

**Nachweis zirkulierender mitochondrialer DNA im Serum von Patienten mit
urologischen Krebserkrankungen**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Hohen Medizinischen Fakultät
der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität
Bonn

David Christian Müller
aus Zürich/Schweiz

2012

Angefertigt mit der Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: Prof. Dr. Dr. Müller
2. Gutachterin: PD Dr. Walgenbach-Brünagel
3. Gutachter: PD Dr. Holdenrieder

Tag der Mündlichen Prüfung: 16.04.2012

Aus der Urologischen Klinik

Direktor: Prof. Dr. med. Dr. h. c. Stefan C. Müller

Meinem Vater

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	8
1. Einleitung	10
1.1. Prostatakarzinom	10
1.1.1. Epidemiologie	10
1.1.2. Risikofaktoren	10
1.1.3. Histopathologische Klassifikation	11
1.1.4. Tumormarker und Diagnostik	14
1.2. Blasenkarzinom	15
1.2.1. Epidemiologie	15
1.2.2. Risikofaktoren	15
1.2.3. Histopathologische Klassifikation	17
1.2.4. Tumormarker und Diagnostik	18
1.3. Nierenzellkarzinom	21
1.3.1. Epidemiologie	21
1.3.2. Risikofaktoren	21
1.3.3. Histopathologische Klassifikation	22
1.3.4. Tumormarker und Diagnostik	23
1.4. Zirkulierende DNA	23
1.4.1. Diagnostische und prognostische Relevanz	25
1.5. Ziel dieser Arbeit	26
2. Material und Methoden	28
2.1. Materialien	28
2.1.1. Geräte	28
2.1.2. Labormaterialien	28
2.1.3. Chemikalien	28
2.1.4. Kits	29
2.1.5. Primer	29
2.1.6. Probenmaterial	29

2.1.7. Software	32
2.2. Methoden	32
2.2.1. Aufreinigung des Blutserums und DNA-Isolation	32
2.2.2. Herstellung der Standardreihe	33
2.2.3. Primerdesign	34
2.2.4. Quantitative Polymerase-Kettenreaktion	34
2.2.5. mtDNA Quantifizierung	37
2.2.6. Statistische Auswertung	37
2.2.7. Ablauf des Arbeitsprozesses	39
3. Ergebnisse	40
3.1. Korrelation von mtDNA Konzentration / mtDNA-Integrität mit Alter und Geschlecht	40
3.2. Unterschiede der mtDNA Konzentration/Fragmentation bei Gesunden und Tumorpatienten	42
3.3. Korrelation mit klinisch-pathologischen Daten	45
3.3.1. Nierenzellkarzinom	45
3.3.2. Blasenkarzinom	46
3.3.3. Prostatakarzinom	47
4. Diskussion	48
4.1. Zirkulierende DNA als Biomarker	48
4.2. mtDNA-Integrität	50
4.3. Kontrollkollektiv	51
4.4. Nachweis im Serum	52
4.5. Perspektiven	52
5. Zusammenfassung	54
Abbildungsverzeichnis	55
Tabellenverzeichnis	56

Anhänge	57
Literaturverzeichnis	58
Danksagung	66

Abkürzungsverzeichnis

AUC	-	Area under curve
BCA	-	Blasenkarzinom
Bp	-	Basenpaar
BPH	-	Benigne Prostatahyperplasie
BTA	-	Bladder Tumor Antigen
Ct	-	Cycle Threshold
CT	-	Computertomographie
CYFRA	-	Zytokeratinfragmente
DNA	-	Desoxyribonukleinsäure
DRU	-	Digital-rektale Untersuchung
ELISA	-	Enzyme-linked immuno sorbent assay
FDP	-	Fibrin degradation produkts
FISH	-	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung
GEKID	-	Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland
GK	-	Gesunde Kontrollen
HA	-	Hyaluronsäure
HAase	-	Hyaluronidase
hK2	-	Human kallikrein-related peptidase 2
IARC	-	International Agency for Research on Cancer
mtDNA	-	mitochondriale DNA
NMP22	-	nukleäres Matrixproteins 22
PCA	-	Prostatakarzinom
PCR	-	Polymerase Kettenreaktion

PSA	-	Prostata-spezifisches Antigen
PUNLMP	-	Papilläre urotheliale Neoplasie mit niedriger maligner Potenz
RCC	-	Nierenzellkarzinom
RFWU	-	Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität
RKI	-	Robert Koch-Institut
RNA	-	Ribonukleinsäure
rRNA	-	Ribosomale RNA
ROC	-	Receiver operator characteristic
TNF	-	Tumor Nekrose Faktor
TNM	-	T umor, N odi lymphatici, M etastasen
TRAP	-	Telomere Repeat Amplification Protocol
TRUS	-	Transrektaler Ultraschall
UBC	-	Urinary bladder cancer marker
UDG	-	Uracil-DNA-Glycosylase
UICC	-	Union internationale contre le cancer

1. Einleitung

1.1. Prostatakarzinom

1.1.1. Epidemiologie

In der Epidemiologie steht die Inzidenz für die Anzahl an Neuerkrankungen innerhalb eines Jahres. Die Mortalität beziffert die Anzahl an verursachten Todesfällen innerhalb eines Jahres.

In Deutschland erkrankten im Jahr 2006 197.600 Frauen und 229.200 Männer an bösartigen Neubildungen. Die Zahl der dadurch verursachten Todesfälle liegt bei 98.492 Frauen und 112.438 Männern (Robert Koch-Institut et die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. 2010). Weltweit lag 2002 die Inzidenz einer Krebserkrankung bei 5.801.839 Männern und 5.060.657 Frauen. Die Mortalität lag im gleichen Jahr bei 3.795.991 Männern und 2.927.896 Frauen (Parkin et al., 2005).

Das Prostatakarzinom war 2006 mit 60120 Neuerkrankungen der häufigste Krebs bei Männern in Deutschland. Der relative Anteil liegt bei 26 %. Die Zahl der Todesfälle lag bei 11.577, dies sind 10,3 % aller Fälle bei Männern. Das mittlere Erkrankungsalter liegt bei 69 Jahren. Die 5-Jahres-Überlebensrate liegt zwischen 83 % und 94 % (Robert Koch-Institut et die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. 2010). Die weltweite Inzidenz war 2002 bei 619.000 Fällen, die Mortalität bei 221.000 Fällen. Damit ist das PCA weltweit der fünft häufigste Krebs und der zweit häufigste Krebs bei Männern. Von sämtlichen krebsbedingten Todesfällen verursacht das PCA 5,8 % bei den Männern und 3,3 % insgesamt (Parkin et al., 2005).

1.1.2. Risikofaktoren

Es gibt drei bekannte Risikofaktoren für das Prostatakarzinom. Zunehmendes Alter, die ethnische Abstammung und familiäre Häufung. Haben ein oder zwei Verwandte ersten Grades ein PCA so ist die Wahrscheinlichkeit zu erkranken um das fünf- bis elffache erhöht (Steinberg et al., 1990; Gronberg et al., 1996). Patienten, die an der erblichen Form des PCA leiden erkranken ca. 6-7 Jahre früher, unterscheiden sich sonst jedoch nicht von anderen Patienten (Bratt, 2002).

Zu diesen drei Faktoren kommen auch exogene Risikofaktoren wie z.B. Ernährung (viel rotes Fleisch und wenig Obst). Als Beispiel dafür ist es so, dass in der Japanischen Bevölkerung das Risiko an einem PCA zu erkranken niedriger ist (Inzidenz aus dem Jahr 2002 = 12,6/100.000 Einwohner (Parkin et al., 2005)) als in der Bevölkerung der USA (Inzidenz aus dem Jahr 2002 =

119,9/100.000 Einwohner (Parkin et al., 2005)). Zieht ein japanischer Mann nach Hawaii so steigt sein Risiko. Zieht er nach Kalifornien so gleicht es sich beinahe dem der US Amerikaner an (Zaridze et al., 1984).

1.1.3. Histopathologische Klassifikation

Im Zusammenhang mit Krebserkrankungen ist es wichtig die s.g. TNM-Klassifikation zu kennen. Diese wurde 1950 von der Union internationale contre le cancer (UICC) übernommen. Anhand dieser Klassifikation ist es möglich, Informationen über den eigentlichen Tumor (T = Tumor), den s.g. Primarius, und dessen Absiedlungen im Körper des Patienten zusammenzufassen (N = Nodi lymphatici – Lymphknotenmetastasen; M = Metastasen – Fernmetastasen). Diese haben Bedeutung für die Prognose des Patienten als auch für die Therapie der Erkrankung. Für die einzelnen Tumorarten gibt es leichte Variationen innerhalb der Klassifikation, die regelmäßig erneuert und angepasst werden. Für die TNM-Klassifikation des PCA siehe Tabelle 1.

Tumor	T 1	Inzidentelles Karzinom – nicht sichtbar, nicht tastbar
	T 1a	≤ 5% des resezierten Gewebes
	T 1b	> 5% des resezierten Gewebes
	T 1c	Tumor durch Biopsie diagnostiziert, z.B. bei PSA-Elevation
	T 2	Tumor begrenzt auf Prostata
	T 2a	Tumor befällt einen Lappen
	T 2b	Tumor befällt beide Lappen
	T 3	Tumor durchbricht die Prostatakapsel (Invasion der Apex oder in die Prostatakapsel – aber nicht darüber hinaus – wird als T 2 klassifiziert)
	T 3a	Einseitige extrakapsuläre Ausbreitung
	T 3b	Beidseitige extrakapsuläre Ausbreitung
	T 3c	Tumor infiltriert in die Samenblase(n)
	T 4	Tumor ist fixiert und/oder infiltriert – z.B. Blasenhal, Sphinkter externus usw.
	Nodi lymphatici	N 0
N 1		regionäre Lymphknoten sind befallen
Metastase	M 0	Keine Fernmetastasen vorhanden
	M 1	Fernmetastasen vorhanden
	M 1a	Metastasen in nicht regionären Lymphknoten
	M 1b	Knochenmetastasen
	M 1c	Metastasen in anderen Organen

Tabelle 1: TNM-Klassifikation beim Prostatakarzinom der UICC von 2002

Das T-Stadium beschreibt die lokale Ausbreitung des Tumors; das N-Stadium beschreibt den Befall der Lymphknoten; das M-Stadium zeigt die Bildung von Tochtergeschwüren

Eine weitere wichtige Information bei Tumorerkrankungen ist der Differenzierungsgrad (Grading) des Tumors. Dieser besagt, in wie weit sich das Tumorgewebe von seinem ursprünglichen Gewebe unterscheidet. Das Grading hat ebenfalls eine Bedeutung für Prognose und

Therapie des Patienten. Wichtige Punkte bei der Beurteilung sind die Größe und Teilungsaktivität der Zellkerne sowie die Ähnlichkeit mit dem Ursprungsgewebe.

Beim Prostatakarzinom hat sich eine modifizierte Klassifikation des Grading in der klinischen Routine durchgesetzt, der s.g. Gleason Score. Hier wird der Differenzierungsgrad des Tumors in die Grade 1 bis 5 eingeteilt. Siehe Abbildung 1. Zur Bildung des Gleason Score werden nun die beiden im Präparat häufigsten Grade addiert, so dass ein Score von 2 bis 10 erreicht werden kann. Liegt nur ein Grad im Präparat vor wird dieser verdoppelt. Ein Gleason-Score von 2 bis 4 steht für gut differenzierte Tumoren, ein Score von 5 bis 6 beschreibt mäßig differenzierte Tumoren, ein Score von 7 steht für mäßig bis schlecht differenzierte und ein Score von 8 bis 10 für schlecht- bis entdifferenzierte Tumoren.

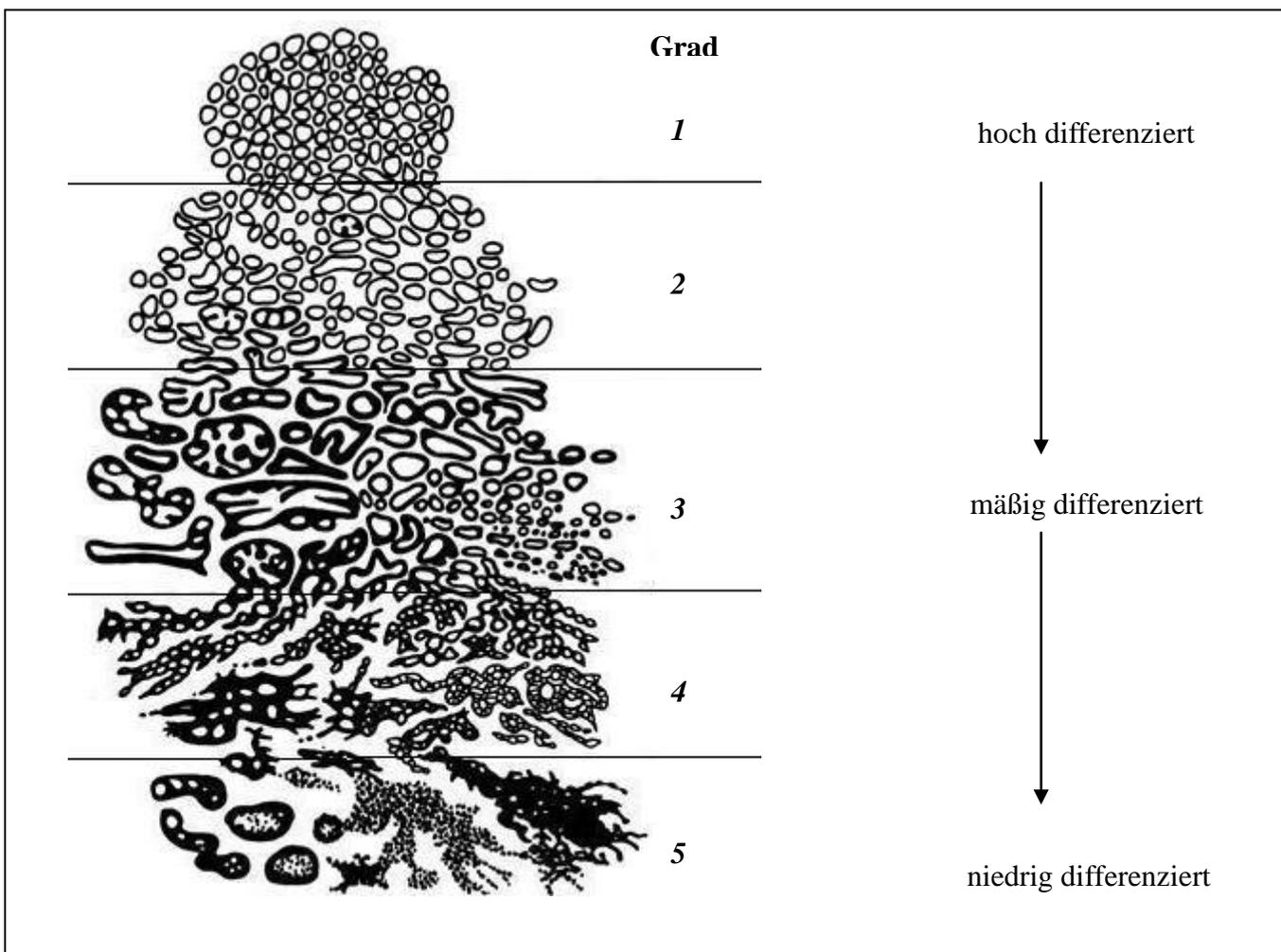


Abbildung 1: Histopathologische Klassifikation nach dem Gleason Grading

(modifiziert aus Quelle: http://www.coreoncology.com/patient/pc_about_stages.aspx, 11.05.2010)

Die Abbildung zeigt die Veränderung des histopathologischen Bildes des PCA bei zunehmender Entdifferenzierung.

1.1.4. Tumormarker und Diagnostik

Der Erfolg bei der Behandlung der drei in dieser Arbeit untersuchten Tumorerkrankungen hängt in erster Linie von der frühzeitigen Diagnose der Erkrankung ab. Dazu sind aussagekräftige Tumormarker mit hoher Sensitivität und Spezifität notwendig.

In der Früherkennung des Prostatakarzinoms spielt das Prostata-spezifische-Antigen (PSA) eine wichtige Rolle. Es handelt sich dabei um ein ausschließlich von Prostatagewebe gebildetes Protein. Es ist jedoch nicht spezifisch für Karzinomgewebe. Damit erklärt sich auch der größte Schwachpunkt dieser Untersuchung. Durch andere nicht-maligne Prostataerkrankungen, v.a. benigne Prostatahyperplasie und Prostatitis, steigt das PSA im Serum an. Dies führt zu einer hohen Zahl unnötiger Prostatabiopsien. Darüber hinaus finden sich auch bei normalem PSA Wert Prostatakarzinome, so dass ergänzend die Digitalrektale Untersuchung (DRU) und der Transrektale Ultraschall (TRUS) eingesetzt werden müssen.

