-A Gene (A1, A2, A3, A4, A6, A10 und A12) werden von vielen Tumoren in großer Menge transkribiert. Die übrigen MAGE-A Gene werden im Tumorgewebe entweder nicht (wie das MAGE-A7 Pseudogen) oder nur in geringen Mengen exprimiert.

In den Genprodukten von MAGE-A1, -A2, -A3, -A4, -A6, -A10 und A-12 sind zahlreiche Antigene nachweisbar, die über HLA-I CD-8⁺ zytotoxischen T-Zellen präsentiert werden. Bei der Prozessierung von MAGE-A1 und -A3 werden darüber hinaus Antigene beschrieben, die über HLA-II Moleküle von CD-4⁺ Lymphozyten erkannt werden.

MAGE-A-Gene könnten für die antitumorale Immuntherapie relevant sein, da sie streng tumorspezifisch sind und von vielen Tumoren exprimiert werden. Nebenwirkungen auf die Keimbahnzellen, die ebenfalls MAGE-A Gene enthalten, sind dabei nicht zu befürchten, da diese Zellen keine HLA-Moleküle exprimieren⁴¹.

Interessanterweise hat man in zytologischen Proben von ehemaligen Rauchern auch Aktivitäten von MAGE-A1, A-3 und -B2 nachweisen können, ohne dass ein Tumor diagnostiziert wurde¹⁶.

1.4.1 Bedeutung von MAGE-Genen beim Prostatakarzinom

Beim Prostatakarzinom wurde die Expression von MAGE-Genen in disseminierten Tumorzellen von Kufer et al. eingehend untersucht²³.

In Voruntersuchungen wurden beidseitige Knochenmarkaspirate von 30 Patienten mit klinisch lokal begrenztem Prostatakarzinom untersucht. Durch die MAGE-PCR waren in 60% der Fälle positive Zellen nachweisbar. Verglichen mit konventionellen Verfahren (PSA-RT-PCR, Immunzytochemie) war die Nachweisrate doppelt so hoch. Dies resultiert daraus, dass PSA als sogenanntes Differenzierungsantigen in undifferenzierten Tumoren mehr und mehr verloren geht.

Bei den Untersuchungen zeigte sich, dass Prostatakarzinompatienten mit hohem Metastasierungsrisiko (initialer PSA-Wert >20 ng/ml, Tumorstadium \geq T3, Differenzierungsgrad G3, Gleason-Score 8-10) signifikant häufiger MAGE-positive Zellen im Knochenmark aufweisen als Männer mit niedrigem Metastasierungsrisiko (91% vs. 42%, $p=0.02$).

Als Kontrolle dienten periphervenöse Blutproben von 20 gesunden Probanden sowie Knochenmarkaspirate von 30 gesunden Knochenmarkspendern, bei denen keine MAGE-Gen-Expression nachweisbar war.

Ein weiterer Hinweis auf die prognostische Relevanz der MAGE-PCR ist die Tatsache, dass die MAGE-Expression im periphervenösen Blut beim metastasierten Prostatakarzinom höher ist als beim lokal begrenzten Tumorstadium (83 % vs. 25%, $p=0.0058$).

Die klinische Bedeutung der MAGE-Detektion liegt in der frühzeitigen Erkennung einer Tumorzell dissemination. Außerdem induzieren MAGE-Antigene in vivo autologe zytotoxische T-Lymphozyten. Dies könnte dabei helfen, geeignete Patienten zu ermitteln, die von einer adjuvanten Immuntherapie profitieren könnten.

In der vorliegenden Arbeit wird die Korrelation zwischen der Expression von MAGE-A Genen in disseminierten Tumorzellen und etablierten Prognosefaktoren beim klinisch lokal begrenzten Prostatakarzinom untersucht. Darüber hinaus wird der Einfluss dieses Befunds auf den Verlauf nach radikaler Prostatektomie überprüft.

2. Patienten

Zwischen Dezember 2000 und 2002 wurden 559 Prostatakarzinompatienten in die Untersuchung eingeschlossen. Alle Männer hatten ein histologisch gesichertes Prostatakarzinom ohne Fernmetastasen. Die schriftliche Einwilligung für die Studienteilnahme lag vor.

Von diesen 559 Patienten wurden 177 Männer mit aktuell diagnostiziertem Prostatakarzinom prospektiv untersucht. Bei diesen Patienten wurden unmittelbar vor der radikalen Prostatovesikulektomie periphervenöses Blut entnommen und eine beidseitige Knochenmarkaspiration im Bereich beider Spinae iliacae anteriores superiores durchgeführt. Nach der Operation erfolgten regelmäßige Kontrollen. Die Nachsorgeuntersuchungen wurden nach den aktuellen Empfehlungen⁴ durchgeführt. Ein Anstieg des PSA-Werts auf Werte ≥ 0.5 ng/ml wurde als biochemischer Progress gewertet. Der Zeitraum zwischen Operation und PSA-Anstieg wurde als progressionsfreies Überleben definiert.

Aus dem verbleibenden Kollektiv von 382 Patienten, bei denen bereits früher eine radikale Prostatektomie durchgeführt worden war, wurden 39 Männer ausgewählt. Bei diesen Patienten wurde postoperativ periphervenöses Blut entnommen und eine beidseitige Knochenmarkaspiration durchgeführt. 21 Patienten hatten einen PSA-Progress, 18 Männer waren rezidivfrei. Sie dienten als Kontrollgruppe. Diese Männer hatten einen präoperativen PSA-Wert ≤ 20 ng/ml und ein pathologisches Tumorstadium pT1-2, pN0, R0. Der Gleason-Score des Prostatektomiepräparats lag bei 6 oder darunter. Alle Patienten der Kontrollgruppe waren mindestens 30 Monate nach der radikalen Prostatektomie rezidivfrei (PSA < 0.5 ng/ml). Bei den Männern mit postoperativem PSA-Progress (n=21) bestanden keine weiteren Hinweise auf ein Lokalrezidiv oder Fernmetastasen.

3. Methoden

Bei allen Patienten wurden jeweils 8 ml Knochenmark aus der Spina iliaca anterior superior beidseits entnommen. 1 ml des nativen Knochenmarks und 2 ml periphervenöses Blut wurden mit einem denaturierenden nukleinsäureextrahierenden Puffer [4 M Guanidinisothiozyanat, 0.5% Sarcosyl (N-Laurylsarcosin), 25 mM Natriumcitrat (pH=7.0), 0.7% 2-Mercaptoethanol] gemischt und für spätere Analysen bei 4°C aufbewahrt. Die restlichen 7 ml Knochenmark wurden für die Immunzytochemie verwendet, die innerhalb von 24 Stunden erfolgte.

Nachdem die RNA²³ aus den Knochenmarkspiraten isoliert worden war, wurde die MAGE-Expression mittels quantitativer Multimarker-MAGE-Real-Time-PCR und anschließender Berechnung und Statistik relativ quantifiziert.

Gleichzeitig wurde mit den verbliebenen 7 ml Knochenmark eine immunzytochemische Untersuchung durchgeführt, um disseminierte Tumorzellen nachzuweisen. Dafür wurden mononukleäre Zellen mittels Dichtegradienten-Zentrifugation aus dem Knochenmark isoliert und mit dem monoklonalen Antikörper A45-B/B3 (IgG1; Micromet, München, Deutschland) markiert. Dieser Antikörper bindet an Epitope einer Vielzahl von Zytokeratinkomponenten (Zytokeratin CK-8/18 und CK-8/19). Der gebundene Antikörper wurde dann mit der 'Alkalische Phosphatase – Antialkalische Phosphatase – Technik' in Kombination mit Neufuchsin gefärbt. Pro Knochenmarkspirat wurden 10⁶ mononukleäre Zellen mit einem automatisierten Mikroskop (MDS System, Applied Imaging Corp., Newcastle Upon Tyne, United Kingdom) ausgewertet. Dabei lag jeweils eine Kontrollreihe vor, um unspezifische Reaktionen auszuschließen (die Tumorzelllinie SW 480 als Positivkontrolle, mononukleäre Zellen aus dem Knochenmark der Patienten, die mit dem unspezifischen MOPC-Antikörper (Mouse Plasmocytoma Antikörper, Firma Sigma, Deisenhofen, Deutschland) inkubiert wurden, als Negativkontrolle).

3.1 MAGE-PCR

Für die MAGE-Analysen²⁶ wurden Blut- und Knochenmarkproben von Prostatakarzinom-Patienten mit minimaler systemischer Tumorlast verwendet. Die Untersuchungen wurden mit einer quantitativen Multimarker-Real-Time-PCR, die die Amplifikation der cDNA der MAGE-A-Gene 1, 2, 3/6, 4, 10 und 12 bestimmt, durchgeführt. Da die Qualität der reversen Transkription von MAGE-mRNA in cDNA für die Folgeuntersuchungen entscheidend ist, musste die MAGE-cDNA-Synthese optimiert werden, um den hohen Anforderungen einer hochsensitiven und hochspezifischen Multimarker-Real-Time-PCR gerecht zu werden.

3.1.1 Auswahl der Primer

Eine unspezifische cDNA Synthese durch oligo-dT oder zufällige Hexamerprimer ist wegen hoher Hintergrundsignale für die quantitative Multimarker-Real-Time-PCR unzureichend. Ebenso ungeeignet sind spezifische Primer mit einem Gemisch aus verschiedenen Oligonukleotiden, die für ein einzelnes Mitglied der MAGE-A Familie spezifisch sind. Deswegen nutzte man bei dem Verfahren die Tatsache, dass die Sequenz der verschiedenen MAGE-A-Gene über weite Strecken identisch ist. Es wurden identische Sequenzen gefunden, die als Vorlage für einen einzigen pan-MAGE-cDNA-Primer [5'-ACC TGC CGG TAC TCC AGG-3'] verwendet werden können. Er erlaubt es, eine spezifische und selektive reverse Transkription der gesamten Ziel-mRNA in einer einzigen RT-Reaktion durchzuführen. Aus neun möglichen Primern wurde in der folgenden Multimarker-Real-Time-PCR der Primer mit der höchsten Sensitivität und der geringsten Rate unspezifischer Signale verwendet.

Dieser Primer zeigte auch die geringste Interferenz mit der parallel laufenden cDNA-Synthese des Referenzgens, das für die Quantifizierung der MAGE-Transkription notwendig ist.

