

**Aus dem Institut für Pathologie der Universität
Tübingen**

Abteilung Molekulare Pathologie

Ärztlicher Direktor: Professor Dr. R. Kandolf

**Mikrosatelliteninstabilität in Sekundärmalignomen nach
Krebserkrankungen im Kindesalter**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen**

**vorgelegt von
Kay-Karsten Kober**

**aus
Stuttgart**

2010

Dekan:

Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter:

Professor Dr. R. Kandolf

2. Berichterstatter:

Professor Dr. P. Lang

**diese Arbeit ist gewidmet
Irmgard und Hartmut Kober
die mir dieses Studium ermöglicht haben**

Inhalt

INHALT.....	IV
ABKÜRZUNGEN.....	VII
1 EINLEITUNG.....	1
1.1 Krebs bei Kindern.....	1
1.1.1 Ätiologie.....	2
1.1.1.1 Umwelteinflüsse bei der Entstehung von Malignomen.....	2
1.1.1.2 Genetische Einflüsse bei der Entstehung von Malignomen ...	3
1.1.1.3 Genetische Tumorsyndrome	4
1.1.2 Entitäten und Inzidenz.....	6
1.2 Sekundärmalignome.....	8
1.2.1 Definition und Epidemiologie.....	8
1.2.2 Entitäten der Sekundärmalignome	10
1.2.2.1 Überblick über alle Sekundärmalignome.....	10
1.2.2.2 Entitäten in Abhängigkeit des jeweiligen Primärtumors.....	12
1.2.2.3 Entitäten bei Tumorsyndromen	13
1.2.3 Risikofaktoren für die Entwicklung eines Sekundärmalignoms....	14
1.2.3.1 Geschlecht	14
1.2.3.2 Alter.....	14
1.2.3.3 Art des Primärtumors	14
1.2.3.4 Therapie des Primärtumors.....	15
1.2.3.5 Familiäre Prädisposition und genetische Syndrome	16
1.2.4 Zusammenfassung pädiatrische Malignome und Sekundärmalignome	17
1.3 Mikrosatelliten-Instabilität	18
1.3.1 DNA-Mismatch-Reparatur (MMR)	18
1.3.1.1 Aufgaben des Mismatch-Repair-Systems	18
1.3.1.2 Funktionsverlust des Mismatch-Repair-Systems	23
1.3.2 Definition und Vorkommen von Mikrosatelliten.....	24
1.3.3 Hereditäres nichtpolypöses Kolonkarzinom.....	24

1.3.4	Analyse von Mikrosatelliten außerhalb des HNPCC-Spektrums; EMAST-Instabilität.....	29
1.3.5	MSI und Sekundärmalignome	31
1.3.6	Zusammenfassung Mikrosatelliten-Instabilität.....	32
1.4	Fragestellung und Ziel	33
2	MATERIAL UND METHODIK	35
2.1	Patientencharakteristika	35
2.2	Methodik.....	38
2.2.1	Auswahl der Mikrosatelliten.....	38
2.2.2	DNA-Extraktion.....	40
2.2.2.1	Mikrodissektion	41
2.2.3	Polymerasenkettenreaktion.....	42
2.2.4	Frequenzlängenanalyse	43
2.2.5	Auswertung	44
2.2.6	Statistik.....	48
2.2.6.1	Vergleich von SPN mit Einzel malignomen	48
2.2.6.2	Untersuchung von SPN: Vergleich von Erst und Zweittumor.....	49
2.2.6.3	Merkmalsdefinitionen	51
3	ERGEBNISSE	52
3.1	Vergleich von SPN mit Einzel malignomen	54
3.2	Untersuchung von SPN: Vergleich von Erst- und Zweittumor	54
3.2.1	Globale Instabilitätsrate von Erst- und Zweit malignomen.....	54
3.2.2	Vergleich der Instabilität einzelner Marker.....	55
3.2.3	Vergleich der Instabilität zwischen Erst- und Zweit malignom der einzelnen Patienten.....	57
3.2.4	Erweiterte Merkmalsdefinition	60