Um die oben genannten Schwächen der alleinigen PSA-Wert Bestimmung zu verbessern, nutzt man PSA-Derivate wie die PSA-Anstiegsgeschwindigkeit, altersspezifische PSA-Normwerte und das s.g. Freie PSA. Dennoch steht jedoch der Nutzen des PSA als Screening Methode insgesamt zur Debatte (Brawley et al., 2009). Kritikpunkte sind einerseits unnötig therapierte Patienten: aufgrund des langsamen Fortschreitens der Erkrankung werden durch das PSA Screening Patienten einer Biopsie/Therapie zugeführt, deren Prostatakarzinom zu Lebzeiten nicht klinisch signifikant geworden wäre (Schroder et al., 2003). Andererseits finden sich aber auch Fälle mit niedrigem PSA bei hohen Gleason Scores. So werden bei bis zu 25 % der Patienten mit einem PSA-Wert unter 4ng/ml niedrig differenzierte Prostatakarzinome (Gleason Score >7) diagnostiziert (Hernandez et al., 2004). Bei PSA-Werten unter 0,5ng/ml konnten in 6,6 % der Fälle niedrig differenzierte Prostatakarzinome nachgewiesen werden (Thompson et al., 2004). Ein weiterer wichtiger Punkt der Kritik am PSA als Biomarker ist der, dass es seit der Einführung des PSA als Screeningmethode zu keiner Veränderung der Mortalität des Prostatakarzinoms in Deutschland gekommen ist (Karim-Kos et al., 2008). Wie kontrovers die Diskussion über den Stellenwert des PSA-Screenings ist, wird anhand zweier großen Studien aus dem Jahr 2009 deutlich. Einerseits die PLCO Studie in den USA: Hier gab es keine Senkung der Mortalität durch das PSA-Screening in einer Gruppe von 76.000 Probanden. Andererseits kam im selben Jahr die europäische ESPRC Studie zu dem Ergebnis, dass das Screening zu einer Senkung der Mortalität um 20 % führt. An dieser Studie nahmen 182.000 Probanden teil (Andriole et al., 2009; Schroder et al., 2009).

Über das PSA hinaus gibt es eine Reihe von Ansätzen, einen neuen Biomarker zu finden. Diese sind jedoch noch nicht weit genug entwickelt, um einen möglichen Einsatz in der klinischen Routine abschließend zu beurteilen (Sardana et al., 2008). Die Human kallikrein-related peptidase 2 (hK2) z.B., ermöglicht eine bessere prognostische Aussage über ein Biochemisches Rezidiv des PCA bei PSA Werten <10 ng/ml. Die diagnostischen Möglichkeiten der hK2 sind jedoch begrenzt. Ein weiterer Ansatz ist z.B. das early prostate cancer antigen 2 (EPCA2). Damit konnten eine Sensitivität von 94 % und eine Spezifität von 92 % erreicht werden. Die Ergebnisse müssen jedoch noch in Arbeiten mit einem höheren Evidenzgrad bestätigt werden. Mit Hilfe von PCA spezifischen Autoantikörpern konnte man in einer Arbeit mit 68 Patienten mit PCA und 60 Gesunden Kontrollen eine Sensitivität von 81,6 % und eine Spezifität von 88,2 % erreichen (Steuber et al., 2008).

1.2. Blasenkarzinom

1.2.1. Epidemiologie

In den folgenden Zahlen sind muskelinvasive und nicht-muskelinvasive Blasenkarzinome zusammengefasst. Für beide Geschlechter zusammen ist das Blasenkarzinom der 5. häufigste Tumor in Europa (Ferlay et al., 2007). Die Zahl der Neuerkrankungen in Deutschland lag 2006 bei 8.090 Frauen und 19.360 Männern, die der Sterbefälle bei 1.893 Frauen und 3.549 Männern. Die 5-Jahres-Überlebensrate liegt bei 70 % der Frauen und 75 % der Männer. Das mittlere Erkrankungsalter liegt bei 72 Jahren bei Männern bzw. 74 Jahren bei Frauen (Robert Koch-Institut und Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V., 2010). Weltweit lag die Inzidenz 2002 bei ca. 357.000 Fällen, die Mortalität bei 145.000. In 77 % der Fälle sind Männer betroffen (Parkin et al., 2005).

1.2.2. Risikofaktoren

Der wichtigste Risikofaktor zur Entwicklung eines Blasenkarzinoms ist Tabakkonsum. Bei Männern lassen sich 50 % - 65 % der Fälle auf Tabakkonsum zurückführen. Bei Frauen sind es 20 % - 30 % (IARC, 2004). Gefolgt wird dieser von der beruflichen Exposition mit einer Reihe von kanzerogenen Stoffen. Dazu zählen u.a. Benzolderivate und Aromatische Amine (Pashos et al., 2002). Weitere Faktoren sind sekundäre BCA nach Bestrahlung (z.B. bei vorhergehenden gynäkologischen Tumoren oder PCA (Chrouser et al., 2005)), chronische Entzündungen des

Harntraktes und Bilharziose der Blase. Die Einnahme des Zytostatikums Cyclophosphamid führt mit einer Latenz von 6 – 13 Jahren zu einer Erhöhung der Inzidenz des Muskelinvasiven BCA (Kaldor et al., 1995; Travis et al., 1995).

1.2.3. Histopathologische Klassifikation

Tumor	mT x	„m“ als Zusatz zu jedem T-Stadium zeigt multiple Läsionen an
	T cis	Carcinoma in situ – ist ein nicht infiltrierender, epithelialer Tumor von hohem Malignitätsgrad
	T a	Nichtinvasiver papillärer Tumor
	T 1	Tumor infiltriert subepitheliales Bindegewebe
	T 2	Tumor infiltriert Muskulatur
	T 2a	oberflächlich
	T 2b	tief
	T 3	Tumor infiltriert perivesikales Fettgewebe
	T 3a	mikroskopisch
	T 3b	makroskopisch
	T 4	Tumor infiltriert Prostata, Uterus, Vagina, Beckenwand, Bauchwand
	T 4a	Tumor infiltriert Prostata, Uterus oder Vagina
	T 4b	Tumor infiltriert Beckenwand oder Bauchwand
Nodi lymphatici	N 0	Keine Lymphknotenmetastasen vorhanden
	N 1	Metastasen in einem Lymphknoten, < 2cm
	N 2	Metastasen in mehr als einem Lymphknoten, > 2 cm bis 5 cm
	N 3	Metastasen in mehr als einem Lymphknoten, > 5 cm
Metastase	M 0	Keine Fernmetastasen vorhanden
	M 1	Fernmetastasen vorhanden

Tabelle 2: TNM-Klassifikation beim Blasenkarzinom der UICC von 2002

Das T-Stadium beschreibt die lokale Ausbreitung des Tumors; das N-Stadium beschreibt den Befall der Lymphknoten; das M-Stadium zeigt die Bildung von Tochtergeschwüren.

Grading	G 1	Hoch differenziert
	G 2	Mäßig differenziert
	G 3	Niedrig differenziert

Tabelle 3: Einteilung des histopathologischen Differenzierungsgrades des Blasenkarzinoms der WHO, 1973

Die Einteilung in diese drei Grade führt zu einer Reihe von Problemen im klinischen Alltag. Bei einem heterogenen zellmorphologischen Bild, ca. 50 % der Fälle, ist eine exakte Zuordnung schwierig. Ebenfalls schwierig ist die Beurteilung intermediärer Fälle. Auch ist es schwierig anhand dieses Gradings eindeutige therapeutische Konsequenzen abzuleiten, vgl. z.B. Ta, G1 vs. Tcis. Dies führte zu Änderungen, die 2004 von der WHO übernommen wurden. Siehe Tabelle 4. Zur Zeit werden beide Klassifikationen parallel verwendet. In dieser Arbeit wird die aus dem Jahre 1973 verwendet.

Nichtinvasive Tumoren	Urotheliales Papillom
	Papilläre urotheliale Neoplasie mit niedriger maligner Potenz (PUNLMP)
	Papilläres urotheliales Low-Grade-Karzinom
	Papilläres urotheliales High-Grade-Karzinom
Invasive Tumoren	Invasion der Lamina propria (T1) Low Grade oder High Grade
	Invasion der Muskularis propria (\geq T2) Low Grade oder High Grade

Tabelle 4: : Einteilung des histopathologischen Differenzierungsgrades des Blasenkarzinoms der WHO, 2004

Die 2004 eingeführte Einteilung orientiert sich in erster Linie an der Tiefe der Infiltration des Karzinoms.

1.2.4. Tumormarker und Diagnostik

In der klinischen Routine des Blasenkarzinoms steht ebenfalls kein hinreichend sensitives und spezifisches diagnostisches Mittel zur systematischen Früherkennung zur Verfügung (Glas et al., 2003). An erster Stelle der Diagnostik steht hier der Test auf Mikrohämaturie, welcher sehr unspezifisch ist. Die Diagnose erfolgt mit Hilfe von Sonografie, Urinzytologie und Zystoskopie.

Ausschließlich diese Verfahren eignen sich zur Verlaufskontrolle und Nachsorge bei Patienten mit bekanntem Blasenkarzinom. Aufgrund der Invasivität dieser Maßnahmen und der Rezidivneigung dieses Tumors besteht hier besonderer Bedarf an einem geeigneten Biomarker. Der Urinzytologie allein mangelt es an einer ausreichend hohen Sensitivität. Hier gibt es den Ansatz diese Untersuchung mit einer Immunfluoreszenz zu kombinieren. Befriedigende Ergebnisse gibt es jedoch noch keine (Feil et al., 2003). Einem anderen Verfahren wie z.B. die Bestimmung des nukleären Matrixproteins 22 (NMP22) fehlt es an Spezifität (Glas et al., 2003).

Marker	Testsystem	Sensitivität (%)	Spezifität (%)
Zytologie	Mikroskopie	11-76	>90
Hämaturietest	Streifentest	50-90	Niedrig
BTA-stat	Schnelltest	36-89	50-70
BTA-TRAK	Sandwich, ELISA	57-83	50-90
NMP22	Sandwich, ELISA oder Schnelltest	47-100	55-80
BLCA-4	ELISA	>90	>90
Survivin	Dot-Blot-Immun-Assay	42,5-100	87-100
UBC	Sandwich, ELISA oder Schnelltest	36-79	88-92
Cytokeratin 20	RT-PCR	82-87	55-70
CYFRA 21-1	Immunradiometrie oder Elektrochemilumineszenz	75-97	67-71
HA-HAase	ELISA-like-Assay	88-94	84
Mikrosatellitenanalyse	Genomische PCR	72-97	80-100
Telomerase	TRAP Assay oder RT-PCR	70-95	60-70
Immunozyt	Immunozytochie	38-90	75-90
FDP	Immunassay	52-81	68-91
UroVysion	FISH	68-87	>90

Tabelle 5: Derzeitige Biomarker für Erkennung und Nachsorge des BCA (Lokeshwar et al., 2006)

Zudem erwähnenswert ist die Analyse des s.g. Methylierungsmusters der zirkulierenden zell-freien genomischen DNA. Bei der Methylierung handelt es sich um einen physiologischen Vorgang, der der Inaktivierung eines Gens dient. Handelt es sich dabei um ein Tumorsuppressorgen, so kann dies zur Karzinogenese beitragen. Für bestimmte Gene konnten mit einer Sensitivität von 80 % und einer Spezifität von 93 % Patienten mit Blasenkarzinom im Vergleich zu Patienten mit Benigner Prostatatahyperplasie erkannt werden (Ellinger et al., 2008c).

1.3. Nierenzellkarzinom

1.3.1. Epidemiologie

Epidemiologisch werden zu den Tumoren der Niere auch die Karzinome des Nierenbeckens und der Harnleiter dazu gezählt, wobei die letzteren in etwa 10 % der Fälle der Gesamtzahl ausmachen. 85 % der folgenden Fälle sind dem Nierenzellkarzinom zuzuschreiben. Im Jahr 2006 waren Nierentumore die zehnt häufigsten Tumore beider Geschlechter in Europa (Ferlay et al., 2007). In Deutschland betrug im selben Jahr die Zahl der Neuerkrankungen bei Männern 10.050 und 6.440 bei Frauen. Dies macht einen Anteil von 4,4 % aller Tumore bei Männern und 3,3 % bei den Frauen. Bei den Krebstoden liegt der Anteil der Nierentumore bei 3,6 % bei Männern und 2,7 % bei Frauen. Die 5-Jahres-Überlebensrate liegt zwischen 65 % und 75 %. Die weltweite Inzidenz liegt bei 208.000. Das entspricht 1,9 % aller Krebserkrankungen. Die Mortalität ist bei 102.000 (Parkin et al., 2005).

1.3.2. Risikofaktoren

Beim Nierenzellkarzinom gibt es keine stark ausgeprägten Risikofaktoren. Eine Rolle spielt die Lebensführung. Dazu zählen Tabakkonsum und Fettleibigkeit (Lipworth et al., 2006; Bergstrom et al., 2001; Pischon et al., 2006; Weikert et al., 2008). Das Risiko selbst zu erkranken steigt signifikant, wenn ein Verwandter ersten Grades erkrankt (Clague et al., 2009; Gudbjartsson et al., 2002).

1.3.3. Histopathologische Klassifikation

Tumor	T 1	Tumor ≤ 7 cm, begrenzt auf die Niere
	T 2	Tumor > 7 cm, begrenzt auf die Niere
	T 3a	Tumor infiltriert die perirenale Fettkapsel oder Nebenniere, Gerota-Faszie intakt
	T 3b	Tumorausdehnung in die Nierenvenen oder in die V. cava infradiaphragmal
	T 3c	Tumorausdehnung in die V. cava supradiaphragmal
Nodi lymphatici	N 0	Keine Lymphknotenmetastasen vorhanden
	N 1	Metastasen in einem Lymphknoten, < 2 cm
	N 2	Metastasen in mehr als einem Lymphknoten, > 2 cm bis 5 cm
	N 3	Metastasen in mehr als einem Lymphknoten, > 5 cm
Metastase	M 0	Keine Fernmetastasen vorhanden
	M 1	Fernmetastasen vorhanden

Tabelle 6: TNM-Klassifikation beim Nierenzellkarzinom der UICC von 2002

Das T-Stadium beschreibt die lokale Ausbreitung des Tumors; das N-Stadium beschreibt den Befall der Lymphknoten; das M-Stadium zeigt die Bildung von Tochtergeschwüren.

Im Jahr 2010 wurde für das Nierenzellkarzinom eine neue TNM-Klassifikation eingeführt. Da diese Arbeit 2009 entstanden ist, konnte diese nicht berücksichtigt werden.

Grading	G 1	Hoch differenziert
	G 2	Mäßig differenziert
	G 3	Niedrig differenziert
	G 4	Undifferenziert

Tabelle 7: Einteilung des histopathologischen Differenzierungsgrades des RCC der UICC von 2002

1.3.4. Tumormarker und Diagnostik

Bei den malignen Nierentumoren allgemein und beim Nierenzellkarzinom im Speziellen steht zur Zeit kein Tumormarker für die klinische Routine zur Verfügung. So gibt es weder einen Biomarker zur Primärdiagnose, noch einen zur Verlaufskontrolle des Nierenzellkarzinoms. An Laborparametern stehen lediglich allgemeine Hinweise auf einen Tumor zur Verfügung, so z.B. eine Erhöhung von Blutsenkungsgeschwindigkeit und dem Akute-Phase-Protein C-reaktives Protein (Srigley et al., 1997; Atzpodien et al., 2003). Die Diagnose erfolgt durch bildgebende Verfahren wie Sonografie und CT.

1.4. Zirkulierende DNA

Zellfreie, im Plasma zirkulierende DNA (Desoxyribonukleinsäure) wurde 1948 erstmals im Serum/Plasma nachgewiesen (Mandel P et al., 1948). Lange Zeit war die Bedeutung dieser Entdeckung unklar. 1977 konnte gezeigt werden, dass diese frei zirkulierende DNA tumorspezifische Veränderungen enthält (Leon et al., 1977). Zu diesen Veränderungen gehören Mutationen, Translokationen, Mikrosatelliten-Alterationen und CpG-Insel-Hypermethylierungen (Anker et al., 1999). Es wird daher angenommen, dass die frei zirkulierende DNA im Serum/Plasma zumindest teilweise aus Tumorzellen in die Blutbahn gelangt. Die genauen Ursachen hierfür sind unbekannt. Es wird vermutet, dass das Tumorwachstum zur Hypoxie in gefäßfernen Abschnitten des Tumors führt. Vermutlich kommt es zu Apoptose und/oder Nekrose von Tumorzellen, und in der Folge zur Freisetzung von DNA in die Blutzirkulation (Jahr et al. 2001). Im Blut werden frei zirkulierende DNA-Fragmente durch Desoxyribonukleasen abgebaut (Wang et al., 2003), so dass die im Serum zirkulierende DNA stark fragmentiert ist. Gelelektrophorese-Muster zeigen, dass im Serum/Plasma von Tumorpatienten insbesondere kleine DNA-Fragmente von ca. 100–200 Bp Größe häufiger vorkommen als bei gesunden Kontrollprobanden. In beiden Gruppen wurden größere DNA-Fragmente in annähernd gleicher Menge detektiert. Die DNA-Integrität bezeichnet das Verhältnis zwischen großem und kleinem Fragment und ist also im Serum von Tumorpatienten vermindert (Wu et al., 2002).