3.1.2 Zelllinien

Für die Evaluation des Real-Time-PCR-Protokolls wurde die MAGE-A-Expression in Tumorzelllinien analysiert. Spezifische Genprodukte der getesteten MAGE-A-Gene waren in zwei verschiedenen Tumorzelllinien nachweisbar, allerdings mit signifikant unterschiedlicher Intensität. In einer Zelllinie (der Melanomzelllinie Mz2-Mel) wurden nur geringe Mengen von MAGE-A4-Transkripten gefunden. Die transkriptionelle Aktivität der restlichen fünf MAGE-A-Gene war relativ hoch. In der anderen Zelllinie (der Sarkomzelllinie LB23-SAR) war die Amplifikation von MAGE-A1 und MAGE-A10 durch eine Dimerbildung limitiert. Die MAGE-A4-Genaktivität war vergleichbar mit der Aktivität der restlichen MAGE-A-Gene in der Mz2-Mel-Zelllinie. Als zuverlässiger Kalibrator für die quantitative PCR wurden daher Mz2-Mel-Zellen für die Amplifikation von MAGE-A1, -A2, -A3/6, -A10 und -A12 und Zellen der Linie LB23-SAR für die Amplifikation von MAGE-A4 verwendet.

3.1.3 Durchführung der Real-Time-PCR

Die Real-Time-PCR ist eine Methode, Nukleinsäuren zu vervielfältigen. Sie ist gleichzeitig das sensitivste Verfahren für den Nachweis von Genen, die von Tumorzellen exprimiert werden²⁰. Der Unterschied zur konventionellen PCR (Polymerase-Kettenreaktion) liegt in der Möglichkeit der Quantifizierung, die mit Hilfe von Fluoreszenzmessungen bereits während eines PCR-Zyklus und nicht erst am Ende der PCR durchgeführt werden kann. Die Fluoreszenz nimmt dabei proportional zur Menge des PCR-Produkts zu.

Die Fluoreszenz wird durch einen DNA-Farbstoff erreicht (in diesem Fall SYBR Green I[®], Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Deutschland). Dieser lagert sich in die DNA ein (interkaliert), wobei die Fluoreszenz zunimmt und gemessen werden kann.

Für die Real-Time-PCR wurde zunächst die RNA präpariert und mittels reverser Transkriptase in cDNA (komplementäre DNA) umgeschrieben. Dabei wurde im ersten Schritt die Gesamt-RNA aus den Zellen isoliert (mittels RNAeasy kit[®], Qiagen, Hilden, Deutschland). Die Gesamt-RNA wurde dann mit dem Omniscript RT Kit[®] (Qiagen, Hilden, Deutschland) und den spezifischen Primern (pan-MAGE-RT [5'-ACC TGC CGG TAC TCC AGG-3'] und PBGD-RT [5'-TGG GGC CCT CGT GGA ATG-3']) in cDNA umgeschrieben. Diese Reaktion wurde in einem GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems, Foster City, USA) durchgeführt (60 min. bei 37°C gefolgt von der Denaturierung bei 93°C für 5 min.).

Für die folgende Präamplifikation wurden zwei µl der cDNA in 20 µl Reaktionsgemisch mit 2 µl PCR-Puffer (200 mM Tris, pH=8.0, 500 mM KCl), 1.5 µM MgCl₂, 0.2 µM dNTP, einer Einheit hitzestabile Taq-DNA-Polymerase (jeweils von Invitrogen, Groningen, Niederlande) und je 0.2 µM der Outer-MAGE-Primer (Tabelle 1) verwendet. Die Reaktion wurde in oben genanntem PCR-System folgendermaßen durchgeführt: Enzymaktivierung bei 95°C für 3 Minuten, Denaturierung bei 95°C für 30 Sekunden, Anlagern der Primer bei 60°C für 45 Sekunden und Verlängerung des DNA-Strangs durch die Polymerase bei 72°C für eine Minute. Nach insgesamt 20 Zyklen folgt eine finale Extensionsphase bei 72°C für 7 Minuten.

Für die Real-Time-PCR wurden dann 15 µl Reaktionsgemisch mit 2 µl des präamplifizierten PCR Produktes, 1.5 µl FastStart DNA Master SYBR Green I[®] Reagenz (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Deutschland) und je 10 pmol der Inner-MAGE-Primer (Tabelle 1) in einer Konzentration von 2.5 µM MgCl₂ (MAGE-A1, MAGE-A3/6 und MAGE-A4) und 3.0 µM MgCl₂ (MAGE-A2, MAGE-A10 und MAGE-A12) verwendet. Nach initialer Enzymaktivierung bei 95°C für 5 Minuten folgte die Denaturierung für 10 Sekunden bei 95°C. Anschließend wurden die Primer bei 60°C angelagert (5 Sekunden) und die DNA bei 72°C verlängert (10 Sekunden). Dieser Zyklus wurde insgesamt 40 mal wiederholt. Nach Abschluss des Reaktionszyklus wurden die PCR-Produkte einer Schmelzpunktanalyse unterzogen. Die Spezifität der Amplifikation wurde durch Elektrophorese in 30%igem Acrylamidgel und in unklaren Fällen mit direkter Sequenzierung überprüft.

Die Amplifikation der mRNA des Haushaltsgens PBGD (Porphobilinogendesaminase) erfolgte in einer separaten Real-Time-PCR. Hierzu wurden 20 µl mit 1 µl cDNA, 5 mM MgCl₂, 1 µM der Primer (Tabelle 1) und 2 µl FastStart DNA Master SYBR Green I® (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Deutschland) verwendet. Das Protokoll wurde dabei modifiziert: initiale Enzymaktivierung bei 95°C für 5 Minuten, Denaturierung bei 95°C für 15 Sekunden, Anlagerung bei 60°C für 10 Sekunden und Extension bei 72°C für 20 Sekunden. Anschließend wurden die Produkte wiederum einer Schmelzpunktanalyse unterzogen.

Bei der Schmelzpunktanalyse wird die DNA (mit dem Fluoreszenzfarbstoff) wieder aufgeschmolzen, indem langsam und kontinuierlich die Temperatur erhöht wird (65°C bis 95°C, Temperaturänderung 0.1°C/sec). Bei einer für das jeweilige Gen spezifischen Schmelztemperatur zerfällt der Doppelstrang wieder in zwei Einzelstränge. Dabei wird der Fluoreszenzfarbstoff freigesetzt und es resultiert eine Fluoreszenzabnahme. Damit lässt sich die entsprechende cDNA nachweisen. Der spezifische Schmelzpunkt wurde mittels Positivprobe (reine MAGE-cDNA) bestimmt.

3.1.4 Berechnung, Evaluation und Statistik

Die Quantifizierung der Genexpression basiert auf dem Grenzwertzyklus (C_T -value), der als der erste Zyklus mit nachweisbarer Fluoreszenz definiert ist.

Die relative Quantifizierung²⁶ der MAGE-Expression wird dadurch erreicht, dass man die C_T -Werte der einzelnen MAGE-Marker mit dem Referenzgen PBGD vergleicht, um Unterschiede in Größe oder Qualität der einzelnen Proben zu erkennen. In jedem Durchlauf wurde eine Positivprobe (externer Kalibrator) verwendet (2 ml Blut eines gesunden Probanden, das mit 5 Zellen einer MAGE-exprimierenden Zelllinie (Mz2-Mel oder LB-SAR) versehen wird).

Die Ergebnisse werden als Verhältnis von MAGE-cDNA / PBGD-cDNA dargestellt (Abbildung 1). Werte kleiner als 0.01 werden als negativ klassifiziert.

$$\frac{MAGE}{PBGD} = \frac{E_{(PBGD)}^{C_T^{PBGD}}}{E_{(MAGE)}^{C_T^{MAGE}}} \cdot K$$

E = PCR-Efficiency, K = Konstante

Die PCR-Efficiency kann durch Verdünnungsreihen (Abbildung 2) berechnet werden und nähert sich einem Wert von 2.0, wenn sich die cDNA-Kopien in jedem Zyklus verdoppeln (Efficiency von 100%). Die Konstante K bezieht sich auf andere Parameter, die auch die Amplifikation des Ziel- und Referenzgens beeinflussen (z.B. die Reinheit der Probe, der verwendete Farbstoff usw.)¹⁰. Desweiteren zeigt die Konstante K auch die verschiedene Anzahl an Amplifikationszyklen für MAGE und PBGD, da MAGE in 20 Zyklen präamplifiziert werden muss, PBGD hingegen wird direkt von der cDNA amplifiziert.

Die Evaluation der Real-Time-PCR erfolgte durch Tumorzellverdünnung. Für diesen Zweck wurden 2ml peripherenöses Vollblut von gesunden Probanden mit einer unterschiedlichen Zahl (1, 5, 10 und 100 Zellen) von Mz2-Mel Zellen (MAGE-A1, -2, -3/6, -10 und -12) oder LB23-SAR Zellen (MAGE-A4) versehen, mit PCR überprüft und analysiert (Abbildung 3). Dabei zeigte sich, dass die Real-Time-PCR zuverlässig eine Tumorzelle in 2 ml peripherenösem Vollblut nachweisen kann.

Desweiteren wurde Knochenmark von 13 gesunden Knochenmarkspendern untersucht. Dabei konnte in keiner der Proben eine MAGE-Expression gefunden werden.

Die statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe der SAS-Software (SAS Institute, Cary, USA). Zum Vergleich der einzelnen Daten wurde dabei der Chi-Quadrat-Test nach Pearson sowie der exakte Test nach Fisher herangezogen. Als Signifikanzniveau wurde $p < 0.05$ gewählt.

3.2 Immunzytochemie

Durch Dichtegradienten-Zentrifugation (400 x g für 30 Minuten, Ficoll-Hypaque, spezifische Dichte 1.077 g/ml, Amersham Biosciences, Uppsala, Schweden) wurden mononukleäre Zellen aus den Knochenmarkaspiraten isoliert, wobei man sich dabei die unterschiedliche Dichte der einzelnen Knochenmarkzellen zu Nutze machte.

Für die Tumorzelldetektion wurde der monoklonale Antikörper A45-B/B3 (IgG1, Micromet, München, Deutschland) verwendet, der an ein Epitop vieler Zytokeratine bindet, unter anderem an die Heterodimere aus CK-8/18 und CK-8/19. Normale Knochenmarkzellen reagieren in 99% der Fälle nicht mit diesem Antikörper¹⁷. Desweiteren wurde durch molekulare Charakterisierungsmethoden nachgewiesen, dass es sich bei den meisten A45-B/B3-positiven Zellen im Knochenmark um Tumorzellen handelt¹⁷.

Nach Inkubation wurde der gebundene Antikörper dann mit der 'alkalische Phosphatase – antialkalische Phosphatase – Technik' (APAAP-Technik) in Kombination mit Neufuchsin gefärbt, wobei der gebundene Antikörper durch eine Rotfärbung nachgewiesen werden konnte (Abbildung 4).

Von jedem Knochenmarkaspirat wurden insgesamt 10^6 mononukleäre Zellen unter einem automatisierten Mikroskop (MDS System, Applied Imaging Corp., Newcastle Upon Tyne, United Kingdom) untersucht.