4	DISKUSSION	61
4.1	Einleitung.....	61
4.2	Diskussion der Thesen	61
4.3	Zusammenhang zwischen Instabilität am Primärtumor und zugehörigem Zweitmalignom.....	64
4.4	Schlussfolgerung.....	70
5	ZUSAMMENFASSUNG	72
6	ANHANG	74
7	LITERATUR.....	93
	DANKSAGUNG.....	111
	LEBENS LAUF	112

Abkürzungen

ALL	Akute lymphatische Leukämie
AML	Akute myeloische Leukämie
APE	Apurinische/ apyrimidinische Endonuklease
bp	Basepair
CDDP	Cis-Diaminodichloroplatin
dH₂O	destilliertes Wasser
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
DNA	Deoxyribonucleic acid
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EMAST	Elevated microsatellite alterations at selected tetranucleotides
EtOH	Ethanol
FAP	Familiäre adenomatöse Polyposis
GPOH	Gesellschaft für pädiatrische Onkologie und Hämatologie
HE	Hämatoxylin-Eosin
HNPCC	Hereditary non-polyposis colorectal cancer
IAA	Isoamyl-Alkohol
ICG-HNPCC	International collaborative group on hereditary non-polyposis colorectal cancer
IDL	Insertion/ deletion loop
kDa	kilo-Dalton
Mb	Megabasen
MDS	Myelodysplastisches Syndrom
MMR	Mismatch-Repair
MSI	Mikrosatelliteninstabilität
MSI-H	High microsatellite instability
MSI-L	Low microsatellite instability
MSS	Microsatellite-stable
NCI	National Cancer Institute
NF-1	Neurofibromatose I
NF-2	Neurofibromatose II
NHL	Non-Hodgkin Lymphom
PCR	Polymerase chain reaction
rpm	Rounds per minute
s	Standardabweichung
SIR	Standardized incidence ratio
SLS	Sample-Loading-Solution
SPN	Second malignant neoplasm
t-AML	Therapie-assoziierte akute myeloische Leukämie
TE	Tris-EDTA-Puffer
ZNS	Zentrales Nervensystem

1 Einleitung

Die Lebenszeitprävalenz eines in diesem Jahrtausend in den USA geborenen Mannes ein Malignom zu entwickeln, beträgt 40,35%; für beide Geschlechter gilt: einer von zweien wird in seinem Leben einmal eine Krebserkrankung erleiden ^[134]. Aber auch für das Gesundheitssystem sind Malignome ein wesentlicher Bestandteil in der Kostenkalkulation. 210 € wurden im Jahr 2006 in Deutschland pro Kopf für die Therapie von Neubildungen ausgegeben, damit liegen Malignome auf Platz fünf der Krankheitskosten im deutschen Gesundheitswesen ^[161]. Trotz dieser beeindruckenden Zahlen kann man nicht ermessen, was es für den Einzelnen bedeutet, mit der Diagnose Krebs konfrontiert zu werden. Zu unterschiedlich sind die betroffenen Menschen, zu unterschiedlich die individuellen Ängste, die mit diesem Thema verbunden sind. In jedem Fall aber handelt es sich hierbei um eine Erkrankung, deren Relevanz nicht hoch genug eingeschätzt werden kann.