Neben diesen qualitativen Veränderungen der frei zirkulierenden DNA sind auch quantitative Unterschiede zwischen Tumorpatienten und Gesunden bzw. Patienten mit nichtmalignen Erkrankungen nachweisbar: Patienten mit Tumorerkrankungen haben ca. 4-10fach erhöhte Mengen freier DNA im Serum/Plasma (Wu et al., 2002).

Im Blut frei zirkulierende DNA teilt sich in zwei verschiedene Gruppen auf. DNA genomischen Ursprungs (gDNA) und mitochondriale DNA (mtDNA). Die gDNA ist die DNA des Zellkerns. Sie liegt in zweifacher Ausführung – Strang und Gegenstrang – in einer Doppelhelix vor. Im Zellkern bildet sie gemeinsam mit den ihr anliegenden Proteinen das s.g. Chromatin. Hierbei liegt die gDNA aufgrund des diploiden Chromosomensatzes in doppelter Ausführung, einerseits väterlichen andererseits mütterlichen Ursprungs, vor.

Zirkulierende mtDNA stammt aus den Mitochondrien. Die mtDNA unterscheidet sich deutlich von der gDNA des Zellkerns. Die mtDNA liegt ringförmig vor, wie es eigentlich typisch für Prokaryonten ist. Dies, zusammen mit einer für Zellorganellen ungewöhnlichen doppelten Membran und eigener mitochondrialen Ribosomen, hat zur s.g. Endosymbiontenhypothese geführt. Danach stammen Mitochondrien von prokaryoten Zellen ab, die kernhaltige Zellen aufgenommen worden sind und im Verlauf ihre Autonomie verloren haben. In jedem Mitochondrium liegt eine Kopie des mtDNA-Rings vor. Dieser besteht aus 16.569 Basenpaaren. Im Vergleich zur gDNA, ca. 3×10^9 Bp, eine verschwindend geringe Zahl. Da in jeder Zelle hunderte, in Eizellen tausende, Mitochondrien sind, erhöht sich die Gesamtmenge der mtDNA entsprechend. In jeder kernhaltigen Zelle stehen damit den beiden Kopien der gDNA hunderte Kopien der mtDNA gegenüber (Chiu et al., 2003; Lam et al., 2004; Mehra et al., 2007; Zachariah et al., 2008). Die mtDNA kodiert 2 rRNA für die mitochondrialen Ribosomen, 22 tRNA, die für die mitochondriale Proteinbiosynthese benötigt werden und die Information für 13 Gene für Membranproteine. Zu diesen Membranproteinen gehören auch Teile der Enzymkomplexe I, III und IV der Atmungskette.

Bei Patienten mit Prostatakarzinom konnte gezeigt werden, dass die Menge von gDNA und mtDNA im Serum nicht korreliert. Als Erklärung dafür kommen unterschiedliche pathophysiologische Mechanismen bei der Freisetzung, der Zirkulation oder des Abbaus in Frage (Mehra et al., 2007). Im Serum liegt die gDNA meist ungebunden vor. Die mtDNA hingegen liegt sowohl freizirkulierend als auch Partikelgebunden vor. Die Größe dieser Partikel kann variieren, deren Funktion und Herkunft ist jedoch nicht geklärt (Chiu et al., 2003).

1.4.1. Diagnostische und prognostische Relevanz

Mittlerweile ist das Wissen um die zirkulierende DNA weitaus detaillierter. Die Konzentration im Serum/Plasma ist nicht nur Gesunden gegenüber erhöht, sondern auch gegenüber Patienten mit nicht-malignen Krankheiten. Beispiele an urologischen Tumoren dafür sind das Prostatakarzinom (Chun et al., 2006; Bastian et al., 2007; Ellinger et al., 2008b; Altimari et al., 2008; Ellinger et al., 2009c), das Blasenkarzinom (Ellinger et al., 2008c) und das Hodenkarzinom (Ellinger et al., 2009a). Beispiele für andere Krebsentitäten sind das Kolonkarzinom (Schwarzenbach et al., 2008), das Mammakarzinom (Kohler et al., 2009) und das Bronchialkarzinom (Yoon et al., 2009).

Neben der rein quantitativen Bestimmung der zirkulierenden DNA kann man sich auch deren Fragmentierung anschauen. Eine höhere Rate von großen DNA Bruchstücken, also einem Hinweis für einen nekrotischen Ursprung, findet sich beim Mammakarzinom (Umetani et al., 2006c; Wang et al., 2003), beim Kolonkarzinom (Umetani et al., 2006a) und beim Ovarialkarzinom (Wang et al., 2003). Andererseits kann bei Patienten mit anderen Tumorarten auch eine kleinere Fragmentierung, ein Hinweis auf einen apoptotischen Ursprung, gefunden werden. Dies war bisher beim Hoden- (Ellinger et al., 2009a), Prostata- (Ellinger et al. 2008a) und Blasenkarzinom (Ellinger et al., 2008d) der Fall.

Bei der Apoptose bzw. der Nekrose handelt es sich um unterschiedliche Formen des Zelltodes. Die Apoptose wird auch als programmierter Zelltod bezeichnet. Eine Unterscheidung beider Arten besteht darin, dass es bei der Nekrose zu einem frühen Funktionsverlust der Zellmembran und damit zu einem Einstrom von extrazellulärer Ionen und Flüssigkeit kommt. Morphologisch entsteht hierdurch eine Schwellung der Zelle. Im Gegensatz dazu bleibt bei der energieabhängigen Apoptose die Zellmembran lange intakt während intrazelluläre Organellen bereits enzymatisch abgebaut werden. Es folgt eine morphologische Schrumpfung. Im Rahmen des, während der Apoptose ablaufenden, enzymatischen Abbaus von Organellen wird unter anderem die DNA der Zelle durch Desoxyribonukleasen verdaut. Als Resultat steht am Ende die oben bereits erwähnten Fragmentierung der DNA. Im Gegensatz dazu kommt es bei der Nekrose auch zu einem nicht enzymatisch gesteuerten Zerfall von DNA. Dadurch entstehen auch größere Fragmente von mehr als 200 Bp Länge (Hotchkiss et al., 2009).

Im vorhergehenden Kapitel wurde die unterschiedliche Struktur von genomischer und mitochondrialer DNA besprochen. In der Literatur wurde die Frage, ob aufgrund dieser

strukturellen Unterschiede es zu einem unterschiedlichem Fragmentierungsmuster im Rahmen des Zelltodes kommt, noch nicht hinreichend untersucht.

Unter Berücksichtigung der erwähnten Unterschiede in der Größe der DNA-Fragmente nach dem Zelltod bietet es sich an eine weitere Messgröße einzuführen. Die s.g. DNA-Integrität ist der Quotient aus großen und kleinen DNA-Fragmenten. Es konnte ein Zusammenhang zwischen maligner Grunderkrankung und DNA-Integrität gezeigt werden (Umentani et al., 2006c; Mouliere et al., 2011).

1.5. Ziel dieser Arbeit

Es gibt eine Reihe von Gründen, die dafür sprechen, der Bedeutung von mtDNA als Biomarker weiter nachzugehen. Die hohe Anzahl gleicher mtDNA Kopien lässt eine Quantifizierung sehr kleiner Mengen an mtDNA im Blut zu. Weiter wurde schon beschrieben, dass sich mtDNA eignet, Tumorpatienten von gesunden Kontrollen zu unterscheiden. Dies war bereits beim Prostatakarzinom (Mehra et al., 2007), dem Hodenkrebs (Ellinger et al., 2009b), dem Ovarialkarzinom (Zachariah et al., 2008) und beim Brustkrebs (Kohler et al., 2009) möglich.

Darauf aufbauend soll diese Arbeit die Rolle der Konzentration zirkulierender mtDNA sowie der mtDNA-Integrität im Serum von Patienten mit urologischen Krebserkrankungen erforschen.

2. Material und Methoden

2.1. Materialien

2.1.1. Geräte

8-Kanal-Pipette (1-10 µl)	Biozym Scientific, Oldendorf, Deutschland
Einkanal-Pipetten Research (0,5 µl - 10 µl, 2 µl -20 µl, 10 µl - 100 µl, 20µ - 200 µl, 100µ - 1000 µl)	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
ABI Prism 7900 HT Sequence Detection System	Applied Biosystems, Foster City, California, USA
Absorptionsspektrometer Nanodrop ND - 1000	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Absauggerät Miniport KNF	Neuberger GmbH, Freiburg i. Br., Deutschland
Analysewaage BP 2100 S	Sartorius, Göttingen, Deutschland
Gel Dokumentationsanlage mit Kamera Classic Uno	Intas, Göttingen, Deutschland
Horizontalelektrophoresekammer Sub-cell GT Basic	Biorad Laboratories, Hercules, California, USA
Magna Rack, magnetischer Separator	Invitrogen, Paisley, Schottland
Mikrozentrifuge Sigma 1-15	Sigma-Aldrich, Seelze, Deutschland
Spannungsquelle PowerPac 100	Biorad Laboratories, Hercules, California, USA
Thermocycler UNO-Thermoblock	Biometra, Göttingen, Deutschland
Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Tischzentrifuge Universal 30 RF	Hettich Zentrifugen, Tuttlingen, Deutschland
Vortex-Genie 2	Scientific Industries, New York, USA

2.1.2. Labormaterial

Falcon Tubes (15 ml, 50 ml)	Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland
Pasteurpipetten aus Glas	Brand GmbH + Co KG, Wertheim, Deutschland
PCR-Tubes (0,2 ml)	ABGene, Epsom, England
Pipettenspitzen mit Filter (10 µl, 20 µl, 100 µl, 200 µl, 1000 µl)	Biozym Scientific, Oldendorf, Deutschland
Reaktionsgefäße aus Polypropylen (1,5 ml)	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Safe-Lock Tubes (0,5 ml, 1,5 ml, 2,0 ml)	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
S-Monovette Kanüle	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Thermo-Fast 384-Well-PCR Platten	ABGene, Epsom, UK
Latexhandschuhe DermaClean	Ansell LTD, Bangkok, Thailand
Monovette Gel 9ml	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland

2.1.3. Chemikalien

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Chemikalien wurden im höchsten erhältlichen Reinheitsgrad und in Analysequalität erworben. Ihre Lagerung erfolgt nach Herstellervorschriften.

Deionisiertes Wasser aus Reinstwassersystemanlage Milli-Q biocel	Millipore, Molsheim, Frankreich
Dekontaminationsmittel RNase AWAY	Molecular BioProducts, Inc., San Diego, USA
DEPC-Wasser	Ambicon, Austin, Texas, USA
DNA Längenstandard Track It 100 bp	Invitrogen, Paisley, Schottland
DNA ladder	
Ethanol absolut	VWR, Darmstadt, Deutschland
Ethylendinitrilotetraacetat (EDTA)	Sigma-Aldrich, Seelze, Deutschland
Fluoreszenzfarbstoff PicoGreen dsDNA Quantitation Reagent	Invitrogen, Paisley, Schottland
Tris-Hydrochlorid (Tris-HCL)	Fluka, Buchs, Schweiz

Phosphatpuffer PBS	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich
PCR-Wasser WATER	Sigma Chemical CO, Irvine, UK
Ultrapure 10xTBE-Buffer	Invitrogen, Paisley, Schottland

2.1.4. Kits

ChargeSwitch gDNA 1ml Serum Kit	Invitrogen, Paisley, Schottland
QIAamp DNA Mini Kit	QIAGEN GmbH, Hilden, Deutschland
SYBR GreenER qPCR SuperMix	Invitrogen, Paisley, Schottland
PicoGreen dsDNA Quantitation Kit	Invitrogen, Paisley, Schottland

2.1.5. Primer

mtDNA 79 Bp	Forward	5'-CAG-CCG-CTA-TTA-AAG-GTT-CG-3'
	Reverse	5'-CCT-GGA-TTA-CTC-CGG-TCT-GA-3'
mtDNA 230 Bp	Forward	5'-CAG-CCG-CTA-TTA-AAG-GTT-CG-3'
	Reverse	5'-GGG-CTC-TGC-CAT-CTT-AAC-AA-3'
mtDNA 490 Bp	Forward	5'-GGG-ATA-ACA-GCG-CAA-TCCTA-3'
	Reverse	5'-ATG-TTG-GGA-CCT-TTGCGT-AG-3'

Die Primer wurden von der Firma Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland) im Reinheitsgrad "desalted" synthetisiert. Es wurde mit Tris-EDTA-Puffer eine Stocklösung in der Konzentration 100pmol/µl hergestellt. Diese wird bei -20° C gelagert und zum Gebrauch auf eine Konzentration von 10 pmol/µl mit PCR-Wasser verdünnt.

2.1.6. Probenmaterial

Als Material für die Untersuchung dient Blutserum. Die Gewinnung der Proben erfolgt unter Berücksichtigung der revidierten Deklaration von Helsinki des Weltärztebundes aus dem Jahr 2000 sowie der geltenden gesetzlichen Vorgaben. Zuvor erteilte die Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Universität Bonn die Genehmigung, Lfd. Nr. 019/03, zur Durchführung der Untersuchung. Sämtliche Proben wurde im Rahmen der Biobank Initiative des

CIO Köln/Bonn in der Klinik und Poliklinik für Urologie und Kinderurologie des Universitätsklinikum Bonn gesammelt. Die in die Untersuchung eingeschleusten Patienten und gesunden Probanden gaben nach Aufklärung über Sinn und Zweck der Studie ihr schriftliches Einverständnis zur Teilnahme.

Die Blutproben wurden prospektiv von Patienten mit den in dieser Arbeit untersuchten urologischen Tumoren, Prostata-, Nierenzell- und Blasenkarzinom, im Zeitraum vom November 2006 bis Oktober 2007 abgenommen. Dies erfolgte nach stationärer Aufnahme vor Durchführung der operativen Therapie. Ausschlusskriterien dieser Arbeit waren das Vorliegen eines Zweitmalignoms in der Anamnese der Probanden sowie ein Alter jünger als 18 Jahre. Bei den 23 Patienten mit Prostatakarzinom erfolgte in allen Fällen eine radikale Prostatektomie. 84 Patienten litten an einem Blasenkarzinom; hier erhielten 74 eine transurethrale Resektion und 10 Patienten eine radikale Zystektomie. Von der 33 Patienten zählenden Gruppe mit Nierenzellkarzinom wurden 19 Nierenerhaltend operiert, 14 wurden Nephrektomiert. Histopathologisch lässt sich diese Gruppe noch weiter aufgliedern, 26 Patienten haben ein klarzelliges RCC, 5 ein papilläres RCC und 2 ein chromophobes RCC. Als Kontrollgruppe wurden Blutserumproben von 79 Gesunden gesammelt. Dies sind Angestellte des Universitätsklinikums Bonn ohne einen Hinweis auf eine maligne oder eine sonstige schwere Erkrankung in der Vergangenheit. Die klinisch-pathologischen Daten der Probanden sind in Tabelle 8 aufgelistet.

	RCC	BCA	PCA	GK
	n=33	n=84	n=23	n=79
Geschlecht: männlich /				
weiblich	27 / 6	61 / 23	23 / 0	39 / 40
Alter				
Spanne	31 - 80	38 - 94	54 - 75	18 - 60
Durchschnitt	64.8	71.8	66.8	31.5
Median	67.0	74.0	68.0	28.0
TNM-Stadium				
pT0		1		
pTa		45		
pT1	21	18		
pT2	1	12	16	
pT3	11	3	7	
pT4	0	1		
pTis		3		
Lymphknotenmetastasen	2	1	1	
Fernmetastasen	3	0	0	
Graduierung				
G1	4	15	1	
G2	27	38	17	
G3	2	30	5	
Gleason Score				
Gleason Score ≤ 6			15	
Gleason Score 7			4	
Gleason Score ≥ 8			4	

Tabelle 8: Klinisch-pathologische Daten des Patientenkollektivs, klinische Daten der Gesunden Kontrollen

RCC, Nierenzellkarzinom; BCA, Blasenkarzinom; PCA, Prostatakarzinom; GK, Gesunde Kontrollen

Sämtliche Patientenproben wurden einen Tag vor dem durchgeführten Eingriff mit einer Serum S-Monovette mit Gel und Gerinnungsaktivator (Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland) gesammelt. Nach Abnahme des Blutes wurde es zwischen 60 und 180 Minuten zur Gerinnung bei

Raumtemperatur gelagert. Anschließend wurden die Proben bei 1.800g für 10 Minuten mit der Tischzentrifuge Universal 30 RF (Hettich Zentrifugen, Tuttlingen, Deutschland) zentrifugiert. Der entstandene Serumüberstand wurde abpipettiert und bei - 80° C eingefroren und gelagert (Chan et al., 2005).