Um unspezifische Reaktionen auszuschließen, wurden bei jeder Färbung Isotyp-Kontrollen durchgeführt. Als Positivkontrolle diente die Tumorzelllinie SW480 (humane Kolonkarzinomzelllinie). Als Negativkontrolle wurden die mononukleären Zellen aus dem Knochenmark der Prostatakarzinompatienten mit dem MOPC-

Antikörper (Mouse Plasmocytoma Antikörper, Firma Sigma, Deisenhofen, Deutschland) inkubiert, wobei anschließend keine Rotfärbung auftreten darf, da dieser Antikörper unspezifisch ist und keine Reaktion mit Zytokeratinkomponenten aufweist. Es wurden dabei jeweils 10^6 Zellen ausgezählt.

4. Ergebnisse

Nachdem sicher war, dass die Multimarker MAGE-Real-Time-PCR zuverlässig arbeitet und Tumorzellen in Blutproben und Knochenmarkaspiraten mit hoher Sensitivität nachweist (Abschnitt 3.1.4 und Abbildung 3), wurden periphervenöse Blutproben und beidseitige Knochenmarkaspirate von Patienten mit lokal begrenztem Prostatakarzinom untersucht.

4.1 Ergebnisse der präoperativen MAGE-Diagnostik

177 Patienten mit klinisch organbegrenztem Prostatakarzinom wurden radikal prostatektomiert. Das mittlere Follow-up lag zum Zeitpunkt der Untersuchung bei 16.3 Monaten. 25 der 177 Patienten entwickelten einen PSA-Anstieg (14.1%). Die mittlere Zeit bis zum PSA-Progress lag bei 7.6 Monaten. Bei zwei von 177 Männern wurde ein Lokalrezidiv nach durchschnittlich neun Monaten, bei einem Patienten wurden Fernmetastasen diagnostiziert.

In 16 von 177 Fällen war es nicht möglich, intakte RNA zu isolieren. Bei den restlichen 161 Männern wurde die quantitative MAGE-Analyse im Blut und Knochenmark durchgeführt. Die Ergebnisse von 20 repräsentativen Patienten zeigt Tabelle 2. 42 Patienten exprimierten wenigstens ein MAGE-Gen in mindestens einer Probe (26.1%). 26 Patienten hatten wenigstens ein positives Knochenmarkaspirat (16.1%). Acht Männer hatten wenigstens ein positives Blut- und Knochenmarkaspirat (5.0%).

Die Analyse des periphervenösen Blutes zeigte eine MAGE-Expression in 24 Fällen (14.9%). Am häufigsten wurde MAGE-A1 mRNA gefunden (7.2%) gefolgt von MAGE-A2 (3.23%), MAGE-A4 (2.99%), MAGE-A3/6 (1.24%), MAGE-A10 (0.25%) und MAGE-A12 mRNA (0%). Die quantitativen MAGE / PBGD Quotienten lagen zwischen 0.04 und >10,000 mit einem Medianwert von 2.89.

Die Berechnung wird in Abbildung 1 dargestellt. Die Expressionen der einzelnen MAGE-Gene können somit als Vielfaches der Expression von PBGD direkt miteinander verglichen werden.

Es bestand keine signifikante Korrelation zwischen der MAGE-Expression im Knochenmark und / oder im peripheren venösen Blut (d.h. der Detektion von wenigstens einem MAGE-Marker in wenigstens einer Probe) und dem biochemischen Verlauf nach radikaler Prostatektomie ($p=0.80$). Ebenso wenig zeigten die quantitativen MAGE / PBGD-Quotienten eine statistisch signifikante Korrelation mit dem klinischen Verlauf der Erkrankung. Die Korrelation zwischen MAGE-A2-Expression und etablierten Risikofaktoren (PSA, Gleason-Score, Tumorstadium) war ebenfalls nicht signifikant.

Demgegenüber fand sich eine signifikante Korrelation zwischen den etablierten Prognosefaktoren (PSA, Gleason-Score, Tumorstadium) und dem biochemischen Verlauf nach radikaler Prostatektomie.

Parallel zur Multimarker-MAGE-Real-Time-PCR wurde von allen Knochenmarkaspiraten eine Zytokeratin-basierte Immunzytochemie (CK-ICC) durchgeführt, um disseminierte Tumorzellen nachzuweisen. Bei sechs Patienten (3.4%) war die Analyse wegen 'clotting' der Probe oder unspezifischer Reaktion erfolglos. In 27 von 171 Fällen (15.8%) waren Zytokeratin-positive Zellen in mindestens einem Knochenmarkaspirat nachweisbar. Auch hier bestand keine signifikante Korrelation zwischen den Ergebnissen der Immunzytochemie und dem klinischen Verlauf.

4.2 Ergebnisse der MAGE-Analysen im postoperativen Verlauf (Risikoanalyse)

Aus dem Restkollektiv von 382 Patienten wurden 21 Männer mit biochemischem Progress (d.h. hohem Metastasierungsrisiko) und eine biochemisch rezidivfreie Kontrollgruppe (n=18) mit geringem Metastasierungsrisiko ausgewählt. Die Patienten waren nach radikaler Prostatektomie regelmäßig nachuntersucht worden. Die klinischen Daten beider Gruppen zeigt Tabelle 3.

In der Rezidivgruppe trat der biochemische Progress nach einem mittleren Follow-up von 5.8 Monaten auf. Verglichen mit den Patienten der Kontrollgruppe hatten diese Patienten höhere präoperative PSA-Werte, fortgeschrittenere Tumorstadien und höhere Gleason-Score-Werte. Die Patienten der Kontrollgruppe hatten zum Zeitpunkt der MAGE-Analyse PSA-Werte unter 0.5 ng/ml und waren für mindestens 43.3 Monate nach radikaler Prostatektomie rezidivfrei.

In der Rezidivgruppe wurden 12 Patienten (57.1 %) identifiziert, die wenigstens ein MAGE-Gen in wenigstens einer Probe exprimierten (Knochenmarkaspirate oder periphervenöses Blut). Drei Proben wurden wegen fehlender PBGD Amplifizierung von der Analyse ausgeschlossen. Insgesamt wurden MAGE-A1 und -A2 am häufigsten exprimiert (6 von 21 Patienten, 28.6 %), gefolgt von MAGE-A3/6 (14.2 %), MAGE-A4 (9.5 %) und MAGE-A10 und -A12 (jeweils 4.7 %). Die Proben von fünf Patienten zeigten Expressionen mehrerer MAGE-A Gene. In drei Fällen konnten die gleichen Markergene in beiden Knochenmarkaspiraten nachgewiesen werden.

Bei den rezidivfreien Patienten musste eine Blutprobe wegen fehlender PBGD Amplifizierung von der Analyse ausgeschlossen werden. In vier von 18 Fällen war eine MAGE-Expression nachweisbar (22.2%). In allen positiven Knochenmarkproben wurde MAGE-A1 detektiert. MAGE-A2 und MAGE-A4 waren in zwei Fällen (11.1%) bzw. einem Fall (5.5%) positiv. Bei einem Patienten wurden zwei MAGE-A Gene im gleichen Knochenmarkaspirat exprimiert und in einem Fall wurden vier MAGE-Marker in beiden Knochenmarkaspiraten nachgewiesen.

Interessanterweise exprimierten rezidivfreie Patienten im peripheren venösen Blut keine MAGE-Gene.

Die statistische Analyse zeigt, dass die Patienten mit biochemischem Progress signifikant häufiger MAGE-Gene exprimieren als die Männer der Kontrollgruppe ($p=0.027$) (Tabelle 4).

Darüberhinaus war der Grad der MAGE-Expression in der Rezidivgruppe deutlich höher (mittlerer MAGE / PBGD-Quotient von 16.66 (0.06 bis >1,000,000)) als in der Kontrollgruppe (mittlerer MAGE / PBGD-Quotient von 2.03 (0.38 bis 957.36)).

Die immunzytochemische Analyse der Knochenmarkaspirate zeigte Zytokeratin-positive Zellen bei drei von 21 Patienten mit Rezidiv und bei zwei von 18 Patienten ohne biochemisches Rezidiv (Tabellen 5 und 6). In keinem Fall waren Zytokeratin-positive Zellen und MAGE-Gene im Knochenmark nachweisbar. Bei einem Patienten war die Immunzytochemie des Knochenmarks positiv bei MAGE-Expression im Blut. Ein statistisch signifikanter Unterschied im Nachweis Zytokeratin-positiver Zellen zwischen Rezidiv- und Kontrollpatienten war nicht nachweisbar.

5. Diskussion

Beim lokoregionären Prostatakarzinom gelten der präoperative PSA-Wert, die Tumordifferenzierung (Gleason-Score) und das Tumorstadium als etablierte Prognosefaktoren.

In dieser Arbeit wurde untersucht, ob es darüber hinaus Parameter gibt, die die Prognose eines klinisch lokal begrenzten Prostatakarzinoms nach radikaler Prostatektomie vorhersagen können.

Bei 177 Männern mit klinisch lokoregionärem Prostatakarzinom wurden Knochenmarkaspirate und periphervenöse Blutproben vor radikaler Prostatektomie auf die Expression von MAGE-Genen untersucht. Die Ergebnisse von 161 Patienten waren verwertbar. Dabei zeigte sich keine statistisch signifikante Korrelation zwischen der MAGE-Expression und dem biochemischen Verlauf nach radikaler Prostatektomie ($p=0.80$). Demgegenüber korrelierten die etablierten Risikofaktoren (präoperativer PSA-Wert, Gleason-Score, Tumorstadium) mit der Prognose der Erkrankung, was beweist, dass es sich hier um ein repräsentatives Patientenkollektiv handelt.

Ca. 30 % der Prostatakarzinompatienten entwickeln nach radikaler Operation einen biochemischen Progress, für den es zumindest in der Anfangsphase kein morphologisches Korrelat gibt. Es wurde daher untersucht, ob zum Zeitpunkt des PSA-Anstiegs eine MAGE-Expression im Knochenmark und / oder periphervenösen Blut nachweisbar ist. Aus einem Gesamtkollektiv von Patienten, bei denen eine radikale Prostatektomie durchgeführt worden war, wurde eine Rezidivgruppe mit hohem Metastasierungsrisiko und eine Kontrollgruppe mit geringem Metastasierungsrisiko ausgewählt. Patienten mit biochemischem Progress (Rezidivgruppe) zeigten zum Zeitpunkt des PSA-Anstiegs statistisch signifikant häufiger eine MAGE-Expression im Knochenmark und / oder im periphervenösen Blut als Patienten der Kontrollgruppe ($p=0.027$). Der Grad der MAGE-Expression war in der Rezidivgruppe deutlich höher als in der Kontrollgruppe.