1.1 Krebs bei Kindern

Dies gilt in besonderem Maße für Kinder. Hier stellt die Diagnose eine extreme Belastung für die gesamte Familie dar ^[83]. Zudem steht der Mensch, der hier betroffen ist, noch ganz am Anfang seines Lebens. Eventuelle Komplikationen und Spätfolgen der Therapie haben angesichts dieser Tatsache eine ganz andere Bedeutung als bei älteren Patienten. Noch vor 30 Jahren bedeutete die Diagnose „Krebs“ bei Jugendlichen und Kindern ein nahezu sicheres Todesurteil. Nun, nach langen Jahren an Forschung, Entwicklung neuer Therapien und besserer Diagnostik, Bündelung von Kompetenzen an Zentrumskliniken, Vernetzung von Forschung und Klinik in Therapieoptimierungsstudien, hat sich die Prognose deutlich verbessert, so dass heute etwa 75% der Kinder mit maligner Erkrankung dauerhaft geheilt werden können ^[34]. Dennoch bleibt Krebs eine vital bedrohliche Erkrankung. Viele Aspekte sind nach wie vor unverstanden und bedürfen weiterer, intensiver Forschungsarbeit.

1.1.1 Ätiologie

Dazu zählt auch die Ätiologie von kindlichen Tumoren. Diese ist weiterhin weitgehend ungeklärt ^[56]. Allgemein handelt es sich bei der Entstehung sowohl der kindlichen Tumoren als auch bei der Erwachsener stets um das Zusammenspiel von Genetik (endogener Faktor) und verschiedenen Umwelteinflüssen (exogener Faktor) ^[52].

1.1.1.1 Umwelteinflüsse bei der Entstehung von Malignomen

Umweltfaktoren spielen bei bestimmten Malignomen des Erwachsenenalters, wie zum Beispiel dem Bronchialkarzinom oder bestimmten Hauttumoren, eine entscheidende Rolle. Dabei müssen die jeweiligen Noxen jahrzehntelang einwirken um durch eine Reihe von konsekutiven Mutationen eine Zelle entarten zu lassen. Dies ist besonders gut belegt für Zigarettenrauch und die Entstehung des Bronchialkarzinoms. Rauchen ist die Hauptursache für die Entstehung von 90% der Bronchialkarzinome beim Mann und für 79% bei der Frau ^[119]. Dabei spielt auch der Zeitraum der Exposition der jeweiligen Noxe, hier des Zigarettenrauchs, eine entscheidende Rolle ^[150]. Auch für Hauttumoren ist der Einfluss von Umweltfaktoren gut belegt. Hier steigt das Risiko für die Entstehung eines Basalzell- oder Plattenepithelkarzinoms mit der chronischen Exposition von UV-Strahlung. Auch beim malignen Melanom spielt solares UV-Licht eine entscheidende Rolle, wenngleich hier nicht eine dauerhafte, sondern eine wiederkehrende Exposition begünstigend für die Tumorentstehung wirkt ^[136]. Anhand dieser Beispiele wird klar, dass der Einfluss der Umwelt auf die Entstehung kindlicher Malignome nicht wesentlich sein kann, da die erforderliche Exposition nicht erreicht wird.

Ionisierende Strahlung verursacht DNA-Schäden, die in der Folge von Enzymkomplexen des Körpers repariert werden müssen. Gelingt dies nicht oder nur fehlerhaft, können dadurch Zellwachstum und Zellteilung beeinflusst werden und damit die Entstehung von Tumoren begünstigt beziehungsweise ausgelöst werden. Je höher die Dosis der Strahlung und je mehr Zellen betroffen sind, umso höher ist das Risiko.

Ionisierende Strahlung gilt als einer der wenigen bekannten Risikofaktoren für die Entstehung von Krebs bei Kindern, was am Beispiel der Leukämien für die Zeit in utero gezeigt werden konnte [16, 116, 162, 176]. Nach neueren Untersuchungen ist ionisierende Strahlung jedoch kein wesentlicher Risikofaktor für die Entstehung kindlicher Tumoren in Deutschland, betrachtet man den gesamten Zeitraum vor der Geburt (Exposition der Eltern) sowie nach der Geburt (beispielsweise Röntgenuntersuchungen des Kindes): der durch ionisierende Strahlung ausgelöste Anteil aller kindlicher Leukämien beträgt weniger als zwei Prozent [108].