2.1.7. Software

MS Office 2007	Microsoft, Seattle, USA
Primer 3	Whitehead Institute for Biomedical Research, Cambridge, USA
SDS Software Version 2.2	Applied Biosystems, Foster City, USA
SPSS Version 11.5	SPSS Inc., Chicago, USA

2.2. Methoden

2.2.1. Aufreinigung des Blutserums und DNA-Isolation

Die Isolation der DNA aus dem Serum erfolgte eigens für diese Arbeit mit dem ChargeSwitch DNA Serum Kit (Invitrogen, Paisley, Schottland) nach Standardprotokoll. Das Kernstück dieser Methode sind kleine magnetische Kugeln in der Größenordnung eines Mikrometers, im Englischen „beads“ genannt. Diese sind auf ihrer Oberfläche derart beschichtet, dass sich ihre Ladung, in Abhängigkeit des umgebenden pH-Wertes, ändert. Bei einem niedrigen pH-Wert sind die Beads positiv geladen. So entsteht die Möglichkeit, negativ geladene Nukleinsäuren zu binden. Hebt man in weiteren Arbeitsschritten den pH-Wert wieder an, so wird diese Bindung aufgehoben und die Nukleinsäuren diffundieren ab. Die magnetische Eigenschaft der Beads ermöglicht eine einfache Trennung der über die Festphase gebundenen DNA von den umgebenden Lösungen.

Im Einzelnen läuft die Aufreinigung wie folgt ab:

Zur DNA-Isolation wird zunächst 1 ml des aufgetauten Serums mit 700 µl Lysispuffer und 30 µl Proteinase K versetzt und bei Raumtemperatur 20 Minuten lang inkubiert. Die Proteinase K dient hier der Beseitigung störender Proteine. Es folgt die Zugabe der Magnetbeads und 250 µl des Aufreinigungspuffers, der den pH-Wert unter 6,0 senkt und so die DNA-Bindung an die Magnetbeads ermöglicht. Nach Positionierung der Eppendorfcups in den Separator werden die Beads an

die Rückwand des Gefäßes gezogen und dort durch einen Magneten festgehalten. Die Lösung wird abgesaugt und verworfen. Zur Beseitigung von Kontaminationen schließen sich zwei Waschschrte mit jeweils 1000 µl Waschpuffer an. Hiernach folgt die Freisetzung der DNA von den Beads durch Zugabe von 50 µl Elutionspuffer, der den pH-Wert auf 8,5 anhebt. Nach einer Inkubationszeit von mindestens einer Minute erfolgt die Trennung der Beads im Separator. Die im Elutionspuffer gelöste DNA wird in ein separates Reaktionsgefäß überführt und bis zur Weiterverarbeitung bei -20°C gelagert.

Bei dem oben beschriebenen Verfahren handelt es sich um ein etabliertes und gängiges Verfahren zur Aufreinigung und Isolation von DNA aus Blutserum (Palecek et al., 2007).

2.2.2. Herstellung der Messstandardreihe

Um eine spätere quantitative Analyse der PCR-Produkte zu ermöglichen ist es notwendig, eine Standardmessreihe herzustellen. Dazu wurde s.g. White Buffy Coat DNA einer gesunden Probandin mit dem QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN GmbH, Hilden, Deutschland) isoliert. Mit einer PCR wurde eine Sequenz amplifiziert, die so gewählt ist, dass beide Amplicons der Primer mtDNA 79 Bp und mtDNA 230 Bp innerhalb des Amplikons liegen. Dieser Primer wird mtDNA 490 Bp genannt. Im nächsten Schritt wurde das entstandene PCR Produkt mit dem PureLink Genomic DNA Mini Kit (Invitrogen, Paisley, Schottland) nach Standardprotokoll aufgereinigt. So ist sichergestellt, dass bei der folgenden Quantifizierung keine Interferenzen durch andere Nukleotide stattfinden können. Zur Konzentrationsbestimmung wurde das PicoGreen dsDNA Quantitation Kit (Invitrogen, Paisley, Schottland) verwendet. Mit dem nun gewonnenen Material mit bekannter Konzentration wurde eine Verdünnungsreihe angelegt. Dieses Verfahren wurde bereits zuvor beschrieben (Ellinger et al., 2008e). Das Ausgangsmaterial für die Verdünnungsreihe wurde von Doris Schmidt, Klinik und Poliklinik für Urologie des Universitätsklinikums Bonn hergestellt und für diese Arbeit zur Verfügung gestellt.

Die bei der unten beschriebenen PCR gewonnenen Ergebnisse werden in Gewicht des Produkts pro ml Substrat angegeben. Von Interesse für diese Arbeit ist jedoch die Angabe pro ml Serum. Um dies ineinander zu überführen ist folgende Rechnung nötig. Wie in Kapitel 2.2.1. beschrieben wird die DNA aus 1 ml Serum zum Schluss der Aufreinigung in 50 µl Elutionspuffer gelöst. D.h. die im Elutionspuffer gelöste DNA wurde im Vergleich zum Serum 20fach konzentriert. Um dies zu berücksichtigen müssen die Ergebnisse aus der PCR mit dem Faktor 0,05 multipliziert werden.

2.2.3. Primerdesign

Es wurden zwei Primerpaare ausgewählt, die an der Transkription der mitochondrialen 16s-rRNA beteiligt sind. Die Amplikongröße wurde einerseits mit 79 Bp so gewählt, dass eine Quantifikation aller zirkulierenden mtDNA möglich ist, unabhängig eines apoptotischen oder nekrotischen Ursprungs; andererseits mit einer Amplikonlänge von 230 Bp DNA für nicht-apoptotischen Ursprungs. Die Sequenzsuche erfolgte über die Datenbank des National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine, Bethesda, USA. Als Software für das Design diente die Software Primer 3 (Whitehead Institute for Biomedical Research, Cambridge, USA). Eine genaue Beschreibung findet sich in einer vorhergehenden Veröffentlichung der Arbeitsgruppe (Ellinger et al., 2009b).

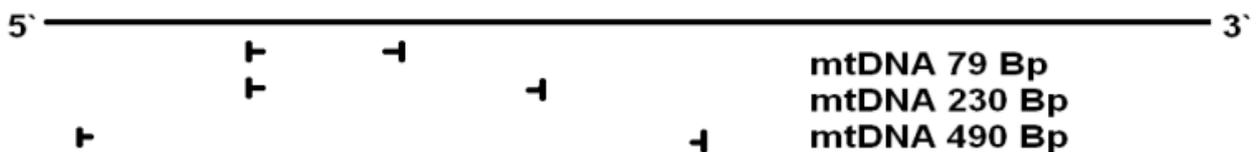


Abbildung 2: Schematische Darstellung der Primeramplikons

Das Amplikon von mtDNA 490 Bp schließt die Amplikons von mtDNA 79 Bp und mtDNA 230 Bp mit ein.

2.2.4. Quantitative Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ist ein Mitte der 1980er Jahre von Kary Mullis u.M. entwickeltes Verfahren zur Vervielfältigung einer bestimmten DNA-Sequenz. Für die Entwicklung der PCR erhielt Mullis im Jahre 1993 den Nobelpreis für Chemie.

Zur Durchführung der PCR werden Primerpaare benötigt, d.h. Oligonukleotidsequenzen, die die zu amplifizierende DNA-Sequenz flankieren; sie lagern sich komplementär zur entsprechenden Sequenz des zu kopierenden Stranges an und bilden den Startpunkt für das eingesetzte DNA-synthetisierende Enzym, die hitzestabile DNA-Polymerase. Weiterhin werden als Bausteine für die DNA-Synthese Desoxyribonukleotidtriphosphate benötigt.

Die Reaktion wird über zyklische Veränderungen der Reaktionstemperatur gesteuert. Der erste Arbeitsschritt der PCR erfolgt mit der Erhitzung auf 95°C. Dieser dient der Denaturierung des DNA-Doppelstranges, d.h. zur Aufschmelzung in die beiden Einzelstränge. Anschließend wird

die Temperatur abgesenkt, um den Primern die Möglichkeit zu geben, komplementär an die entsprechenden Sequenzen der DNA-Mutterstränge zu binden (Annealing), und schließlich erfolgt die Einstellung nah am Temperaturoptimum der DNA-Polymerase, um eine möglichst suffiziente Verlängerung (Elongation) des neuen DNA-Stranges zu gewährleisten. Die zum Annealing notwendige Temperatur ist abhängig von der Schmelztemperatur der Primer und sollte knapp darunter liegen, um eine stabile Bindung an die komplementären Sequenzen zu ermöglichen, jedoch unbeabsichtigte weniger stabile Bindungen an ähnliche Sequenzen zu verhindern. Ist ein solcher Zyklus abgeschlossen, schließt sich der folgende direkt an mit dem gleichen Ablauf aus Denaturierung, Annealing und Elongation. Im Optimalfall wird die im Reaktionsansatz vorhandene DNA-Menge binnen eines Zyklus jeweils verdoppelt, so dass sich die Menge amplifizierter DNA (D_1) in Abhängigkeit von der ursprünglichen Menge (D_0) und der Zahl durchlaufender Zyklen (Z) ergibt als $D_1 = D_0 * x^2 * z$.

Die quantitative Real-Time PCR stellt eine Weiterentwicklung der ursprünglichen PCR dar (Higuchi et al., 1992). Hierbei wird ein Farbstoff eingesetzt, der an doppelsträngige DNA bindet und in Abhängigkeit von dieser Bindung ein Fluoreszenzsignal aussendet, das detektiert wird. Auf diese Weise kann die vorliegende DNA quantifiziert werden. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wird der Farbstoff SYBR Green verwendet. Die Höhe des Fluoreszenzsignals korreliert jeweils mit der vorhandenen DNA Menge. Es wird nach jedem Zyklus der Reaktion registriert und in seinem Verlauf graphisch dargestellt. Während der ersten Zyklen zu Beginn der PCR ist das Signal noch schwach und kann nicht gegenüber dem unspezifischen Hintergrund abgegrenzt werden; mit steigender Menge des Produkts überschreitet es jedoch einen gewissen Schwellenwert der Fluoreszenz und setzt sich so von den störenden Hintergrundsignalen ab. Als Ct- Wert wird die Zahl der Zyklen bezeichnet, die benötigt werden, bis das Signal erstmals die Hintergrund-Fluoreszenz übersteigt. Anfangs nimmt es exponentiell zu und repräsentiert damit den gleichzeitig exponentiell stattfindenden Zuwachs an DNA-Menge; später verlangsamt sich die Zunahme jedoch und sistiert zum Schluss, was auf den Verbrauch einer oder mehrerer Komponenten der Reaktion (Primer, Nukleotide etc.) zurückzuführen ist.

Eine Komplikation der PCR stellt die Bildung sogenannter Primer-Dimere dar, indem sich komplementäre Primerstücke aneinanderlagern. Die Dimere werden ebenfalls vom Fluoreszenzfarbstoff als doppelsträngige DNA erkannt und es resultiert somit ein Signal, das das Vorhandensein eines PCR-Produktes vortäuscht. Um diesen Effekt zu erkennen, erfolgt nach abgeschlossener PCR, d.h. nach einer definierten Anzahl von Zyklen, die Schmelzkurvenanalyse des PCR-Produkts. Hierzu wird die Temperatur im Reaktionsgemisch kontinuierlich erhöht und gleich-

zeitig das entstehende Fluoreszenzsignal registriert. Dieses nimmt mit zunehmender Temperatur aus physikalischen Gründen langsam kontinuierlich ab, bis der Punkt erreicht ist, an dem der DNA-Doppelstrang des Produkts in seine beiden Einzelstränge zerfällt. Die zugehörige Temperatur wird als Schmelztemperatur bezeichnet. Sie ist spezifisch für einen bestimmten DNA-Strang in Abhängigkeit von dessen Länge und Basenzusammensetzung. Bei Überschreitung der Schmelztemperatur nimmt das Fluoreszenzsignal entsprechend der Freisetzung des Farbstoffes abrupt ab. Die Schmelztemperatur kann somit durch den Verlauf des Signals bestimmt werden. Primerdimere haben typischerweise aufgrund ihrer geringeren Länge als das gewünschte PCR-Produkt einen deutlich niedrigeren Schmelzpunkt als dieses und können damit erkannt werden. Die Quantifizierung der in einer Probe vorhandenen DNA ist mit Hilfe einer Standardverdünnungsreihe möglich. Eine Probe definierter DNA-Konzentration wird hierfür in festgelegten Schritten verdünnt und von jeder Verdünnungsstufe erfolgt die Amplifikation per Real-Time PCR. Anschließend werden die resultierenden Ct-Werte der Verdünnungen gegen die jeweiligen Konzentrationen graphisch aufgetragen und per linearer Regression eine Standardgerade erstellt; mit Hilfe der Geradengleichung kann anschließend anhand des Ct-Wertes auf die DNA-Konzentration einer zu untersuchenden Probe geschlossen werden.

Zur Durchführung der PCR wird im Rahmen der vorliegenden Arbeit ein ABI Prism 7900 HT Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, California, USA) verwendet. Der Reaktionsansatz wird auf 384-Well-Platten mit einem Probenvolumen von 10 µl je Well aufgetragen. Für jede Probe erfolgt eine Dreifachbestimmung, d.h. je drei Wells erhalten Probenmaterial eines Probanden. Der Reaktionsansatz pro Well besteht aus 0,7 µl der wie oben beschrieben hergestellten Probe, je 0,3µl der Lösung von Forward und Reverse Primer entsprechend 3,3 pmol jedes Primers, sowie 5 µl qPCR SuperMix und 3,7 µl PCR-Wasser. Auf jede Platte werden außer den eigentlichen Proben noch die Standardverdünnungen und eine Negativkontrolle aus PCR-Wasser aufgetragen.

Die Programmierung des PCR-Gerätes geschieht entsprechend des folgenden PCR-Protokolls:

- Schritt 1 - Aktivierung der DNA-Polymerase: 95°C über 15 min
- Schritt 2 - die folgenden Schritte 2a und 2b werden zyklisch 40-mal wiederholt
 - 2a Denaturierung bei 95°C über 15 sec
 - 2b Annealing und Elongation bei 60°C über 60 sec
- Schritt 3 - Schmelzkurvenanalyse

2.2.5. mtDNA Quantifizierung

Die in den untersuchten Proben vorhandene mtDNA-Konzentration wird entsprechend dem oben dargestellten Verfahren anhand der Verdünnungsreihe automatisch mit Hilfe der Software SDS 2.2 (Applied Biosystems, Foster City, USA) ermittelt.

Das Fragmentierungsmuster der mtDNA wird als mtDNA-Integrität bezeichnet. Sie wird berechnet aus dem Quotienten der ermittelten Konzentrationen von mtDNA 230 Bp / mtDNA 79 Bp. Der Hintergrund dieses Fragmentierungsmusters ist die Tatsache, dass anhand der Größe eines DNA-Fragmentes eine Aussage über dessen Herkunft getroffen werden kann. Im Rahmen der Apoptose, also des kontrollierten und physiologischen Zelltodes, entstehen DNA-Fragmente von ca. 200 Bp Größe. Bei einem nekrotischen Zerfall einer Zelle liegt die Größe bei über 400 Bp-10000 Bp (Jahr et al., 2001). Aus dem Quotient der Konzentrationen der Amplikon ist ein indirekter Rückschluss auf die Herkunft der mtDNA möglich: Ein niedriger Quotient lässt auf Apoptose als zugrunde liegenden Zelltod-Mechanismus schließen.

2.2.6. Statistische Auswertung

Für die Korrelation von mtDNA- Konzentration bzw. der Integrität der mtDNA mit dem Alter der Probanden wird der Spearman-Rho-Test benutzt. Der Chi-Quadrat-Test wird zur Bestimmung der Unterschiede der mtDNA-Konzentration der Geschlechter eingesetzt. Den untersuchten Daten entsprechend, wird der Mann-Whitney- oder der Kruskal-Wallis-Test, zur Bewertung der Unterschiede der mtDNA-Konzentration zwischen Gesundkontrollen und Tumorpatienten verwendet. Beide Tests wurden ebenfalls zur Berechnung der Korrelation von mtDNA- Konzentration und klinisch-pathologischen Daten der Tumorpatienten benutzt. Die Qualität eines Tumormarkers zeichnet sich durch eine hohe diagnostische Sensitivität und Spezifität aus. Um diese zu errechnen, wird eine s.g. Receiver Operator Characteristic Analyse (ROC-Analyse) gemacht. Mit Hilfe der ROC Analyse ist es möglich die gewonnenen Daten auf Ihre Aussagekraft zu prüfen. Untersucht wird einerseits die s.g. Sensitivität. Diese bezeichnet die Genauigkeit in %, mit der das untersuchte Merkmal einer Probe als solches erkannt wird. Auf den hier medizinischen Sachverhalt bezogen ist die Sensitivität die bedingte Wahrscheinlichkeit, dass der Test bei einer erkrankten Person richtig (also positiv) reagiert. Andererseits beschreibt die Spezifität die Genauigkeit, mit der das untersuchte Merkmal einer Probe als negativ erkannt wird.