Zytokeratin-positive Zellen werden im Knochenmark von Patienten mit epithelialen Tumoren² und nur selten bei gesunden Probanden detektiert. Ihre Inzidenz liegt bei 20-40%, wenn keine klinisch fassbare Metastasierung vorliegt. Für viele epitheliale Tumoren ist die prognostische Bedeutung eines positiven Knochenmarkbefunds zum Zeitpunkt der Primäroperation belegt²². Die besten Daten liegen für das Mammakarzinom vor³. Postoperativ nachweisbare Zytokeratin-positive Zellen korrelieren hier mit Progress und geringerem Gesamtüberleben¹⁸. Daraus wird abgeleitet, dass Zytokeratin-positive Zellen im Knochenmark Vorläuferzellen sind, die sich zu manifesten Knochenmetastasen entwickeln können^{3,12}. Im Einzelfall wird beim Mammakarzinom der Knochenmarkbefund für die Therapieplanung herangezogen.

Beim Prostatakarzinom ist die Datenlage dagegen spärlich. Die Arbeitsgruppe um Weckermann hat 1992 damit begonnen, Knochenmarkaspirate vor und nach radikaler Prostatektomie zu untersuchen. Die ersten Knochenmarkpunktate wurden mit dem monoklonalen Antikörper CK2 gefärbt, der nur eines von 20 epithelialen Zytokeratinen erfasst. Der Nachweis CK2-positiver Zellen korrelierte weder mit etablierten Risikofaktoren noch mit dem Verlauf nach radikaler Prostatektomie^{34,35}.

Da CK2 nur eine Zytokeratinkomponente nachweist, wurden von der gleichen Arbeitsgruppe Paralleluntersuchungen mit CK2 und einem Panzytokeratin-Antikörper durchgeführt, der ein gemeinsames Epitop mehrerer Zytokeratinkomponenten erkennt. Während der Nachweis CK2-positiver Zellen wiederum keinen Einfluss auf den postoperativen Verlauf hatte, entwickelten Männer mit Panzytokeratin-positivem präoperativen Knochenmark signifikant häufiger einen biochemischen Progress als Patienten mit negativem Knochenmarkbefund. Verglichen mit anderen Prognoseparametern erwies sich der präoperative Panzytokeratin-Befund als unabhängiger Prognosefaktor³⁶.

Während der präoperative Nachweis Panzytokeratin-positiver Zellen mit einem schlechteren postoperativen Verlauf korreliert, hat das Persistieren oder Neuauftreten dieser Zellen nach der Operation keinen Einfluss auf den weiteren Verlauf der Erkrankung³⁷. Man muss daher davon ausgehen, dass Zytokeratin-

positive Zellen bei verschiedenen Primärtumoren unterschiedliche Bedeutung haben. Beim Prostatakarzinom ist der Nachweis Panzytokeratin-positiver Tumorzellen im präoperativen Knochenmarkpunktat ein Marker für die Aggressivität des Tumors. Ca. 93% der Patienten mit präoperativem Nachweis Panzytokeratin-positiver Tumorzellen entwickeln innerhalb von 24 Monaten einen PSA-Anstieg. Im Gegensatz dazu hatte es keine prognostische Relevanz, wenn Panzytokeratin-positive Zellen 6 Monate bis 9 Jahre nach der radikalen Prostatektomie gefunden wurden (Weckermann, D: persönliche Mitteilung).

Im Gegensatz zu den Ergebnissen der Arbeitsgruppe um Weckermann beschrieben Oberneder et al.²⁸ 1994, dass CK18-positive Knochenmark-Zellen beim Prostatakarzinom prognostische Bedeutung haben. Bei 84 Männern wurden Knochenmarkaspirate entnommen. Ca. ein Drittel der Patienten mit lokal begrenztem Befund (pN0M0) hatten CK18-positive Knochenmarkpunktate. Dabei bestand eine statistisch signifikante Korrelation zu etablierten Risikofaktoren. Bei 12 Männern mit benigner Prostatahyperplasie war der Knochenmarkbefund negativ, was die Spezifität der Methode bestätigte. Das von Oberneder beschriebene Patientenkollektiv ist klein und wurde offensichtlich später nicht weiter untersucht.

Zusammenfassend gibt es nach den hier vorgelegten Untersuchungen bislang keinen Marker, der, in Zusammenhang mit disseminierten Tumorzellen, über die etablierten Prognosefaktoren hinaus den Verlauf nach radikaler Prostatektomie präzise vorhersagt. Panzytokeratin-positive Zellen haben nur dann eine prognostische Bedeutung, wenn sie zum Zeitpunkt der Operation des Primärtumors im Knochenmark nachgewiesen werden. Anders verhält es sich mit den MAGE-Genen. Sie werden bei Patienten mit biochemischem Rezidiv im Knochenmark und / oder im peripheren venösen Blut signifikant häufiger detektiert als bei rezidivfreien Patienten. Die präoperative MAGE-Expression korrelierte dagegen nicht mit dem Verlauf der Erkrankung.

In den hier beschriebenen Untersuchungen konnte eine prognostische Relevanz Panzytokeratin-positiver Zellen im Knochenmark nicht nachgewiesen werden.

6. Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurde untersucht, ob es neben den etablierten Prognosefaktoren weitere Marker gibt, die den Verlauf nach radikaler Prostatektomie vorhersagen. Zu diesem Zweck wurden Knochenmarkaspirate und periphervenöse Blutproben auf die Expression von MAGE-A Genen und auf Panzytokeratin-positive Zellen untersucht.

Bei 177 Männern mit klinisch lokoregionärem Prostatakarzinom wurden präoperative Knochenmarkaspirate und periphervenöse Blutproben entnommen und hinsichtlich der MAGE-Gen-Expression analysiert. Die Ergebnisse wurden mit etablierten Risikofaktoren und dem biochemischen Verlauf nach radikaler Prostatektomie korreliert. Die Ergebnisse von 161 Patienten waren auswertbar. Männer mit präoperativ nachweisbarer MAGE-Gen-Expression hatten keinen schlechteren Verlauf der Erkrankung.

Bei 39 Männern mit und ohne biochemischen Progress nach radikaler Prostatektomie wurde ebenfalls die MAGE-Gen-Expression im Knochenmark und im periphervenösen Blut gemessen. Dabei zeigten Patienten mit biochemischem Progress in den postoperativen Untersuchungen signifikant häufiger MAGE-Gen-Expressionen als die rezidivfreien Patienten der Kontrollgruppe. Auch der Grad der MAGE-Expression war in der Rezidivgruppe deutlich höher als in der Kontrollgruppe.

Der Nachweis Panzytokeratin-positiver Zellen korrelierte in der vorliegenden Untersuchung weder in der präoperativen Diagnostik noch postoperativ mit dem PSA-Verlauf.

Es scheint wünschenswert, dass weitere Untersuchungen mit dem Ziel durchgeführt werden, andere Marker zu finden, die in der Lage sind, die Zellen im Knochenmark zu detektieren, die sich zu manifesten Knochenmetastasen entwickeln können.

7. Literaturverzeichnis

1. Benson MC, Whang IS, Olsson CA, McMahon DJ, Cooner WH: The use of prostate specific antigen density to enhance the predictive value of intermediate levels of serum prostate specific antigen. *J Urol* 1992;147:817-821
2. Braun S, Pantel K, Müller P, Janni W, Hepp F, Kentenich C, Gastroph S, Wischnik A, Dimpfl T, Kindermann G, Riethmüller G, Schlimok G: Cytokeratin-positive cells in the bone marrow and survival of patients with the stage I, II or III Breast Cancer. *N Engl J Med* 2000;342:525-533
3. Braun S, Vogl F, Naume B, Janni W, Osborne M, Coombes RC, Schlimok G, Diel I, Gerber B, Gebauer G, Pierga JY, Marth C, Oruzio D, Wiedswang G, Solomayer EF, Kundt G, Strobl B, Fehm T, Wong G, Bliss J, Vincent-Salomon A, Pantel K: A pooled Analysis of Bone Marrow Micrometastasis in Breast Cancer. *N Engl J Med* 2005;353:793-802
4. Breul J, Zimmermann F, Dettmar P, Paul R: Prostatakarzinom. *Manual Urogenitale Tumoren* 2003, Tumorzentrum München
5. Bukholm IRK, Bondi J, Wiik P, Nesland JM, Andersen SN, Bakka A, Bukholm G: Presence of isolated tumour cells in mesenteric lymph nodes predicts poor prognosis in patients with stage II colon cancer. *ESJO* 2003;29:862-866
6. Carter BC, Pearson JD, Metter EJ, Brant LJ, Chan DW, Andres R, Fozard JL, Walsh PC: Longitudinal evaluation of prostate-specific antigen levels in men with and without prostate disease. *J Am Med Ass* 1992;267:2215-2220
7. Chomez P, De Backer O, Bertrand M, De Plaen E, Boon T, Lucas S: An Overview of the MAGE Gene family with the identification of all human members of the family. *Cancer Res* 2001;61:5544-5551

8. Diel IJ, Kaufmann M, Costa SD, Holle R, von Minckwitz G, Solomayer EF, Kaul S, Bastert G: Micrometastatic breast cancer marrow at primary surgery: prognostic value in comparison with nodal status. *J Natl Cancer Inst* 1996;88:1652-1658
9. Engel H, Kleespies C, Friedrich J: Detection of circulating tumour cells in patients with breast or ovarian cancer by molecular cytogenetics. *Br J Cancer* 1999;81:1165-1173
10. Fink L, Seeger W, Ermert L, Hanze J, Stahl U, Grimminger F, Kummer W, Bohle RM: Real-Time quantitative RT-PCR after laser-assisted cell picking. *Nat Med* 1998; 4:1329-1333
11. Flatmark K, Bjornland K, Johannessen HO, Hegstad E, Rosales R, Harklau L, Solhaug JH, Faye RS, Soreide O, Fodstad O: Immunomagnetic detection of micrometastatic cells in bone marrow of colorectal cancer patients. *Clin Cancer Res* 2002;8:444-449
12. Gebauer G, Fehm T, Merkle E, Beck EP, Lang N, Jager W: Epithelial cells in bone marrow of breast cancer patients at time of primary surgery: clinical outcome during long-term follow-up. *J Clin Oncol* 2001;19(16):3669-3674
13. Goldhirsch A, Wood WC, Gelber RD, Coates AS, Thurlimann B, Senn HJ: Meeting highlights: updated international expert consensus on the primary therapy of early breast cancer. *J Clin Oncol* 2003;21:3357-3365
14. Hanhart N: Prostatacarcinom. *Gynäkologie und Urologie für Studium und Praxis* 2005:342-345
15. Hardingham JE, Hewett PJ, Sage RE, Finch JL, Nuttall JD, Kotasek D, Dubrovic, A: Molecular detection of blood-borne epithelial cells in colorectal cancer patients and in patients with benign bowel disease. *Int J Cancer* 2000;89:8-13