1.1.1.2 Genetische Einflüsse bei der Entstehung von Malignomen

Malignes Wachstum entsteht dann, wenn mehrere Mutationen im Genom auftreten, die das Zellwachstum beziehungsweise dessen Regulation in Richtung Proliferation verändern, die also in einem Onkogen, Tumorsuppressorgen oder einem DNA-Stabilitätsgen auftreten [179].

Onkogene sind Gene des Wachstums; sind sie aktiviert, überwiegen die Proliferationsreize einer Zelle. Maligne Entartung durch Mutation eines Onkogens also setzt dessen Überexpression oder aberrante (Re-)aktivierung voraus, beispielsweise durch Translokation, Gen-Amplifikation oder durch Mutation in einem Abschnitt, der die Aktivität des Onkogens regelt. Es genügt die erhöhte Aktivität eines Allels, um einen Wachstumsvorteil und damit ein erhöhtes Tumorrisiko zu schaffen.

Tumorsuppressorgene regulieren die Proliferation der Zelle herab. Entsteht Krebs durch Mutation eines Tumorsuppressorgens wurde dieses also inaktiviert. Dies kann durch sogenannte „missense“-Mutationen des Abschnitts, der die Aktivität des Gens reguliert, oder des Tumorsuppressorgens selbst, oder durch epigenetische Silenzierung geschehen. Dabei gibt es zwar Hinweise, dass ein betroffenes Allel ausreicht [148], im Allgemeinen aber gilt, dass beide Allele eines Tumorsuppressorgens inaktiv sein müssen [179].

DNA-Stabilitätsgene („caretakers“) sind Gene, die die genetische Stabilität gewährleisten, indem sie an der DNA beispielsweise durch Umwelteinflüsse (siehe auch 1.1.1.1) entstandene Fehler reparieren. Sind sie inaktiviert erhöht sich also die Mutationsrate und damit die Wahrscheinlichkeit des Defekts eines

Onko- oder Tumorsuppressorgens, wodurch die Entstehung eines Tumors begünstigt wird. Zu den Stabilitätsgenen zählen auch die in dieser Arbeit untersuchten Mismatch-Repair-Gene (MMR).

Wodurch nun aber bei Kindern eine dieser Mutationen und epigenetische Alterationen ausgelöst werden, ist bislang unklar, da Umweltfaktoren, wie oben bereits erläutert, nur eine geringe Rolle spielen.

1.1.1.3 Genetische Tumorsyndrome

Unter genetischen Tumorsyndromen versteht man das gehäufte Auftreten von Krebserkrankungen bei Individuen mit einem bestimmten genetischen Muster. Genetische Tumorsyndrome sind allerdings nur für eine kleine Minderheit von circa drei Prozent der kindlichen Tumoren verantwortlich. Die drei häufigsten Syndrome, assoziiert mit dem gehäuften Auftreten von Tumoren, sind das bilaterale Retinoblastom, das Down-Syndrom und die Neurofibromatose ^[113]. Diese sind zusammen für mehr als 75% aller Tumoren, die im Zusammenhang mit einem Tumorsyndrom auftreten, verantwortlich ^[113]. Außerdem werden an dieser Stelle drei weitere Tumorsyndrome besprochen, die im Zusammenhang mit pädiatrischen Sekundärmalignomen in der Literatur genannt werden ^[15, 50].

§ Bilaterales Retinoblastom

Auf Chromosom 13 liegt das Retinoblastom-Gen (Rb-Gen), bei dessen komplettem Ausfall es zur Entstehung eines Retinoblastoms kommt.

Bei der erblichen Form ist ein Allel des Retinoblastom-Gens auf Chromosom 13 aufgrund einer Keimbahnmutation oder -deletion ausgefallen, d.h. es ist in jeder Zelle nur noch ein funktionelles Retinoblastomgen, d.h. das des anderen Allels, vorhanden, so dass der Verlust dieses zweiten Gens in einer beliebigen Retinazelle zur Entstehung des Retinoblastoms führt (Knudson's two-hit hypothesis).