In der Medizin ist das die bedingte Wahrscheinlichkeit, dass eine nicht-erkrankte Person ein richtiges (also negatives) Testergebnis hat. Um diese Aussagen treffen zu können, ist es notwendig zwei von einander unterscheidbare Merkmale zu definieren, z.B. Merkmal A = Gesund und Merkmal B = Tumorpatient. Jedem Merkmal wird ein bestimmter Bereich von möglichen Messwerten zugeteilt, welche bei einem definierten Grenzwert voneinander abgegrenzt werden. In dem Falle dieser Arbeit sind die Messwerte von Konzentrationen der mtDNA Fragmente bzw. deren Quotient im Falle der mtDNA-Integrität. Der Grenzwert wird so gewählt, dass ein s.g. Konfidenzintervall von 95% entsteht. Hintergrund ist der, dass der gesuchte Wert des Merkmals nicht bekannt ist. Durch die Durchführung einer Stichprobe, in diesem Fall die Messung der mtDNA-Konzentration, versucht man dem wirklichen Wert möglichst nahe zu kommen. Da jedoch eine Stichprobe mit begrenzter Zahl den Messwert nicht tatsächlich abbilden kann, wird mit Hilfe des Konfidenzintervalls ein Hilfskonstrukt herangezogen. Ein Konfidenzintervall ist ein Bereich von Messwerten von dem man hofft, dass das gesuchte Merkmal damit erfasst wird. Er wird anhand der gemessenen Werte der Stichprobe definiert. Durch die Tatsache, dass eine Stichprobe möglicherweise nicht die Wirklichkeit abbildet besteht auch die Möglichkeit, dass das Konfidenzintervall nicht richtig liegt und den gesuchten Messwert nicht enthält. Diese Fehlerwahrscheinlichkeit wird vor der Definition des Konfidenzintervalls festgelegt. Üblicherweise liegt der Wert bei 5%. Dies bedeutet dass eine Fehlerwahrscheinlichkeit von 5% für die Erkennung eines Merkmals, bei der Wahl der Grenzwerte, akzeptiert wird. Zudem wird als Qualitätsmaß die s.g. area under curve (AUC) benutzt. Die AUC ist die errechnete Größe der Fläche unter der ROC Kurve und beschreibt den Zusammenhang zweier Ereignisse bzw. zweier Merkmale. Es sind Werte von 0 bis 1 möglich. Bei einem Wert von 0,5 ist der Zusammenhang rein zufällig. Nähert sich der Wert der 0 oder der 1 an, so steigt die Qualität des Zusammenhangs der beiden Merkmale. Zur Erläuterung: Bei der Auswertung der Messergebnisse dieser Arbeit ist es notwendig einen Trenn- oder Schwellenwert zu definieren, um eine Unterscheidung der Merkmalsausprägung Gesund/Tumorpatient zu treffen. Für jeden gewählten Schwellenwert erhält man unterschiedliche Werte für Spezifität und Sensitivität. Trägt man die Werte für die Sensitivität und die Werte an richtig Positiven (1-Spezifität) in ein Koordinatensystem ein erhält man die ROC-Kurve. Einerseits lässt sich mit Hilfe der ROC-Kurve ein optimaler Schwellenwert finden, andererseits können über die so ermittelte AUC konkurrierende Testverfahren einfach miteinander verglichen werden.

Alle statistischen Tests sind zweiseitig und wurden mit Hilfe der SPSS Software durchgeführt.

2.2.7 Ablauf des Arbeitsprozesses

Zunächst erfolgte entsprechend der Fragestellung das Primerdesign. Danach erfolgte die Herstellung der für die quantitativen Real-Time PCR notwendigen Verdünnungsreihe aus der Messstandardreihe. Hiernach erfolgte die eigentliche Analyse der Proben. Dazu erfolgte zunächst die Auswahl der Proben aus der für die Biobank Initiative gesammelten und bei -80°C lagernden 1 ml Serum-Aliquots. Diese wurden bei Raumtemperatur aufgetaut und im Anschluss wurde entsprechend die Isolation der DNA durchgeführt. Nach einer Zwischenlagerung bei -20°C erfolgte nun die eigentliche Analyse der Proben mittels der quantitativen Real-Time PCR. Die hieraus gewonnenen Quantität der vorhandenen mtDNA-Fragmente wurde abschließend mit den oben beschriebenen statistischen Tests weiter untersucht.

3. Ergebnisse

3.1. Korrelation von mtDNA Konzentration / mtDNA-Integrität mit Alter und Geschlecht

Die Krebspatienten waren signifikant älter als die gesunden Kontrollen ($p < 0.0001$). Das Durchschnittsalter der Patientengruppe betrug 69,3 Jahre, das der Kontrollgruppe betrug 31,5 Jahre. Darüberhinaus war der Anteil männlicher Probanden in der Gruppe der Krebspatienten signifikant höher (79 % vs. 49%; $p < 0,0001$).

Aufgrund des signifikanten Altersunterschieds und der unterschiedlichen Verteilung Männer/Frauen erfolgte eine Korrelation der mtDNA Konzentration und dem Alter bzw. dem Geschlecht für die Gruppe der Malignompatienten und der Kontrollen separat.

Bei den Tumorpatienten bestand keine Korrelation zwischen Alter und Konzentration der mtDNA Fragmente (mtDNA 79 Bp: $p=0,247$; mtDNA 230 Bp: $p=0,418$; mtDNA-Integrität: $p=0,346$); es bestand ebenfalls keine Korrelation mit dem Geschlecht (mtDNA 79 Bp: $p=0,349$; mtDNA 230 Bp: $p=0,548$; mtDNA-Integrität: $p=0,797$). In der Gruppe der Kontrollpatienten zeigte sich eine signifikant erhöhte Konzentration der mtDNA 79 Bp Fragmente bei männlichen Probanden: $0,49 \times 10^6$ Fragmente/ml vs. $0,35 \times 10^6$ Fragmente/ml ($p=0,027$). Die Konzentration der mtDNA 230 Bp Fragmente sowie der mtDNA-Integrität korrelierte mit dem Alter in der Kontrollgruppe ($p=0,024$, $r^2=0,254$; $p=0,042$; $r^2=0,230$).

Eine Übersicht über die beschriebenen Ergebnisse zeigt im folgenden Abbildung 3.

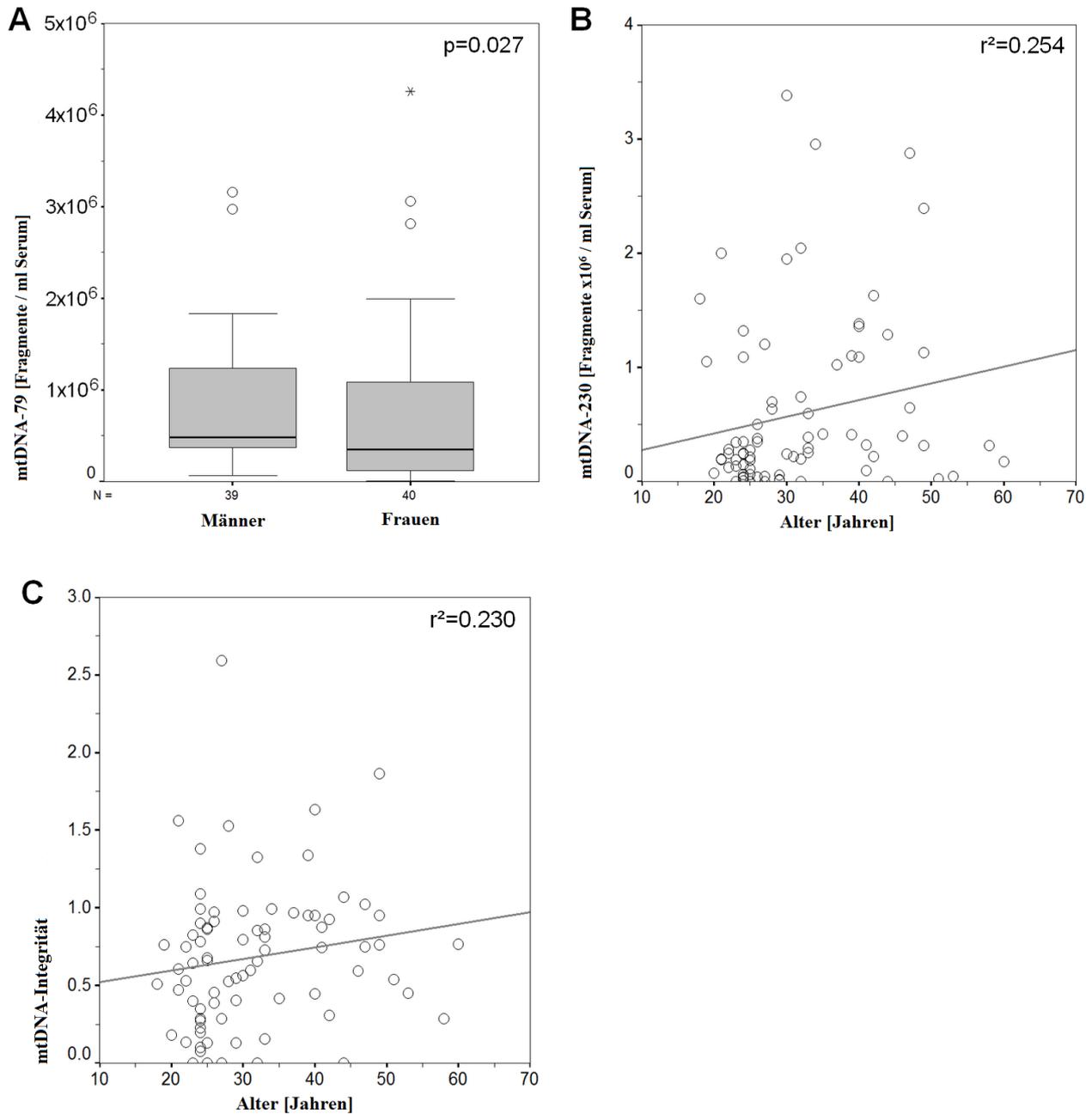


Abbildung 3: Korrelation von Alter, Geschlecht und Dignität mit mtDNA Konz. und mtDNA-Integrität

- A** Serum mtDNA 79 Bp Konz. ist bei Männern signifikant erhöht ($p=0,027$)
- B** mtDNA 230 Bp Konz. korreliert mit dem Alter in der Kontrollgruppe ($p=0,024$; $r^2=0,254$)
- C** mtDNA-Integrität korreliert mit dem Alter in der Kontrollgruppe ($p=0,042$; $r^2=0,230$)

3.2. Unterschiede der mtDNA Konzentration/Fragmentation bei Gesunden und Tumorpatienten

Es zeigte sich eine signifikante Erhöhung der Konzentration der beiden mtDNA-Fragmente sowie der mtDNA-Integrität bei den Tumorpatienten (alle: $p < 0,001$): die mediane Konzentration der mtDNA-79 Fragmente war $8,75 \times 10^6$ Fragmente/ml bei den Tumorpatienten und $0,43 \times 10^6$ Fragmente/ml bei der Kontrollgruppe, die der mtDNA-230 Fragmente bei $8,11 \times 10^6$ Fragmente/ml vs., $0,27 \times 10^6$ Fragmente/ml und die mtDNA-Integrität bei 0,852 vs 0,662.

Vergleicht man die Konzentrationen der einzelnen Tumorarten untereinander so erhält man folgendes Ergebnis. Der Median des mtDNA 79 Bp Fragments liegt beim Blasenkarzinom bei $9,54 \times 10^6$ /ml, beim Nierenzellkarzinom bei $6,69 \times 10^6$ /ml und beim Prostatakarzinom bei $4,48 \times 10^6$ /ml ($p=0,031$). Der Median des mtDNA 230 Bp Fragments liegt beim Blasenkarzinom bei $9,78 \times 10^6$ /ml, beim Nierenzellkarzinom bei $6,74 \times 10^6$ /ml und beim Prostatakarzinom bei $1,94 \times 10^6$ /ml ($p=0,004$). Der Median der mtDNA-Integrität liegt beim Blasenkarzinom bei 0,903, beim Nierenzellkarzinom bei 0,839 und schließlich beim Prostatakarzinom bei 0,590 ($p=0,009$). Eine Darstellung kann Abbildung 3 entnommen werden. Siehe auch Tabelle 9.

	GK	Tu (gesamt)	BCA	RCC	PCA
mtDNA 79 Bp	0,43	8,75	9,54	6,69	4,48
[$\times 10^6$ Fragmente /ml]					
mtDNA 230 Bp	0,27	8,11	9,78	6,74	1,94
[$\times 10^6$ Fragmente /ml]					
mtDNA-Integrität	0,662	0,852	0,903	0,839	0,59

Tabelle 9: Mediane der Konzentrationen bzw. des Quotienten der verschiedenen Probandengruppen

BCA, Blasenkarzinom; GK, Gesunde Kontrollen; PCA, Prostatakarzinom; RCC, Nierenzellkarzinom; Tu, Tumorpatienten

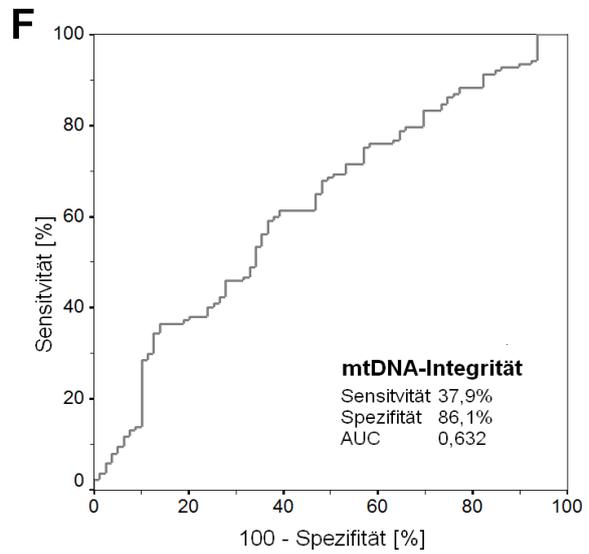
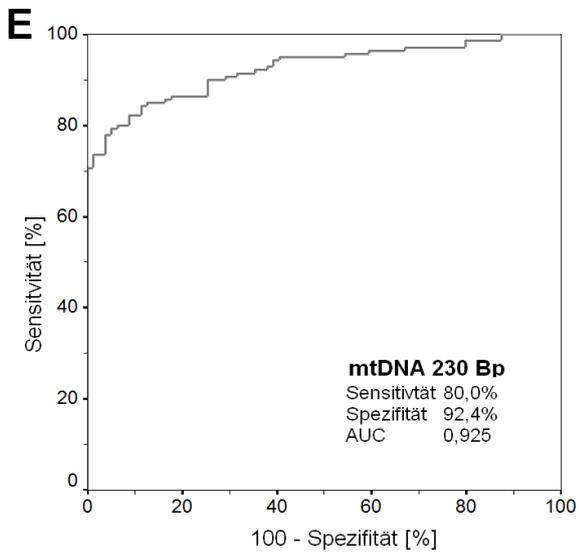
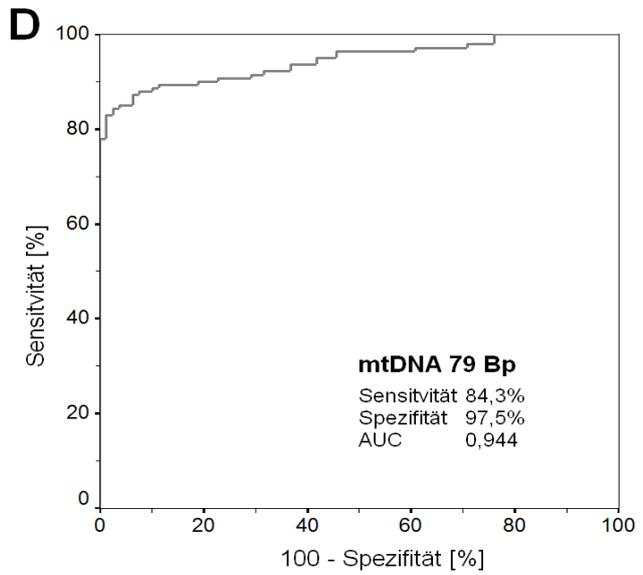
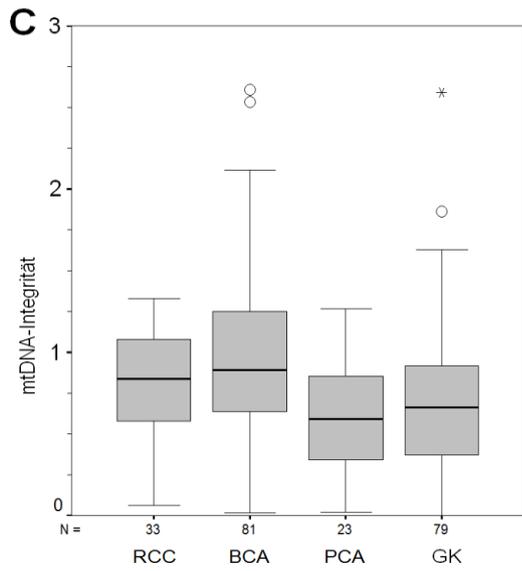
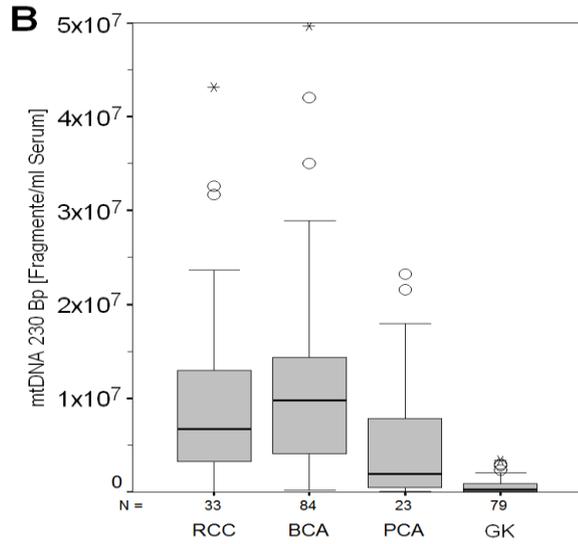
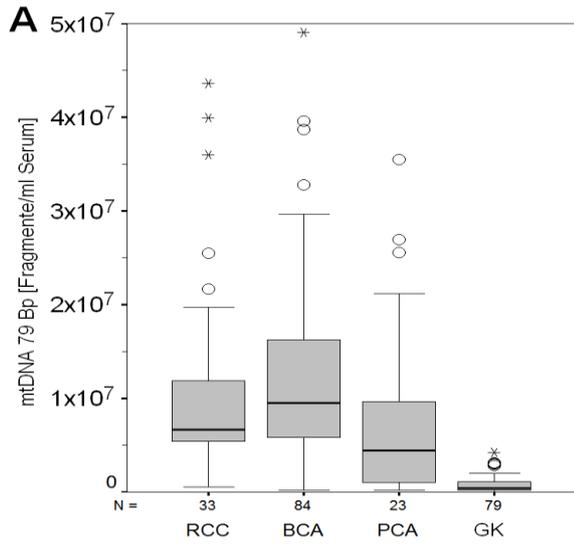