16. Jang SJ, Soria JC, Wang L, Hassen KA, Morice RC, Walsh GL, Hong WK, Mao L: Activation of melanoma antigen tumor antigens occurs early in lung carcinogenesis. *Cancer Res* 2001;61:7959-7963
17. Janni W, Pantel K, Rack B, Schindlbeck C, Sommer H, Gerber B, Friese K: Isolierte disseminierte Tumorzellen im Knochenmark von Brustkrebspatientinnen: Methodik, Biologie und klinische Relevanz. *Dtsch Ärztebl* 2004;101:3496-3502
18. Janni W, Rack B, Schindlbeck C: The persistence of isolated tumor cells in bone marrow from patients with breast carcinoma predicts an increased risk for recurrence. *Cancer* 2005;103(5):884-891
19. Jemal A, Thomas A, Murray T, Thun M: Cancer statistics. *CA Cancer J Clin* 2002;52:23-47
20. Jung R, Soondrum K, Kruger W, Neumaier M: Detection of micrometastasis through tissue-specific gene expression: its promise and problems. *Recent Results. Cancer Res* 2001;158:32-39
21. Kleer E, Oesterling, JE: PSA and staging of localized prostate cancer. *Urol Clin North Am* 1993;20:695-705
22. Klein CA: The systemic progression of human cancer: A focus on the individual disseminated cancer cell – the unit of selection. *Adv Cancer Res* 2003;89:35-67
23. Kufer P, Zippelius A, Lutterbuese R, Mecklenburg I, Enzmann T, Montag A, Weckermann D, Passlick B, Prang N, Reichardt P, Dugas M, Koellermann MW, Pantel K, Riethmueller G: Heterogeneous Expression of MAGE-A Genes in Occult Disseminated Tumor Cells: A Novel Multimarker Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction for Diagnosis of Micrometastatic Disease. *Cancer Res* 2002;62:251-261

24. Lindemann F, Schlimok G, Dirschedl P, Witte J, Riethmüller, G: Prognostic significance of micrometastatic tumour cells in bone marrow of colorectal cancer patients. *The Lancet* 1992;340:685-689
25. Mansi JL, Gogas H, Bliss JM, Gazet JC, Berger U, Coombes RC: Outcome of primary-breast-cancer patients with micrometastases: a long-term follow-up study. *The Lancet* 1999;354:197-202
26. Mecklenburg I, Weckermann D, Zippelius A, Schoberth A, Petersen S, Prang N, Riethmueller G, Kufer P: A multimarker Real-Time RT-PCR for MAGE-A gene expression allows sensitive detection and quantification of the minimal systemic tumor load in patients with localized cancer. *J Immunol Methods* 2007;323:180-193
27. Mikolajczyk SD, Rittenhouse HG: Pro PSA: a more cancer specific form of prostate specific antigen for the early detection of prostate cancer. *Keio J Med* 2003;52(2):86-91
28. Oberneder R, Riesenberger R, Kriegmair M, Bitzer U, Klammert R, Schneede P, Hofstetter A, Riethmueller G, Pantel K: Immunocytochemical detection and phenotypic characterization of micrometastatic tumour cells in bone marrow of patients with prostate cancer. *Urol Res* 1994;22(1):3-8
29. Park M-S, Park J-W, Jeon C-H, Lee K-D, Chang H-K: Expression of Melanoma Antigen-Encoding Genes (MAGE) by common primers for MAGE-A1 to -A6 in colorectal carcinomas among Koreans. *J Korean Med Sci* 2002;17:497-501
30. Sakr WA, Grignon DJ, Crissmann JD: High-grade prostatic intraepithelial neoplasia (HGPIN) and prostatic adenocarcinoma between ages of 20–69: an autopsy study of 249 cases. *In Vivo* 1994;8:439-443
31. Scher HI, Zhang ZF, Cohen L: Hormonally relapsed prostatic cancer: Lessons from the flutamide withdrawal syndrome. *Advances in Urology* 1995;8:61–95

32. Tsuneyama K, Sasaki M, Shimonishi T, Nakanuma Y: Expression of MAGE-A3 in intrahepatic cholangiocarcinoma and its precursor lesions. *Pathol. Int.* 2004;54:181-186
33. Wang MC, Valenzuela LA, Murphy GP, Chu TM: Purification of a human prostate specific antigen. *Investig Urol (Berl)* 1979;17:159–163
34. Weckermann D, Müller P, Wawroschek F, Krawczak G, Riethmüller G, Schlimok G: Micrometastases of bone marrow in localized prostate cancer: Correlation with established risk factors. *J Clin Oncol* 1999;17:3438-3443
35. Weckermann D, Wawroschek F, Krawczak G, Haude KH, Harzmann R: Does the immunocytochemical detection of epithelial cells in bone marrow (micrometastasis) influence the time to biochemical relapse after radical prostatectomy? *Urol Res* 1999;27:285-290
36. Weckermann D, Müller P, Wawroschek F, Harzmann R, Riethmüller G, Schlimok G: Disseminated cytokeratin positive tumor cells in the bone marrow of patients with prostate cancer: Detection and prognostic value. *J Urol* 2001;166:699-704
37. Weckermann D, Polzer B, Klein C: Bedeutung Cytokeratin-positiver Zellen im Knochenmark bei Patienten mit organbegrenztem Prostatakarzinom. *Urologe* 2007;46:1078-1080
38. Weihrauch MR, Skibowski E, Koslowsky TC, Voiss W, Re D, Kuhn-Regnier F, Bannwarth C, Siedek M, Diehl V, Bohlen H: Immunomagnetic enrichment and detection of micrometastases in colorectal cancer: correlation with established clinical parameters. *J Clin Oncol* 2002;20:4338-4343
39. Whittemore AS, Lele C, Friedman GD, Stamey T, Vogelmann JH, Orentreich N: Prostate-specific antigen as predictor of prostate cancer in black men and white men. *J Natl Cancer Inst* 1995;5(87):354–360

40. Wiedswang G, Borgen E, Karesen R, Kvalheim G, Nesland JM, Qvist H, Schlichting E, Sauer T, Janbu J, Harbitz T, Naume B: Detection of isolated tumor cells in bone marrow is an independent prognostic factor in breast cancer. *J Clin Oncol* 2003;21:3469–3478
41. Zammateo N, Lockman L, Brasseur F, De Plaen E, Lurquin C, Lobert P-E, Hamels S, Boon T, Remacle J: DNA Microarray to Monitor the Expression of MAGE-A Genes. *Clinical Chemistry* 2002;48:25-34

8. Anhang

| PCR-Primer | Sequenz |
|---------------------------|-------------------------------------|
| MAGE-A1 outer sense | 5'-GTA GAG TTC GGC CGA AGG AAC-3' |
| MAGE-A1 outer antisense | 5'-CAG GAG CTG GGC AAT GAA GAC-3' |
| MAGE-A1 inner sense | 5'-TAG AGT TCG GCC GAA GGA AC-3' |
| MAGE-A1 inner antisense | 5'-CTG GGC AAT GAA GAC CCA CA-3' |
| MAGE-A2 outer sense | 5'-CAT TGA AGG AGA AGA TCT GCC T-3' |
| MAGE-A2 outer antisense | 5'-GAG TAG AAG AGG AAG AAG CGG T-3' |
| MAGE-A2 inner sense | 5'-CAT TGA AGG AGA AGA TCT GCC T-3' |
| MAGE-A2 inner antisense | 5'-CAG GCT TGC AGT GCT GAC TC-3' |
| MAGE-A3/6 outer sense | 5'-GAA GCC GGC CCA GGC TCG-3' |
| MAGE-A3/6 outer antisense | 5'-GAT GAC TCT GGT CAG GGC AA-3' |
| MAGE-A3/6 inner sense | 5'-GGC TCG GTG AGG AGG CAA G-3' |
| MAGE-A3/6 inner antisense | 5'-GAT GAC TCT GGT CAG GGC AA-3' |
| MAGE-A4 outer sense | 5'-CAC CAA GGA GAA GAT CTG CCT-3' |
| MAGE-A4 outer antisense | 5'-TCC TCA GTA GTA GGA GCC TGT-3' |
| MAGE-A4 inner sense | 5'-CAC CAA GGA GAA GAT CTG CCT-3' |
| MAGE-A4 inner antisense | 5'-CAG GCT TGC AGT GCT GAC TCT-3' |
| MAGE-A10 outer sense | 5'-CTA CAG ACA CAG TGG GTC GC-3' |
| MAGE-A10 outer antisense | 5'-GCT TGG TAT TAG AGG ATA GCA G-3' |
| MAGE-A10 inner sense | 5'-ATC TGA CAA GAG TCC AGG TTC-3' |
| MAGE-A10 inner antisense | 5'-CGC TGA CGC TTT GGA GCT C-3' |
| MAGE-A12 outer sense | 5'-TCC GTG AGG AGG CAA GGT TC-3' |
| MAGE-A12 outer antisense | 5'-ATC GGA TTG ACT CCA GAG AGT A-3' |
| MAGE-A12 inner sense | 5'-TCC GTG AGG AGG CAA GGT TC-3' |
| MAGE-A12 inner antisense | 5'-GAG CCT GCG CAC CCA CCA A-3' |
| PBGD sense | 5'-AGA GTG ATT CGC GTG GGT ACC-3' |
| PBGD antisense | 5'-TTG GGT GAA AGA CAA CAG CAT C-3' |

Tabelle 1: Primer-Sequenzen der MAGE-RT-PCR und PBGD-RT-PCR

| Patient | Probe | CK-ICC | MAGE A-1 | MAGE A-2 | MAGE A-3/6 | MAGE A-4 | MAGE A-10 | MAGE A-12 |
|---------|--------|---------|----------|----------|------------|----------|-----------|-----------|
| 034 | KM re. | Negativ | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | KM li | Negativ | 12.57 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | Blut | n.d. | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 054 | KM re. | Negativ | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | KM li | Negativ | 0 | 0 | 0 | 1662.31 | 0 | 0 |
| | Blut | n.d. | 162.53 | 0 | 0 | 3.10 | 0 | 0 |
| 154 | KM re. | Positiv | 23.69 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | KM li | Negativ | 0 | 0 | 0 | 0 | 1.60 | 0 |
| | Blut | n.d. | 5.37 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 156 | KM re. | Negativ | 0 | 0 | 0 | <0.01 | 0 | 0 |
| | KM li | Negativ | 0 | 9.83 | 0 | 0.89 | 0 | 0 |
| | Blut | n.d. | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 191 | KM re. | Negativ | 0 | 0 | 1.11 | 0 | 0 | 0 |
| | KM li | Negativ | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | Blut | n.d. | 0 | 157.61 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 206 | KM re. | Negativ | 0 | 0 | 0 | 2.57 | 0 | 0 |
| | KM li | Negativ | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | Blut | n.d. | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 230 | KM re. | Negativ | 0 | 2.18 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | KM li | Negativ | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | Blut | n.d. | 2.72 | 9.31 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 289 | KM re. | Negativ | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | KM li | Negativ | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | Blut | n.d. | 50.54 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 303 | KM re. | Negativ | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | KM li | Positiv | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | Blut | n.d. | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 315 | KM re. | Negativ | 2.76 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | KM li | Negativ | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | Blut | n.d. | 0 | 0 | 0 | 923.87 | 0 | 0 |
| 322 | KM re. | Negativ | 0 | 25.56 | 0 | 1.20 | 0 | 0 |
| | KM li | Negativ | 2.49 | 0 | 0 | 2.21 | 0 | 0 |
| | Blut | n.d. | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 324 | KM re. | Positiv | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | KM li | Negativ | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | Blut | n.d. | 0 | 1.02 | 0 | <0.01 | 0 | 0 |
| 328 | KM re. | Negativ | 4.44 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | KM li | Negativ | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | Blut | n.d. | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 356 | KM re. | Negativ | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | KM li | Positiv | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | Blut | n.d. | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 407 | KM re. | Negativ | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | KM li | Negativ | 0 | 0 | 1.44 | 0 | 0 | 0 |
| | Blut | n.d. | 0 | 0 | 5.81 | <0.01 | 0 | 0 |
| 467 | KM re. | Negativ | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | KM li | Positiv | 157.40 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | Blut | n.d. | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 476 | KM re. | Negativ | 3.90 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | KM li | Negativ | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | Blut | n.d. | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 568 | KM re. | Negativ | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | KM li | Positiv | 0 | 0 | 0 | 61.14 | 0 | 0 |
| | Blut | n.d. | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 570 | KM re. | Negativ | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | KM li | Negativ | 0.79 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | Blut | n.d. | 2.08 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 579 | KM re. | Positiv | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | KM li | Negativ | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | Blut | n.d. | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |

Tabelle 2: Präoperative Expression der 6 MAGE-A Marker in Relation zu PBGD im peripheren venösen Blut und in Knochenmarkaspiraten von 20 repräsentativen Patienten mit lokal begrenztem Prostatakarzinom unserer Kohorte. Die Ergebnisse der Zytokeratin-Immunzytochemie (CK-ICC) sind zum Vergleich abgebildet. Positive Signale sind grau unterlegt.

[KM re / li = Knochenmark rechts / links, n.d. = nicht durchgeführt, 0 = negatives Signal]

| | | Patienten mit biochemischem Rezidiv n=21 | Patienten ohne biochemisches Rezidiv n=18 |
|--|--------------------------|---|--|
| Alter: | Mittelwert | 68.9 Jahre | 68.4 Jahre |
| | Min. / Max. | 57 / 84 | 61 / 79 |
| Rezidivfreies Überleben: | Mittelwert | 5.8 Monate | > 43 Monate |
| | Min. / Max. | 0 / 43 | 43 / 107 |
| Pathohistologisches Tumorstadium: | | | |
| | Organbegrenzt | 4 | 18 |
| | Absetzungsränder positiv | 7 | 0 |
| | Samenblaseninfiltration | 3 | 0 |
| | Positive Lymphknoten | 7 | 0 |
| Gleason-Score des Prostatektomiepräparates: | | | |
| | 2 – 4 | 0 | 2 |
| | 5 – 6 | 4 | 16 |
| | 7 | 12 | 0 |
| | 8 – 10 | 5 | 0 |
| Präoperativer PSA-Wert: | | | |
| | ≤ 4 ng/ml | 1 | 4 |
| | >4 -10 ng/ml | 4 | 13 |
| | > 10 –20 ng/ml | 6 | 1 |
| | > 20 ng/ml | 10 | 0 |

Tabelle 3: Charakteristika von Prostatakarzinompatienten mit und ohne biochemischen Progress nach radikaler Prostatektomie

| Multi- MAGE PCR | Biochemischer Verlauf der Erkrankung | | | |
|-----------------------|--------------------------------------|---------|-------------|--------|
| | | Rezidiv | rezidivfrei | gesamt |
| positiv | 12 | 4 | 16 | |
| negativ | 9 | 14 | 23 | |
| gesamt | 21 | 18 | 39 | |

Tabelle 4: Vergleich der postoperativen Ergebnisse der Multimarker-MAGE-Real-Time-PCR bei Patienten mit und ohne biochemischen Progress nach radikaler Prostatektomie ($p=0.027$, Chi-Quadrat-Test)

| Patient | CK-ICC | Probe | MAGE A-1 | MAGE A-2 | MAGE A-3/6 | MAGE A-4 | MAGE A-10 | MAGE A-12 |
|---------|---------|-------------------------|---------------------------|------------------|--------------------|---------------------------|------------------|-------------------------------|
| 1-1 | negativ | KM re. KM li Blut | 0 0 0 | 0 0 0 | 0 0 0 | 0 0 0 | 0 0 0 | 0 0 0 |
| 1-2 | positiv | KM re. KM li Blut | 0 0 0 | 0 0 0,18 | 0 0 0 | 0 0 0 | 0 0 0 | 0 0 0 |
| 1-3 | negativ | KM re. KM li Blut | 0 0 0 | 0 0 0 | 0 0 0 | 0 0 0 | 0 0 0 | 0 0 0 |
| 1-4 | negativ | KM re. KM li Blut | 0 0 0 | 0,72 0 0 | 0 0 0 | 0 0 0 | 0 0 0 | 0 0 0 |
| 1-5 | negativ | KM re. KM li Blut | 0 0 0 | 0,82 0 0 | 0 0 < 0,01 | 0 0 0 | 0 0 0 | 0 0 0 |
| 1-6 | negativ | KM re. KM li Blut | 0 0 0 | 0 0 0 | 0 0 0 | 0 0 0 | 0 0 0 | 0 0 0 |
| 1-7 | negativ | KM re. KM li Blut | 0 0 0 | 0 0 0 | 0 0 0 | 0 0 0 | 0 0 0 | 0 0 0 |
| 1-8 | negativ | KM re. KM li Blut | 0,35 0 0 | < 0,01 0 0 | 0 0 0 | < 0,01 0 < 0,01 | 0 0 0 | 0 0 0 |
| 1-9 | positiv | KM re. KM li Blut | 0 0 0 | 0 0 0 | 0 0 0 | 0 0 0 | 0 0 0 | 0 0 0 |
| 1-10 | positiv | KM re. KM li Blut | 0 0 0 | 0 0 0 | 0 0 0 | 0 0 0 | 0 0 0 | 0 0 0 |
| 1-11 | negativ | KM re. KM li Blut | 0 0 0 | 0 0 0 | 0 0 0 | < 0,01 0 0 | 0 0 0 | 0 0 0 |
| 1-12 | negativ | KM re. KM li Blut | 0 0 0 | 0 0 0 | 0 0 0 | 0 0 0 | 0 0 0 | 0 0 0 |
| 1-13 | negativ | KM re. KM li Blut | X 13,55 0 | X 0 0 | X 0 0 | X 0 0 | X 0 0 | X 0 0 |
| 1-14 | negativ | KM re. KM li Blut | 1189,39 1597,00 0 | 0 23,45 0 | 0 0 0 | 0 0 0 | 0 0 0 | 0 0 0 |
| 1-15 | negativ | KM re. KM li Blut | 50847,73 22591,92 0 | 16,66 0 0 | 0 0 0 | < 0,01 0 0 | 0 0 0 | 0 0 0 |
| 1-16 | negativ | KM re. KM li Blut | X 26,83 0 | X 0,16 0 | X 0 0 | X < 0,01 0 | X 0 0 | X 0 0 |
| 1-17 | negativ | KM re. KM li Blut | 0 0 0 | 0 0 0 | <0,01 1,39 0 | < 0,01 0 0 | 0 0 0 | 0 0 0 |
| 1-18 | negativ | KM re. KM li Blut | 0 0 0,72 | 0 0 0,01 | 2,56 0 0 | 0 0 0 | 0 0 0 | < 0,01 0 0 |
| 1-19 | negativ | KM re. KM li Blut | 0 0 X | 0 0 X | 0 0 X | 0,56 0 X | 0 0 X | 0 0 X |
| 1-20 | negativ | KM re. KM li Blut | 0 0 0 | 0 0 0 | 0 0 0 | 0 0 0 | 0 0 < 0,01 | 0 0 0 |
| 1-21 | negativ | KM re. KM li Blut | 0 0 0 | 0 0 0 | 0 4821,36 0 | 23703,66 28891,71 0 | 0,06 0 0 | 1512244,45 3632792,46 0 |

Tabelle 5: MAGE-Expression in Relation zu PBGD im peripheren Blut und in Knochenmarkspiraten von Prostatakarzinompatienten mit biochemischem Rezidiv nach radikaler Prostatektomie (postoperative Ergebnisse).

Positive Signale sind grau unterlegt.

[KM re / li = Knochenmark rechts / links, X = kein Signal des Haushaltsgens, 0 = negatives Signal]

| Patient | CK-ICC | Probe | MAGE A-1 | MAGE A-2 | MAGE A-3/6 | MAGE A-4 | MAGE A-10 | MAGE A-12 |
|---------|---------|--------|----------|----------|------------|----------|-----------|-----------|
| 0-1 | positiv | KM re. | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | | KM li | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | | Blut | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 0-2 | negativ | KM re. | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | | KM li | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | | Blut | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 0-3 | negativ | KM re. | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | | KM li | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | | Blut | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 0-4 | negativ | KM re. | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | | KM li | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | | Blut | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 0-5 | negativ | KM re. | 2,01 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | | KM li | 1,37 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | | Blut | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 0-6 | negativ | KM re. | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | | KM li | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | | Blut | 0 | 0 | 0 | < 0,01 | 0 | 0 |
| 0-7 | positiv | KM re. | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | | KM li | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | | Blut | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 0-8 | negativ | KM re. | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | | KM li | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | | Blut | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 0-9 | negativ | KM re. | 0 | 0 | 0 | 0,01 | 0 | 0 |
| | | KM li | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | | Blut | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 0-10 | negativ | KM re. | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | | KM li | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | | Blut | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 0-11 | negativ | KM re. | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | | KM li | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | | Blut | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 0-12 | negativ | KM re. | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | | KM li | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | | Blut | 0 | 0 | 0 | < 0,01 | 0 | 0 |
| 0-13 | negativ | KM re. | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | | KM li | 10,23 | 0 | 0 | 0,38 | 0 | 0 |
| | | Blut | X | X | X | X | X | X |
| 0-14 | negativ | KM re. | 2,03 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | | KM li | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | | Blut | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 0-15 | negativ | KM re. | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | | KM li | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | | Blut | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 0-16 | negativ | KM re. | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | | KM li | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | | Blut | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 0-17 | negativ | KM re. | 40,64 | 54,67 | 0 | < 0,01 | 0 | < 0,01 |
| | | KM li | 957,36 | 0 | 0 | 0,53 | 0 | 0 |
| | | Blut | 0 | 0 | 0 | < 0,01 | 0 | 0 |
| 0-18 | negativ | KM re. | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | | KM li | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | | Blut | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |

Tabelle 6: MAGE-Expression im Verhältnis zu PBGD im peripheren venösen Blut und in Knochenmarkaspiraten von Prostatakarzinompatienten ohne biochemisches Rezidiv (postoperative Ergebnisse). Alle Patienten hatten günstige Prognosefaktoren (präoperatives PSA \leq 20 ng/ml, Tumorstadium \leq pT2, pN0, R0, pathologischer Gleason-Score \leq 6) und lebten zum Zeitpunkt der Analyse ohne PSA-Progress mehr als 30 Monate.