Abbildung 4: Grafische Darstellung der Ergebnisse für mtDNA Konz. (A, B) und mtDNA-Integrität (C); ROC Kurven von mtDNA 79 Bp (D), mtDNA 230 Bp (E) und mtDNA-Integrität (F) in der Gegenüberstellung von Gesund vs. Tumorpatienten.

Anhand der gewonnenen Ergebnisse zeigt sich, dass es mit Hilfe von mtDNA 79 BP, mtDNA 230 Bp und der mtDNA-Integrität möglich ist, Gesunde Kontrollen von Tumorpatienten zu unterscheiden. D, E, F zeigen die dazugehörigen ROC-Kurven; RCC, Nierenzellkarzinom; BCA, Blasenkarzinom; PCA, Prostatakarzinom; GK, Gesunde Kontrollen

Die Unterscheidung von Tumorpatienten und Gesunden war mit dem mtDNA 79 Bp Fragment mit einer Sensitivität von 84,3 % und Spezifität von 97,5 % möglich. Eine etwas geringere Sensitivität / Spezifität bestand für das mtDNA 230 Bp Fragment. Aufgrund der geringen Sensitivität (37,9 %) ist die mtDNA-Integrität nicht von diagnostischer Relevanz.

Es zeigte sich das die diagnostische Aussagekraft in den einzelnen Tumorentitäten unterschiedlich ist: Insbesondere dass RCC und das Blasenkarzinom konnten mittels der mtDNA Konzentration gut von den Kontrollen abgegrenzt werden (Sensitivität > 88 % und Spezifität > 95 %), wohingegen das Prostatakarzinom nur schlecht mittels mtDNA-Konzentrations-unterschieden erfasst werden kann (60,8 % Sensitivität und 98,7 % Spezifität mit mtDNA 79 Bp). Darüber hinaus kann die mtDNA-Integrität in keinem Falle gut zwischen den verschiedenen Merkmalen unterscheiden. Siehe Tabelle 10 und Abbildung 3.

mtDNA-79	Sensitivität	Spezifität	AUC (95%KI)	Grenzwert
Tumor vs. Gesund	84.3%	97.5%	0.944 (0.915-0.973)	3.07x10 ⁶ /ml
BCA vs. Gesund	88.1%	97.5%	0.961 (0.930-0.992)	3.07x10 ⁶ /ml
RCC vs. Gesund	90.9%	98.7%	0.969 (0.935-1.003)	3.47x10 ⁶ /ml
PCA vs. Gesund	60.8%	98.7%	0.847 (0.744-0.950)	3.19x10 ⁶ /ml
mtDNA-230	Sensitivität	Spezifität	AUC (95%KI)	Grenzwert
Tumor vs. Gesund	80.0%	92.4%	0.925 (0.891-0.959)	1.97x10 ⁶ /ml
BCA vs. Gesund	85.7%	96.2%	0.958 (0.930-0.986)	2.54x10 ⁶ /ml
RCC vs. Gesund	87.7%	94.9%	0.945 (0.887-1.003)	2.11x10 ⁶ /ml
PCA vs. Gesund	73.9%	70.9%	0.774 (0.654-0.895)	0.63x10 ⁶ /ml
mtDNA-Integrität	Sensitivität	Spezifität	AUC (95%KI)	Grenzwert
Tumor vs. Gesund	37.9%	86.1%	0.632 (0.556-0.708)	0.995
BCA vs. Gesund	45.2%	86.1%	0.674 (0.591-0.757)	0.995
RCC vs. Gesund	81.8%	43.0%	0.636 (0.529-0.743)	0.563
PCA vs. Gesund	100%	6.3%	0.474 (0.342-0.606)	0.010

Tabelle 10: Aussagekraft von mtDNA 79 Bp, mtDNA 230 Bp und mtDNA-Integrität

Die Aussagekraft in Form von Sensitivität und Spezifität von mtDNA 79 Bp, mtDNA 230 Bp und mtDNA-Integrität bezogen auf die verschiedenen Tumorarten; BCA, Blasenkarzinom; PCA, Prostatakarzinom; RCC, Nierenzellkarzinom; AUC, area under curve; 95%KI, 95% Konfidenz-Intervall

3.3. Korrelation mit klinisch-pathologischen Daten

3.3.1. Nierenzellkarzinom

Betrachtet man die Ausbreitung des Primarius beim Nierenzellkarzinom, so findet sich keine Korrelation mit der Konzentration der beiden mtDNA-Fragmente ($p > 0,39$). Bei der mtDNA-Integrität zeigt sich eine negative Korrelation, stellt man die Ausbreitungsstadien T1a und T1b den Stadien T2 und T3 gegenüber ($p = 0,034$). Es fand sich keine Korrelation von mtDNA-Konzentration/Integrität und Grading ($p > 0,15$).

Die Auswirkung der Metastasierung konnte aufgrund der niedrigen Fallzahlen nicht untersucht werden: Es gab nur zwei Patienten mit Lymphknotenbefall und nur drei mit Fernmetastasen.

Aufgrund der Fallzahlen der histologischen Untergruppen des Nierenzellkarzinoms, konnte keine

Analyse bezüglich deren Unterschiede gemacht werden (papilläres Nierenzellkarzinom, n = 5; chromophobes NCC, n = 2).

	mtDNA 79 Bp [p=]	mtDNA 230 Bp [p=]	mtDNA Integrität [p=]
T-Stadium	0,472	0,392	0,034
Grading	0,766	0,406	0,246

Tabelle 11: Korrelation klinisch-pathologischer Daten mit mtDNA Konzentrationen/Integrität beim RCC

Bei der mtDNA-Integrität und dem T-Stadium zeigt sich eine Korrelation, ansonsten bestehen keine Zusammenhänge.

3.3.2. Blasenkarzinom

Es bestand keine Korrelation von pT-Stadium und mtDNA Konzentration/Integrität ($p > 0,43$). Die mtDNA-Integrität war mit dem Grading korreliert: hoch differenzierte Tumore (G1) wiesen eine niedrigere Integrität (Median: 0,658) auf als mäßig differenzierte (G2, mediane mtDNA Integrität 1,059; $p = 0,008$) und niedrig differenzierte Tumoren (G3, mediane mtDNA Integrität 0,908; $p = 0,01$).

Lediglich ein Patient mit Blasenkarzinom, der radikal zystektomiert wurde, litt gleichzeitig unter Lymphknotenmetastasen. Erwähnenswert sind die hohen Werte der mtDNA Konzentrationen bei ihm. MtDNA 79 Bp hatte eine Konzentration von $23,66 \times 10^6$ Fragmente/ml, mtDNA 230 Bp eine von $19,28 \times 10^6$ Fragmente /ml.

Als letzter Punkt ist noch zu bemerken, dass bei 3 Patienten aus der Gruppe der Blasenkarzinome, die eine radikale Zystektomie als Therapie erhalten haben, ein s.g. inzidentelles Prostatakarzinom gefunden wurde. Inzidentell bedeutet, dass diese Karzinome bei histo-pathologischer Untersuchung von Prostatagewebe gefunden wurden, welches nicht in erster Linie zur Diagnose oder zur Therapie eines Prostatakarzinoms gewonnen wurde. Man spricht in solchem Zusammenhang auch von einem Zufallsbefund. Die Werte für die mtDNA Konzentrationen und die mtDNA-Integrität dieser 3 Patienten entsprachen der Größenordnung der anderen Patienten mit Blasenkarzinom.

	mtDNA 79 Bp [p=]	mtDNA 230 Bp [p=]	mtDNA Integrität [p=]
T-Stadium	0,412	0,918	0,510
Lymphknotenmetastasen	0,117	0,223	0,384
Muskelinvasion	0,072	0,195	0,246
Grading	0,971	0,193	0,01

Tabelle 12: Korrelation klinisch-pathologischer Daten mit mtDNA Konzentrationen/Integrität beim BCA

Es zeigt sich eine Korrelation der mtDNA-Integrität mit dem Grading des BCA.

3.3.3. Prostatakarzinom

Beim Prostatakarzinom gab es keinerlei statistischen Zusammenhang zwischen den gemessenen Werten für mtDNA Konzentrationen bzw. mtDNA-Integrität und einem klinisch-pathologischen Parameter. Weder die Ausbreitung des Primarius, noch die Metastasierung noch der Differenzierungsgrad zeigten eine Korrelation, sämtliche p-Werte liegen bei $p > 0,05$.

	mtDNA 79 Bp [p=]	mtDNA 230 Bp [p=]	mtDNA Integrität [p=]
T-Stadium	0,462	0,350	0,640
Reg.	0,880	1,000	0,651
Lymphknotenbefall			
Metastasierung	0,462	0,350	0,640
Gleason score	0,785	0,739	0,713

Tabelle 13: Korrelation klinisch-pathologischer Daten mit mtDNA Konzentrationen/Integrität beim PCA

Es findet sich keinerlei Korrelation zwischen den gemessenen Werten und den klinisch-pathologischen Daten des PCA.

Aufgrund der Tatsache, dass sich nicht für sämtliche mtDNA-Konzentrationen bzw. mtDNA-Integrität statistisch bedeutsame Zusammenhänge mit klinischen Merkmalen zeigen, wurde aus Gründen der Übersicht auf die graphische Darstellung aller Ergebnisse verzichtet.

4. Diskussion

4.1. Zirkulierende DNA als Biomarker

Dies ist die erste Arbeit, die sich mit der zirkulierenden mtDNA bei Patienten mit Nierenzell- und Blasenkarzinom beschäftigt. Bei den hier untersuchten 140 Proben von Patienten mit unterschiedlichen urologischen Krebserkrankungen zeigte sich, dass die Konzentration an mtDNA im Serum dieser Patienten im Vergleich zu den 79 Proben von Gesunden vierzehnfach erhöht ist. Dieser Unterschied ist hoch signifikant, und erlaubt eine Unterscheidung der Krebspatienten von Gesunden mit einer Sensitivität von 84,3 % und einer Spezifität von 97,5 % (AUC 0,944).

Unterteilt man nun die Gruppe der Krebspatienten in Patienten mit Blasen-, Nierenzell- und Prostatakarzinom, so stellt man fest, dass sich die Konzentration an mtDNA im Serum je nach Tumorart unterschiedlich hoch ist. Die höchste Konzentration hatten Patienten mit Blasenkarzinom, die niedrigste die mit Prostatakarzinom (Siehe Abbildung 3). Die hohe Konzentration an mtDNA bei Patienten mit Blasen- und Nierenzellkarzinom erklärt, warum die Unterscheidung dieser von Gesunden besser funktioniert. Die diagnostische Genauigkeit lag für das Nierenzellkarzinom bei einer AUC von 0,969. Beim Blasenkarzinom liegt die AUC bei 0,961. Im Vergleich dazu fällt die Genauigkeit beim Prostatakarzinom etwas ab, AUC = 0,847.

In schnellwachsenden Tumoren finden sich häufig nekrotische Areale, bei langsam wachsenden entstehen diese deutlich seltener. Die Tatsache, dass das PCA ein sehr langsam wachsender Tumor ist, könnte eine Erklärung dafür sein, dass die mtDNA Konzentration beim PCA nicht signifikant erhöht ist.

Beim Blasenkarzinom ist es für die Therapie und die Prognose des Patienten sehr wichtig, ob das Karzinom bereits muskelinvasiv wächst oder nicht. Der Erkennung eines Karzinoms zu einem frühen Zeitpunkt kommt also eine große Bedeutung zu. Bei der Konzentration an mtDNA im Serum beim Blasenkarzinom gab es keinen Unterschied zwischen Patienten mit Muskelinvasion oder ohne. So könnte die Bestimmung der mtDNA Konzentration besonders zur frühen Erkennung von Karzinomen hilfreich sein.

Sowohl für das Blasenkarzinom als auch für das Nierenzellkarzinom stehen zum Zeitpunkt dieser Arbeit keine klinisch etablierten Tumormarker zur Früherkennung zur Verfügung. Somit ist hier ein Vergleich nicht möglich. Beim Prostatakarzinom steht das PSA zur Verfügung. Aufgrund der niedrigen Fallzahl (n=23) und der nicht-signifikanten Erhöhung der zirkulierenden DNA bei diesen Patienten, wurde im Rahmen dieser Arbeit auf ein Vergleich zum PSA verzichtet. Dies

sollte jedoch in weiteren Studien erfolgen.

Die Ergebnisse vorhergehender Arbeiten zur mtDNA kamen zu unterschiedlichen Ergebnissen. So waren Konzentrationen der mtDNA im Serum von Patienten mit Ovarial- (Zachariah et al., 2008), Hoden- (Ellinger et al. 2009b) und metastasiertem Prostatakarzinom (Mehra et al., 2007) im Vergleich zur Kontrollgruppe erhöht. Patienten mit lokalem Prostatakarzinom andererseits hatten ähnlich hohe Konzentrationen wie Patienten mit Benigner Prostatahyperplasie (BPH). Dies lässt die Vermutung zu, dass der pathophysiologische Mechanismus, der zu einer Freisetzung von mtDNA führt, beim Prostatakarzinom und der Benigen Prostatahyperplasie gleich ist. (Ellinger et al., 2008e). Im Vergleich zu Gesunden war die Konzentration an mtDNA bei Patientinnen mit Brustkrebs sogar erniedrigt (Kohler et al., 2009).

Es bleibt zu erwähnen, dass in den oben genannten Arbeiten die genomische DNA entweder gleichzeitig mitbestimmt wurde oder aber dieselbe Patientenkohorte (Ellinger et al., 2009c; Ellinger et al., 2008b) verwendet wurde, um die Konzentration an gDNA zu bestimmen. Die gDNA Konzentration war in sämtlichen erwähnten Arbeiten erhöht. Insbesondere auch in der Arbeit zum Mammakarzinom (Kohler et al., 2009). Eine zunehmende Anzahl an Arbeiten zur zirkulierenden zellfreien gDNA bestätigen eine Erhöhung dieser im Serum bei Krebspatienten.