Positive Signale sind grau unterlegt.

[KM re / li = Knochenmark rechts / links, X = kein Signal des Haushaltsgens, 0 = negatives Signal]

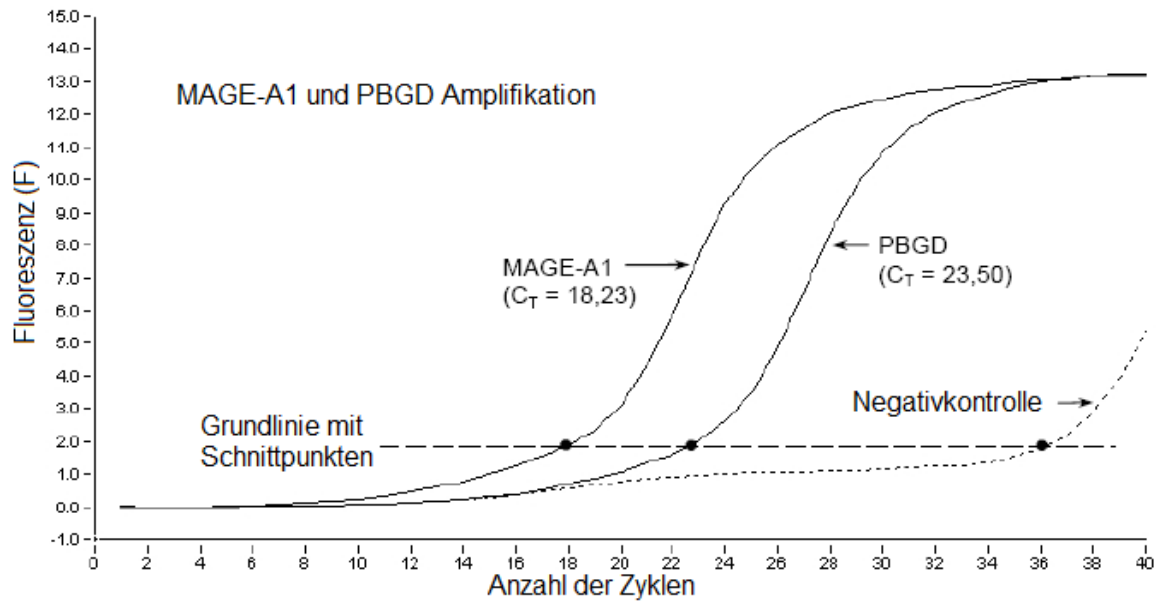
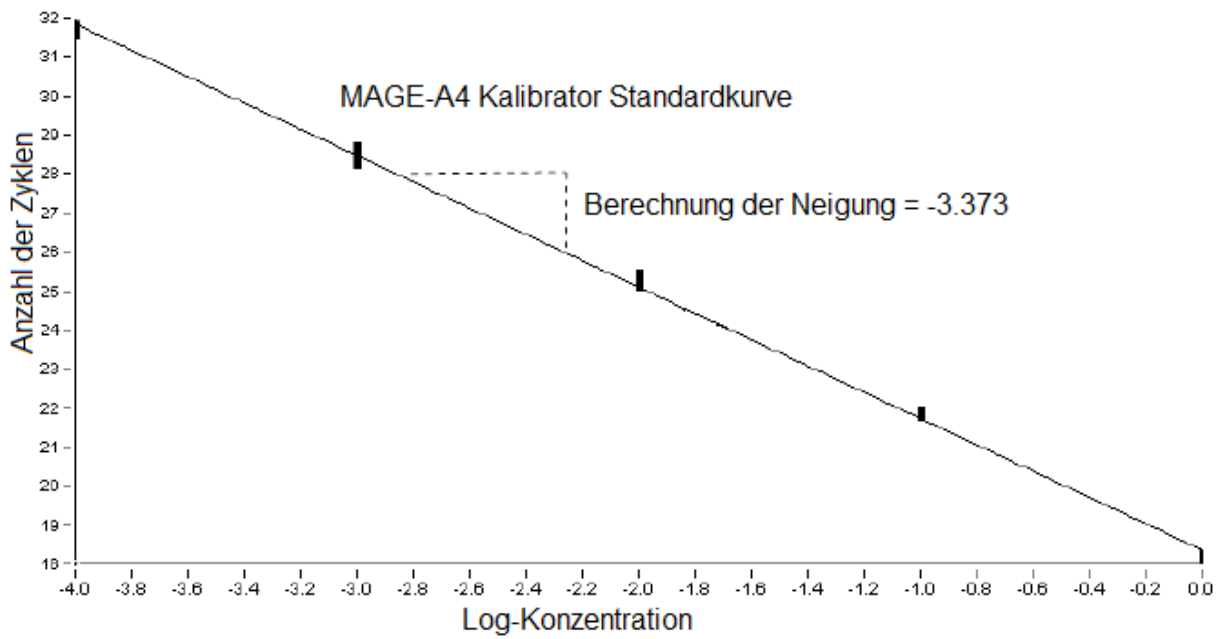
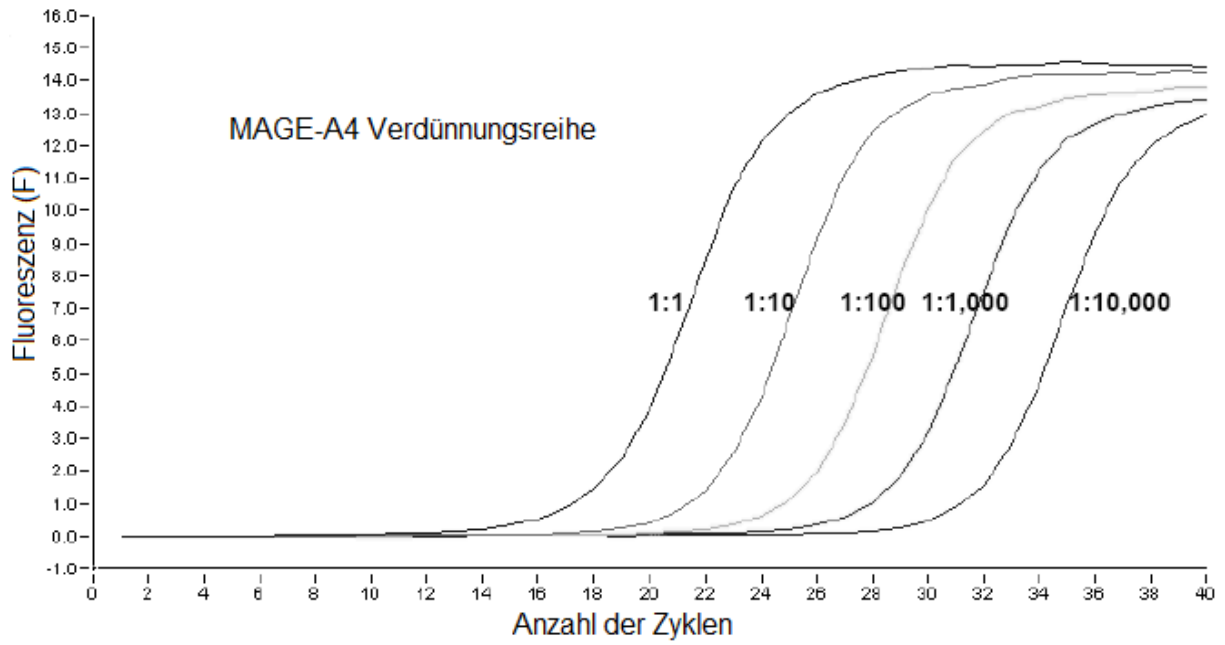


Abbildung 1:

Grafik der Real-Time-Amplifikation von MAGE-A1 und PBGD in einer peripheren Blutprobe eines Patienten mit lokal begrenztem Prostatakarzinom. Die Grundlinie mit den jeweiligen Schnittpunkten ist dargestellt. Eine optimale PCR-Efficiency angenommen ($E=2.0$) kann die relative Menge an MAGE-A1-Transkripten in Relation zu PBGD mit Hilfe folgender Formel berechnet werden:

$$\frac{MAGE}{PBGD} = \frac{E_{(PBGD)}^{C_T^{PBGD}}}{E_{(MAGE)}^{C_T^{MAGE}}} \cdot K = E^{(C_T^{PBGD}) - (C_T^{MAGE})} \cdot K = 2^{5.27} \cdot K = 38.58 \cdot K$$

Die Konzentration der MAGE-A1-Transkripte ist folglich 38.58 mal höher als die der PBGD-Transkripte.



Berechnung der PCR-Efficiency: $E = 10^{-1/\text{Neigung}} = 1.9791$

Abbildung 2:

Verdünnungsreihe der MAGE-A4 Kalibrator-Probe bestehend aus 5 LB23-SAR-Tumorzellen in 2 ml peripherenvenösem Blut. Die obere Grafik zeigt die 5 Verdünnungskurven zur Berechnung der Standardkurve. Die untere Abbildung zeigt die Standardkurve, die durch Auftragen des jeweiligen Anstiegs-Zyklus gegen den Logarithmus der Konzentration der jeweiligen Probe entsteht. Die Neigung der Kurve zeigt die Efficiency der PCR und kann wie oben beschrieben berechnet werden.

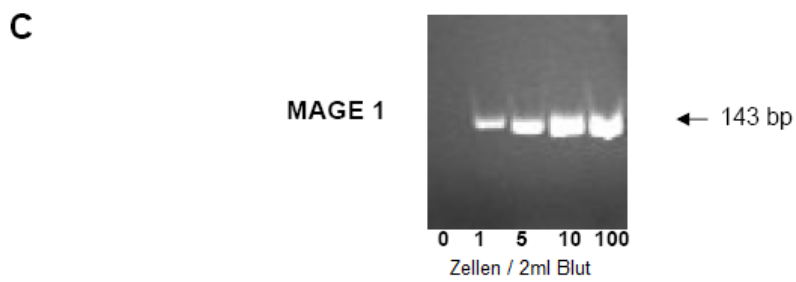
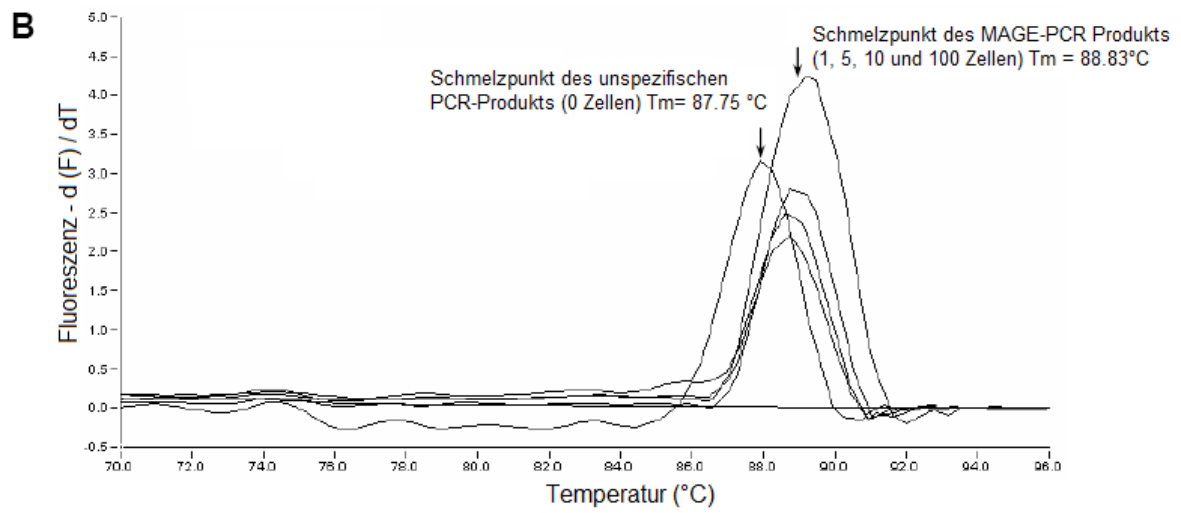
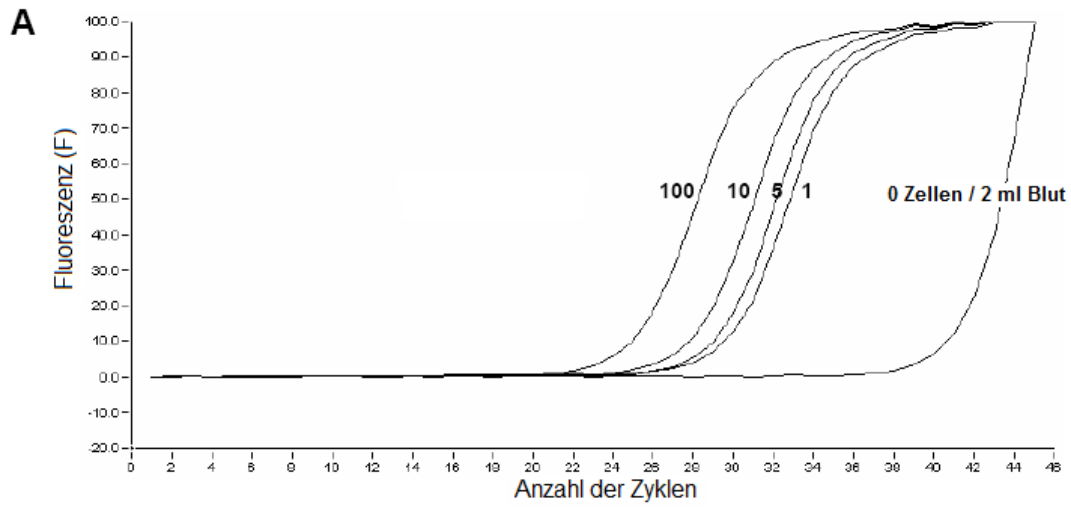


Abbildung 3:

Grafik der Real-Time-Amplifikation (A) und der Schmelzpunktanalyse (B) der MAGE-A1-Transkripte in 2 ml peripherenvenösen Blutproben, die mit einer verschiedenen Anzahl an Mz2-Mel-Zellen versetzt sind. Das spezifische MAGE-A1-PCR-Produkt zeigt einen Schmelzpunkt bei ca. 88.8 °C. Unspezifische Produkte können durch die unterschiedliche Kurve identifiziert werden.

Die Gel-Elektrophorese (C) bestätigt die spezifische Amplifikation und belegt die zuverlässige Detektion von einer Tumorzelle in 2 ml peripherenvenösem Vollblut.

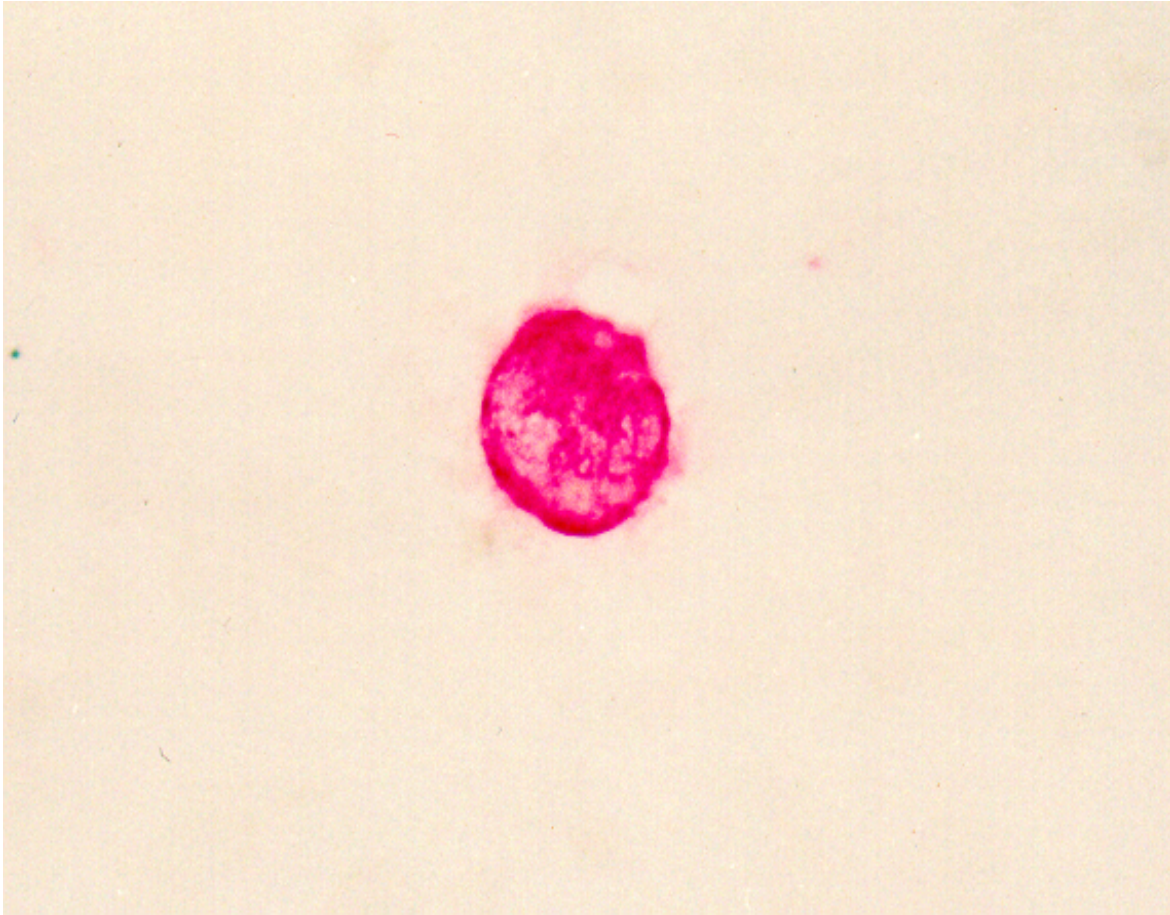


Abbildung 4:

Panzytokeratin-positive Zelle im Knochenmark eines Patienten mit lokoregionärem Prostatakarzinom (400fache Vergrößerung)

9. Danksagung

Allen voraus danke ich Frau PD Dr. Dorothea Weckermann, stellvertretende Direktorin der Urologischen Klinik. Ihr verdanke ich das Thema dieser Arbeit und die ebenso lückenlose wie engagierte Betreuung während meiner Beschäftigung mit der vorgegebenen Fragestellung.

Ich danke Herrn Dr. Ingo Mecklenburg und Herrn Dr. Peter Kufer vom Institut für Immunologie der Ludwig-Maximilians-Universität München. Sie haben die Vorarbeiten zur MAGE-Diagnostik geliefert und mir bei der Interpretation der Befunde entscheidend geholfen.

Herrn Dipl.-Stat. Martin Krauss danke ich für die Unterstützung bei der statistischen Auswertung.

Ebenso danke ich den Kolleginnen und Kollegen der Urologischen Klinik des Klinikums Augsburg für Ihre tatkräftige Unterstützung.

Ich bedanke mich bei allen in der Praxis tätigen Urologen in Augsburg und Umgebung für die Bereitstellung der Follow-up Daten.

Mein Dank gilt auch Frau Dr. Dorothea Birnböck und Frau Waltraud Werdecker, die mich bei der Auswertung der Patientendaten und Dokumentation unterstützt haben.

10. Lebenslauf

Name: Björn Pommer
Geburtsdatum-/ort: 16. Januar 1979 in Augsburg
Familienstand: verheiratet
Wohnort: Kleeanger 9
86391 Stadtbergen
Konfession: Evangelisch

Schulbildung:

1985 – 1989 St. Anna Grundschule, Augsburg
1989 – 1998 Peutingen-Gymnasium, Augsburg (Abitur 06/1998)

Zivildienst:

1998 – 1999 Urologische Klinik des Klinikums Augsburg

Studium:

1999 – 2005 Studium der Humanmedizin an der
Ludwig-Maximilians-Universität, München
08 / 2001 Ärztliche Vorprüfung
08 / 2002 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
08 – 09 / 2004 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
11 / 2005 Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

12 / 2005 Approbation

Ärztliche Tätigkeit:

seit 12 / 2005 Assistenzarzt III. Medizinische Klinik, Klinikum Augsburg