Der Anteil der tumorspezifischen DNA an der freien DNA im Serum ist jedoch sehr gering. Es stammen lediglich 5 % der zirkulierenden DNA direkt von Tumorzellen. Aufgrund dessen muss es zusätzlich noch zu einer indirekten Erhöhung der freien zirkulierenden DNA kommen. Im Mausmodell konnte ein Anstieg der zellfreien DNA sowohl durch Fas-Ligand (Apoptose) als auch durch Acetaminophen (Nekrose) induziert werden. Je nach Art des Zelltodes wurde ein Anstieg von kleinfragmentärer (Apoptose, < 200 Bp) bzw. hochmolekularer (Nekrose, > 400 Bp) festgestellt (Jahr et al., 2001). Im Zusammenhang damit, dass man feststellen konnte, dass BCA-Tumorzellen Fas-Ligand exprimieren (Lee et al., 1999) und dieser bei Tumorpatienten in vivo auch erhöht ist (Mizutani et al., 2001), kommen also proapoptotische Zytokine als Ursache der Erhöhung der zirkulierenden DNA in Frage. Zudem kann auf diese Weise auch in tumorfernen Bereichen im Körper eine vermehrte Apoptose ausgelöst werden.

Neuere Arbeiten zeigen zudem, dass durch zirkulierende DNA nicht nur die Apoptose in anderen Körperzellen ausgelöst werden kann, sondern dort auch regulierender Einfluss in Richtung einer Onkogenese ablaufen können (Garcia-Olmo et al., 2010).

Aufgrund der bei der Apoptose und Nekrose ablaufenden Prozesse müsste die mtDNA mit der gDNA gemeinsam erhöht sein. Tatsächlich korrelieren die beiden Konzentrationen in den

folgenden Arbeiten nicht (Mehra et al., 2007; Zachariah et al., 2008; Kohler et al., 2009). Gründe dafür könnten in den Unterschieden der zirkulierenden Form der beiden DNAs liegen. Die gDNA liegt meist frei vor, die mtDNA überwiegend partikelgebunden (Chiu et al., 2003). Ebenfalls als Begründung kommt in Frage, dass sich je nach Art des Tumors eine unterschiedlich große Anzahl an Mitochondrien in den Zellen befindet. So konnte gezeigt werden, dass Tumorzellen des Nierenzellkarzinoms über erniedrigten mitochondrialen Inhalt verfügen (Meierhofer et al., 2004). Bei Karzinomen des Endometriums (Wang et al., 2005) und des Kopf-Hals Bereiches (dazu zählen Mundhöhlenkarzinom, Nasopharynxkarzinom, Oropharynxkarzinom, Hypopharynxkarzinom, Larynxkarzinom und Tracheakarzinom) besaßen die Tumorzellen einen erhöhten Anteil an mitochondrialem Inhalt (Kim et al., 2004).

Aktuell ergeben sich aus der Literatur keine eindeutigen Hinweise darauf, dass es im Rahmen des Zelltodes zu einer unterschiedlichen Fragmentierung von genomischer und mitochondrialer DNA kommt. Jedoch ist diese Frage noch nicht hinreichend geklärt und sollte in kommenden Studien untersucht werden. Aufgrund der zentralen Bedeutung für die Fragestellung, besteht solange eine mögliche Limitierung der Aussagekraft dieser Arbeit.

4.2. mtDNA- Integrität

Die mtDNA-Integrität, also der Quotient aus den Konzentration an mtDNA 230 Bp / mtDNA 79 Bp war beim Blasen- und Nierenzellkarzinom im Vergleich zum Prostatakarzinom und den Gesunden erhöht. Eine Erhöhung deutet auf einen nekrotischen Ursprung der mtDNA hin. Nekrosen werden oft bei großen Nierenzellkarzinomen gefunden. Dort ist das Auftreten einer Nekrose ein ungünstiger prognostischer Faktor für den Krankheitsverlauf des Patienten. In dieser Arbeit konnte gerade bei Patienten mit lokal fortgeschrittenem Nierenzellkarzinom eine Erhöhung der mtDNA-Integrität festgestellt werden. Somit könnte die mtDNA-Integrität in diesem Fall auch ein prognostischer Faktor sein. Vor kurzem konnte zudem gezeigt werden, dass Patienten mit großen Nierenzellkarzinomen ebenfalls über große gDNA Fragmente in Serum und Plasma haben (Zhong et al., 2007).

Bei anderen Tumorentitäten verhält kann es sich auch gegensätzlich verhalten. Im Mausmodell war beim Kolorektalen Karzinom die DNA-Integrität erniedrigt (Thierry et al., 2010).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass in diversen Arbeiten ein statistischer Zusammenhang

zwischen einer malignen Grunderkrankung und einer Änderung der DNA-Integrität finden lässt. Jedoch kommt es einerseits zu einer signifikanten Erhöhung andererseits kommt zu einer signifikanten Erniedrigung der DNA-Integrität. Diese scheinbar widersprüchlichen Ergebnisse, die dennoch eine Signifikanz zu malignen Erkrankungen zeigen, gilt es in zukünftigen Arbeiten genauer zu untersuchen.

4.3. Kontrollkollektiv

Das Kontrollkollektiv ist in dieser Arbeit signifikant jünger als die Patientenkohorte. Dies grenzt die Aussagekraft dieser Arbeit ein. Um die Ergebnisse zu bestätigen sind weitere Arbeiten notwendig. Zusätzlich zur Berücksichtigung des Alters des Kontrollkollektivs sollte dieses auch ausgeweitet werden. Es sollten nicht nur Gesunde als Kontrolle dienen, sondern auch Patienten mit nicht malignen organbezogenen Erkrankungen, wie beispielsweise die benigne Prostatahyperplasie, die chronische Zystitis oder die Pyelonephritis, oder z.B. jene Patienten, die zum Ausschluss eines Blasenkarzinoms zystoskopiert wurden. Das Fehlen dieses Vergleichskollektivs stellt eine weitere Limitation dieser Arbeit dar. Im Falle der zirkulierenden genomischen DNA waren bei Patienten mit neoplastischen Krankheiten die DNA Konzentrationen im Plasma im Vergleich zu gesunden Kontrollen erhöht. Im Vergleich zu der Gruppe mit Malignomen jedoch waren die gemessenen Konzentrationen niedriger (Chang et al., 2002).

Andererseits wurde auch schon gezeigt, dass der Einfluss des Alters auf die Konzentration an zirkulierender DNA nicht groß ist. So zeigte sich im Serum junger Männer nur ein kleiner Anstieg der Konzentration der gesamten zirkulierenden DNA (Wu et al., 2002). Eine andere Arbeit zeigte eine Erhöhung der Konzentration an gDNA im Plasma von älteren Frauen, nicht jedoch im Serum (Umetani et al., 2006c). Betrachtet man nun die Ergebnisse dieser Arbeit so sieht man, dass die Erhöhung der Konzentration an mtDNA 79 Bp Fragmenten bei Männern im Vergleich zu den Frauen nur in der Gruppe der Gesunden auftrat, bei der Patientenkohorte waren diese in etwa gleich. Darüber hinaus fand sich ebenfalls in der Kontrollgruppe eine Korrelation der Konzentration an mtDNA 230 Bp Fragmenten mit dem Alter. Es muss jedoch berücksichtigt werden, dass ein Zusammenhang mit dem Alter oder dem Geschlecht und der Konzentration an zirkulierender mtDNA von untergeordneter Bedeutung ist: Betrachtet man die gemessenen Werte der einzelnen Konzentrationen an mtDNA, bei den gesunden Männern $0,49 \times 10^6$ Fragmente/ml

und bei den gesunden Frauen $0,35 \times 10^6$ Fragmente/ml, so sind diese im Vergleich mit den Tumorpatienten immer noch annähernd um das vierzehnfache erniedrigt.

4.4. Nachweis im Serum

Mögliche Quellen für im Blut zirkulierende DNA sind Plasma und Serum. Vollblut kommt aufgrund der noch vorhandenen Zellbestandteile nicht in Frage. Der Unterschied zwischen Plasma und Serum liegt darin, dass beim Plasma direkt mit der Abnahme des Blutes die Gerinnung in der Probe gehemmt wird. Dadurch sind nach dem Abzentrifugieren der im Blut vorkommenden Zellen noch die flüssigen bzw. gelösten Bestandteile des Blutes mitsamt den Gerinnungsfaktoren im Plasma vorhanden. Beim Serum ist die Gerinnung erwünscht. Es besteht aus den flüssigen bzw. gelösten Anteilen des Blutes ohne Gerinnungsfaktoren. Es ist bekannt, dass die Konzentration an zirkulierender DNA im Serum höher ist als im Plasma. Dies gilt sowohl für die gDNA (Umetani et al., 2006b; Chan et al., 2005) als auch für die mtDNA (Chiu et al., 2003). Der Grund dafür wurde lange in einer Kontamination durch Zellmaterial vermutet. Eine solche äußere Ursache konnte mittlerweile ausgeschlossen werden (Umetani et al., 2006b). Darüber hinaus weiß man, dass die Konzentration an zirkulierender DNA und deren Fragmentgröße über einen Zeitraum von sechs Stunden konstant ist (Chan et al., 2005). Somit eignet sich Serum, bei rechtzeitiger Verarbeitung, sehr gut zum Nachweis der zirkulierenden zellfreien DNA. Darüber hinaus gibt es für die Isolation und Aufreinigung von DNA aus Serum und Plasma verschiedene Verfahren und Verfahrensprotokolle. Dies hat ebenfalls einen Einfluss auf den Ertrag an DNA (Andreu et al., 2009). Nicht nur im Bereich der Aufreinigung bzw. Isolation sollte für zukünftige Arbeiten eine Standardisierung erfolgen, sondern auch die Probengewinnung und die PCR-Protokolle müssen standardisiert werden, um eine Vergleichbarkeit der einzelnen Arbeiten zu ermöglichen (Chiu et al., 2003).

4.5. Perspektiven

Bei dieser Arbeit handelt es sich um eine Pilotstudie. Es konnte gezeigt werden, dass die Konzentration an zirkulierender zellfreier mtDNA bei Krebspatienten signifikant erhöht ist. Von daher kann die Bestimmung dieser Konzentration als Biomarker zur Erkennung von Krebspatienten hilfreich sein. Dieses Ergebnis sollte Grundlage für weitere und v.a. umfangreichere Arbeiten zu deren Validierung sein. Dazu ist es einerseits erforderlich,

Normwerte, anhand von größeren und heterogeneren gesunden Kollektiven zu definieren. Andererseits sollte auch ein Vergleich der mtDNA Konzentration von Krebspatienten mit einer heterogeneren Gruppe an Gesunden, sowie mit Patienten mit nicht malignen Erkrankungen stattfinden, dies ist v.a. für eine Beurteilung des positiv prädiktiven Wertes der zirkulierenden mtDNA als Marker wichtig. Als weiterer Schritt sollte zudem eine prospektiv angelegte Untersuchung, unter Mitberücksichtigung etablierter Marker wie dem PSA, zur weiteren Validierung erfolgen. So könnte man die Qualität des Nachweises im Serum zirkulierender mtDNA im Serum von Patienten mit urologischen Krebserkrankungen abschließend beurteilen.

5. Zusammenfassung

Aufgrund des Mangels an guten Biomarkern bzw. den Schwächen des PSA-Screenings, ist es wichtig, neue Biomarker zu etablieren. Eine Reihe von Arbeiten haben die Möglichkeiten von zirkulierender DNA aufgezeigt. In dieser Arbeit sollte nun die Rolle zirkulierender mitochondrialer DNA bei urologischen Tumorerkrankungen erforscht werden.

Dafür wurde die zellfreie DNA aus 1 ml Serum von Patienten bzw. Gesunden (n=79) isoliert. Die Gruppe der Patienten teilt sich auf in Patienten mit Blasenkarzinom (n=84), Nierenzellkarzinom (n=33) und mit Prostatakarzinom (n=23). Mit Hilfe einer Quantitativen real-time PCR wurde die Konzentration von zwei Fragmenten der für die Mitochondrien spezifischen 16S-RNA gemessen. Die Fragmente waren 79 Bp bzw. 230 Bp groß. Die mtDNA-Integrität wurde als Quotient der Anzahl der mtDNA 230 Bp Fragmente pro mtDNA 79 Bp Fragment definiert.

Bei den Gesunden ist die Konzentration an mtDNA 79 Bp Fragmenten bei den Männern erhöht; die Konzentration von mtDNA 230 Bp korrelierte mit dem Alter. Bei den Krebspatienten korrelierten weder das Alter noch das Geschlecht mit der mtDNA Konzentration. Die Konzentration an zirkulierender mtDNA 79 Bp (median $8,75 \times 10^6$ vs. $0,43 \times 10^6$ Fragmente/ml) und mtDNA 230 Bp ($8,11 \times 10^6$ vs. $0,27 \times 10^6$ Fragmente/ml) waren bei den Krebspatienten signifikant erhöht und erlaubten eine sensitive (84 %) und spezifische (97 %) Differenzierung von Patienten und Gesunden. Zwischen den verschiedenen Tumorarten gab es Unterschiede in der mtDNA Konzentration (mtDNA-79: BCA $9,54 \times 10^6$ vs. RCC $6,69 \times 10^6$ vs. PCA $4,48 \times 10^6$ Fragmente/ml; mtDNA-230: BCA $9,78 \times 10^6$ vs. RCC $6,74 \times 10^6$ vs. PCA $1,94 \times 10^6$ Fragmente/ml). Die mtDNA-Integrität war beim Nierenzell- und Blasenkarzinom im Vergleich zu Gesunden und Prostatakarzinom erhöht. Es gab eine Korrelation von mtDNA-Integrität mit dem Ausbreitung des Tumors beim Nierenzellkarzinom und dem Grading beim Blasenkarzinom.

Bei Gesunden scheint die Konzentration an frei zirkulierender mtDNA mit dem Geschlecht und dem Alter zu korrelieren. Dies ist bei Patienten jedoch nicht der Fall. Die Bestimmung der Konzentration an mtDNA im Serum könnte dazu beitragen Patienten mit urologischen Krebserkrankungen zu erkennen.

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 Histopathologische Klassifikation nach dem Gleason Grading

Abbildung 2 Schematische Darstellung der Primeramplikons

Abbildung 3 Korrelation von Alter, Geschlecht und Dignität mit mtDNA Konz. und mtDNA-Integrität

Abbildung 4 Grafische Darstellung der Ergebnisse für mtDNA Konzentration und mtDNA-Integrität; ROC Kurven von mtDNA 79 Bp, mtDNA 230 Bp und mtDNA-Integrität in der Gegenüberstellung von Gesundkontrollen gegen Tumorpatienten.

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1	TNM-Klassifikation beim Prostatakarzinom der UICC von 2002
Tabelle 2	TNM-Klassifikation beim Blasenkarzinom der UICC von 2002
Tabelle 3	Einteilung des histopathologischen Differenzierungsgrades des Blasenkarzinoms der WHO, 1973
Tabelle 4	Einteilung des histopathologischen Differenzierungsgrades des Blasenkarzinoms der WHO, 2004
Tabelle 5	Derzeitige Biomarker für Erkennung und Nachsorge des BCA
Tabelle 6	TNM-Klassifikation beim Nierenzellkarzinom der UICC von 2002
Tabelle 7	Einteilung des histopathologischen Differenzierungsgrades des RCC der UICC von 2002
Tabelle 8	Klinisch-pathologische Daten des Patientenkollektivs, klinische Daten der Gesundheitskontrollen
Tabelle 9	Mediane der Konzentrationen bzw. des Quotienten der verschiedenen Probandengruppen
Tabelle 10	Aussagekraft von mtDNA 79 Bp, mtDNA 230 Bp und mtDNA-Integrität
Tabelle 11	Korrelation klinisch-pathologischer Daten mit mtDNA Konzentrationen/Integrität beim RCC
Tabelle 12	Korrelation klinisch-pathologischer Daten mit mtDNA Konzentrationen/Integrität beim BCA
Tabelle 13	Korrelation klinisch-pathologischer Daten mit mtDNA Konzentrationen/Integrität beim PCA

Anhänge

Literaturverzeichnis

- Altimari A, Grigioni AD, Benedettini E, Gabusi E, Schiavina R, Martinelli A, Morselli-Labate AM, Martorana G, Grigioni WF, Fiorentino M. Diagnostic role of circulating free plasma DNA detection in patients with localized prostate cancer. *Am J Clin Pathol* 2008; 129: 756-762
- Andreu AL, Martinez R, Marti R, Garcia-Arumi E. Quantification of mitochondrial DNA copy number: Pre-analytical factors. *Mitochondrion* 2009; 9: 242-246
- Andriole GL, Crawford ED, Grubb RL, Buys SS, Chia D, Church TR, Fouad MN, Gelmann EP, Kvale PA, Reding DJ, Weissfeld JL, Yokochi LA, O'Brien B, Rathmell JM, Riley TL, Hayes RB, Kramer BS, Izmirlian G, Miller AB, Pinsky PF, Prorok PC, Gohagan JK, Berg CD, PLCO Projekt Team. Mortality results from a randomized prostate-cancer screening trial. *N Engl J Med* 2009; 360: 1310-1319
- Anker P, Mulcahy H, Chen XQ, Stroun M. Detection of circulating tumour DNA in the blood (plasma/serum) of cancer patients. *Cancer and Metastasis Reviews* 1999; 18: 65-73
- Atzpodien J, Royston P, Wandert T, Reitz M. Metastatic renal carcinoma comprehensive prognostic system. *British Journal of Cancer* 2003; 88: 348-353
- Bastian PJ, Palapattu GS, Yegnasubramanian S, Lin X, Rogers CG, Mangold LA, Trock B, Eisenberger M, Partin AW, Nelson WG. Prognostic value of preoperative serum cell-free circulating DNA in men with prostate cancer undergoing radical prostatectomy. *Clin Cancer Res* 2007; 13: 5361-5367
- Bergstrom A, Hsieh CC, Lindblad P, Lu CM, Cook NR, Wolk A. Obesity and renal cell cancer - a quantitative review. *British Journal of Cancer* 2001; 85: 984-990
- Bratt O. Hereditary prostate cancer: Clinical aspects. *Journal of Urology* 2002; 168: 906-913
- Brawley OW, Ankerst DP, Thompson IM. Screening for Prostate Cancer. *Ca-A Cancer Journal for Clinicians* 2009; 59: 264-273

- Chan KCA, Yeung SW, Lui WB, Rainer TH, Lo YMD. Effects of preanalytical factors on the molecular size of cell-free DNA in blood. *Clinical Chemistry* 2005; 51: 781-784
- Chang HW, Lee SA, Goodman SN, Singer G, Cho SKR, Sokoll J. Assessment of plasma DNA levels, allelic imbalance, and CA 125 as diagnostic tests for cancer. *Journal of the National Cancer Institute* 2002; 94: 1697-1703
- Chiu RWK, Chan LYS, Lam NYL, Tsui NBY, Ng EKO, Rainer TH, Lo YM. Quantitative analysis of circulating mitochondrial DNA in plasma. *Clinical Chemistry* 2003; 49: 719-726
- Chrouser K, Leibovich B, Bergstralh E, Zincke H, Blute M. Bladder cancer risk following primary and adjuvant external beam radiation for prostate cancer. *Journal of Urology* 2005; 174: 107-110
- Chun FK, Muller I, Lange I, Friedrich MG, Erbersdobler A, Karakiewicz PI, Graefen M, Pantel K, Huland H, Schwarzenbach H. Circulating tumour-associated plasma DNA represents an independent and informative predictor of prostate cancer. *BJU Int* 2006; 98: 544-548
- Clague J, Lin J, Cassidy A, Matin S, Tannir NM, Tamboli P, Wood CG, Wu X. Family History and Risk of Renal Cell Carcinoma: Results from a Case-Control Study and Systematic Meta-Analysis. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention* 2009; 18: 801-807
- Ellinger J, Albers P, Muller SC, von Ruecker A, Bastian PJ. Circulating mitochondrial DNA in the serum of patients with testicular germ cell cancer as a novel noninvasive diagnostic biomarker. *BJU Int* 2009b; 104: 48-52
- Ellinger J, Bastian PJ, Ellinger N, Perabo FG, Buettner R, Mueller SC, Ruecker A. Apoptotic DNA fragments in serum of patients with muscle invasive bladder cancer: A prognostic entity. *Cancer Lett* 2008d; 264: 274-280
- Ellinger J, Bastian PJ, Haan KI, Heukamp LC, Buettner R, Fimmers R, Mueller SC, von Ruecker A. Noncancerous PTGS2 DNA fragments of apoptotic origin in sera of prostate cancer patients qualify as diagnostic and prognostic indicators. *Int J Cancer* 2008a; 122: 138-

143

- Ellinger J, Haan K, Heukamp LC, Kahl P, Buttner R, Muller SC, von Ruecker A, Bastian PJ. CpG Island hypermethylation in cell-free serum DNA identifies patients with localized prostate cancer. *Prostate* 2008b; 68: 42-49
- Ellinger J, El Kassem N, Heukamp LC, Matthews S, Cubukluoz F, Kahl P, Perabo FG, Mueller SC, von Ruecker A, Bastian PJ. Hypermethylation of cell-free serum DNA indicates worse outcome in patients with bladder cancer. *Journal of Urology* 2008c; 179: 346-352
- Ellinger J, Mueller SC, Wernert N, von Ruecker A, Bastian PJ. Mitochondrial DNA in serum of patients with prostate cancer: a predictor of biochemical recurrence following prostatectomy. *BJU Int* 2008e; 102: 628-632
- Ellinger J, Muller S, Stadler T, Jung A, von Ruecker A, Bastian P. The role of cell-free circulating DNA in the diagnosis and prognosis of prostate cancer. *Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations* 2009c; In Press, Corrected Proof.
- Ellinger J, Wittkamp V, Albers P, Perabo FG, Mueller SC, von Ruecker A, Bastian PJ. Cell-free circulating DNA: diagnostic value in patients with testicular germ cell cancer. *J Urol* 2009a; 181: 363-371
- Feil G, Bichler KH, Paulgen-Nelde HJ, Hennenlotter J, Zumbregel A, Stenzl A. ImmunoCyt (TM) - a new urine test in diagnosis of bladder cancer. *Urologe A* 2003; 42: 531- 537
- Ferlay J, Autier P, Boniol M, Heanue M, Colombet M, Boyle P. Estimates of the cancer incidence and mortality in Europe in 2006. *Annals of Oncology* 2007; 18: 581-592
- Garcia-Olmo DC, Dominguez C, Garcia-Arranz M, Anker P, Stroun M, Garcia-Verdugo JM, Garcia-Olmo D. Cell-Free Nucleic Acids Circulating in the Plasma of Colorectal Cancer Patients Induce the Oncogenic Transformation of Susceptible Cultured Cells. *Cancer Research* 2010; 70: 560-567
- Glas AS, Roos D, Deutekom M, Zwinderman AH, Bossuyt PM, Kurth KH. Tumor markers in the diagnosis of primary bladder cancer. A systematic review. *J Urol* 2003; 169: 1975-1982

- Gronberg H, Damber L, Damber JE. Familial prostate cancer in Sweden - A nationwide register cohort study. *Cancer* 1996; 77: 138-143
- Gudbjartsson T, Jonasdottir TJ, Thoroddsen A, Einarsson GV, Jonsdottir GM, Kristjansson K. A population-based familial aggregation analysis indicates genetic contribution in a majority of renal cell carcinomas. *International Journal of Cancer* 2002; 100: 476-479
- Hernandez J, Thompson IM. Prostate-specific antigen: A review of the validation of the most commonly used cancer biomarker. *Cancer* 2004; 101: 894-904
- Higuchi R, Dollinger G, Walsh PS, Griffith R. Simultaneous Amplification and Detection of Specific Dna-Sequences. *Bio-Technology* 1992; 10: 413-417
- Hotchkiss RS, Strasser A, McDunn JE, Swanson PE. Cell death. *New England Journal of medicine*. 2009; 361(16): 1570 - 1583
- IARC International Agency for Research on Cancer Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Tobacco smoke and involuntary smoking. IARC IARC: International Agency for Research on Cancer Monogr Eval Carcinog Risks Hum 2004; 83: 1-1438
- Jahr S, Hentze H, Englisch S, Hardt D, Fackelmayer FO, Hesch RD, Knippers R. DNA fragments in the blood plasma of cancer patients: quantitations and evidence for their origin from apoptotic and necrotic cells. *Cancer Res* 2001; 61: 1659-1665
- Kaldor JM, Day NE, Kittelmann B, Pettersson F, Langmark F, Pedersen D, Prior P, Neal F, Karjalainen S, Bell J. Bladder-Tumors Following Chemotherapy and Radiotherapy for Ovarian-Cancer - A Case-Control Study. *International Journal of Cancer* 1995; 63: 1-6
- Karim-Kos HE, de Vries E, Soerjomataram I, Lemmens V, Siesling S, Coebergh JWW. Recent trends of cancer in Europe: A combined approach of incidence, survival and mortality for 17 cancer sites since the 1990s. *European Journal of Cancer* 2008; 44: 1345-1389
- Kohler C, Radpour R, Barekati Z, Asadollahi R, Bitzer J, Wight E, Bürki N, Diesch C, Holzgreve W, Zhong XY. Levels of plasma circulating cell free nuclear and mitochondrial DNA as potential biomarkers for breast tumors. *Molecular Cancer* 2009; 8: 105

- Lam NY, Rainer TH, Chiu RW, Joynt GM, Lo YM. Plasma mitochondrial DNA concentrations after trauma. *Clin Chem* 2004; 50: 213-216
- Lee SH, Lee JY, Park WS, Kim SY, Jang JJ, Yoo NJ. Transitional cell carcinoma expresses high levels of Fas ligand in vivo. *BJU Int* 1999; 83: 698-702
- Leon SA, Shapiro B, Sklaroff DM, Yaros MJ. Free DNA in the serum of cancer patients and the effect of therapy. *Cancer Res* 1977; 37: 646-650
- Lipworth L, Tarone RE, McLaughlin JK. The epidemiology of renal cell carcinoma. *Journal of Urology* 2006; 176: 2353-2358
- Lokeshwar VB, Selzer MG. Urinary bladder tumor markers. *Urologic Oncology-Seminars and Original Investigations* 2006; 24: 528-537
- Mandel P, Metais P. Les acides nucleiques du plasma sanguine chez l'homme. *C R Acad Sci Paris* 1948; 142: 241-243
- Mehra N, Penning M, Maas J, van Daal N, Giles RH, Voest EE. Circulating mitochondrial nucleic acids have prognostic value for survival in patients with advanced prostate cancer. *Clin Cancer Res* 2007; 13: 421-426
- Meierhofer D, Mayr JA, Foetschl U, Berger A, Fink K, Schmeller N, Hacker GW, Hauser-Kronberger C, Kofler B, Sperl W. Decrease of mitochondrial DNA content and energy metabolism in renal cell carcinoma. *Carcinogenesis* 2004; 25: 1005-1010
- Mizutani Y, Hongo F, Sato N, Ogawa O, Yoshida O, Miki T. Significance of serum soluble Fas ligand in patients with bladder carcinoma. *Cancer* 2001; 92: 287-293
- Mouliere F, Robert B, Arnau Peyrotte E, Del Rio M, Ychou M, Molina F, Gongora C, Thierry AR. High fragmentation characterizes tumor-derived circulating DNA. *Public library of Science* 2011; 6: e23418
- Palecek E, Fojta M. Magnetic beads as versatile tool for electrochemical DNA and protein biosensing. *Talanta* 2007; 74: 276-290

- Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin* 2005; 55: 74-108
- Pashos CL, Botteman MF, Laskin BL, Redaelli A. Bladder cancer - Epidemiology, diagnosis, and management. *Cancer Practice* 2002; 10: 311-322
- Pischon T, Lahmann PH, Boeing H, Tjønneland A, Halkjaer J, Overvad K. Body size and risk of renal cell carcinoma in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC). *International Journal of Cancer* 2006; 118: 728-738
- Robert Koch-Institut und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (GEKID), 2010: Krebs in Deutschland 2005/2006. Häufigkeiten und Trends. 7. Ausgabe. <http://www.gekid.de/Doc/KID2010.pdf> (14.05.2010)
- Sardana G, Dowell B, Diamandis EP. Emerging Biomarkers for the Diagnosis and Prognosis of Prostate Cancer. *Clinical Chemistry* 2008; 54: 1951-1960
- Schroder FH, Hugosson J, Roobol MJ, Tammela TL, Ciatto S, Nelen V. Screening and prostate-cancer mortality in a randomized European study. *N Engl J Med* 2009; 360: 1320-1328
- Schroder FH, Kranse R. Verification Bias and the Prostate-Specific Antigen Test -- Is There a Case for a Lower Threshold for Biopsy? *N Engl J Med* 2003; 349: 393-395
- Schwarzenbach H, Stoecklacher J, Pantel K, Goekkurt E. Detection and monitoring of cell-free DNA in blood of patients with colorectal cancer. *Circulating Nucleic Acids in Plasma and Serum V* 2008; 1137: 190-196
- Srigley JR, Hutter RVP, Gelb AB, Henson DE, Kenney G, King BF. Current prognostic factors - Renal cell carcinoma - Workgroup no 4. *Cancer* 1997; 80: 994-996
- Steinberg GD, Carter BS, Beaty TH, Childs B, Walsh PC. Family History and the Risk of Prostate-Cancer. *Prostate* 1990; 17: 337-347
- Steuber T, O'Brien MF, Lilja H. Serum markers for prostate cancer: A rational approach to the literature. *European Urology* 2008; 54: 31-40

- Thierry AR, Mouliere F, Gongora C, Ollier J, Robert B, Ychou M. Origin and quantification of circulating DNA in mice with human colorectal cancer xenografts. *Nucleic Acids Res* 2010; [Epub ahead of print]
- Thompson IM, Pauler DK, Goodman PJ, Tangen CM, Lucia MS, Parnes HL. Prevalence of prostate cancer among men with a prostate-specific antigen level $<$ or $=4.0$ ng per milliliter. *N Engl J Med* 2004; 350: 2239-2246
- Travis LB, Curtis RE, Glimelius B, Holoway EJ, Vanleeuwen FE, Lynch CF, Hagenbeek A, Stovall M, Banks PM, Adami J. Bladder and Kidney Cancer Following Cyclophosphamide Therapy for Non-Hodgkins-Lymphoma. *Journal of the National Cancer Institute* 1995; 87: 524-530
- Umetani N, Giuliano AE, Hiramatsu SH, Amersi F, Nakagawa T, Martino S, Hoon DS. Prediction of breast tumor progression by integrity of free circulating DNA in serum. *J Clin Oncol* 2006c; 24: 4270-4276
- Umetani N, Hiramatsu S, Hoon DS. Higher amount of free circulating DNA in serum than in plasma is not mainly caused by contaminated extraneous DNA during separation. *Ann N Y Acad Sci* 2006b; 1075: 299-307
- Umetani N, Kim J, Hiramatsu S, Reber HA, Hines OJ, Bilchik AJ, Hoon DS. Increased integrity of free circulating DNA in sera of patients with colorectal or periampullary cancer: direct quantitative PCR for ALU repeats. *Clin Chem* 2006a; 52: 1062-1069
- Wang BG, Huang HY, Chen YC, Bristow RE, Kassaei K, Cheng CC. Increased plasma DNA integrity in cancer patients. *Cancer Res* 2003; 63: 3966-3968
- Wang Y, Liu VWS, Xue WC, Tsang PCK, Cheung ANY, Ngan HYS. The increase of mitochondrial DNA content in endometrial adenocarcinoma cells: A quantitative study using laser-captured microdissected tissues. *Gynecologic Oncology* 2005; 98: 104-110
- Weikert S, Boeing H, Pischon T, Weikert C, Olsen A, Tjonneland A. Blood pressure and risk of renal cell carcinoma in the european prospective investigation into cancer and nutrition. *American Journal of Epidemiology* 2008; 167: 438-446

- Yoon KA, Park S, Lee SH, Kim JH, Lee JS. Comparison of Circulating Plasma DNA Levels between Lung Cancer Patients and Healthy Controls. *Journal of Molecular Diagnostics* 2009; 11: 182-185
- Zachariah RR, Schmid S, Buerki N, Radpour R, Holzgreve W, Zhong XY. Levels of circulating cell-free nuclear and mitochondrial DNA in benign and malignant ovarian tumors. *Obstetrics and Gynecology* 2008; 112: 843-850
- Zaridze DG, Boyle P, Smans M. International Trends in Prostatic-Cancer. *International Journal of Cancer* 1984; 33: 223-230
- Zhong XY, Hahn S, Kiefer V, Holzgreve W. Is the quantity of circulatory cell-free DNA in human plasma and serum samples associated with gender, age and frequency of blood donations? *Ann Hematol* 2007; 86: 139-143

Danksagung

Für die Unterstützung bei der Entstehung dieser Arbeit möchte ich mich ganz herzlich bedanken bei:

- Professor Dr. med. Dr. h. c. Stefan C. Müller für die Überlassung des Themas und dafür, dass er mir die Arbeit im Labor seiner Klinik ermöglicht hat.
- Doris Schmidt und Dr. med. Jörg Ellinger für eine Betreuung, die man sich nicht besser wünschen kann.
- meiner Familie und meinen Freunden für eine immerwährende Unterstützung und die nötige Ablenkung.
- dem gesamten Team des Labors im OPZ für die hervorragende Atmosphäre und die ungezählten kleinen Hilfestellungen.