Die Inzidenz liegt bei 0,4 auf 100.000 Kinder unter 15 Jahren, das Hauptmanifestationsalter liegt im ersten Lebensjahr ^[155].

§ Down-Syndrom

Die Trisomie 21 stellt mit einer Inzidenz von 10 von 100.000 Geburten die häufigste Chromosomenomalie in den USA dar ^[48]. Unter Patienten mit Down-Syndrom ist das Risiko für myeloische Leukämien um das

zehn- bis zwanzigfache erhöht ^[138]; die höchste Inzidenz liegt bei Kindern jünger als fünf Jahre ^[141].

§ Neurofibromatose

Hierbei handelt es sich um eine autosomal-dominant vererbte Phakomatose, mit einer Spontanmutationsrate von 50%. Es werden zwei Typen unterschieden:

Neurofibromatose I (NF-1). Diese stellt mit einer Inzidenz von 1 auf 3.500 Neugeborene 90% der Neurofibromatosen ^[185]. Ursächlich liegt diesem Typ ein Gendefekt auf Chromosom 17 zugrunde. Die Erkrankung beginnt zunächst mit Neurinomen und Neurofibromen, die im Verlauf teilweise maligne entarten. Außerdem können sich ZNS-Tumore, insbesondere Astrozytome zeigen.

Neurofibromatose II (NF-2). Die Inzidenz beträgt 1 von 33.000 bis 40.000 Neugeborenen ^[185] und ist damit deutlich seltener als die Neurofibromatose I. Das hier verantwortliche Gen liegt auf Chromosom 22. Es bilden sich zentrale und periphere Neurinome, wobei für die NF-2 bilaterale Akustikusneurinome charakteristisch sind ^[156].

§ Li-Fraumeni-Syndrom

Hierbei handelt es sich um eine Mutation des TP53-Gens, eines Tumorsuppressorgens, das die DNA-Reparatur einleitet bzw. bei irreparablen Schädigungen Apoptose induziert und somit den Organismus vor Entartung schützt. Durch die Schädigung dieses Gens haben Patienten eine allgemein erhöhte Suszeptibilität gegenüber verschiedenen Tumoren wie Mammakarzinom, Knochen-, ZNS- und Lungentumoren ^[104].

§ Ataxia teleangiectasia

Bei dieser Erkrankung ist das ATM-Gen mutiert, welches bei Bestrahlung das Tumorsuppressorgen p53 stabilisiert. Dieser Mechanismus erklärt, dass Patienten mit Ataxia teleangiectasia besonders nach Strahlentherapie Sekundärmalignome entwickeln. Zum klinischen Bild dieser autosomal-rezessiv vererbten Erkrankung gehören früh auftretende zerebellar-extrapyramidal-motorische Störungen,

okulokutane Teleangiektasien, erhöhte Vulnerabilität gegenüber bronchpulmonalen Infekten sowie Lymphome^[95].

§ Xeroderma pigmentosum

Dabei handelt es sich um eine autosomal-rezessiv vererbte Lichtüberempfindlichkeit. Es entwickeln sich aufgrund eines Mangels an DNA-Endonuklease mit konsekutiven DNA-Schäden nach UV-Belastung der Haut zunächst Pigmentstörungen, später dann maligne Hauttumore wie Plattenepithelkarzinom und malignes Melanom. Die malignen Erkrankungen treten bei der klassischen Xeroderma pigmentosum typischerweise vor dem 10. Lebensjahr auf^[55, 72].

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass jeder malignen Erkrankung genetische Störungen im Sinne von DNA-Mutationen und epigenetischen Aberrationen zugrunde liegen, die zu einer Dysregulation des Zellwachstums führen mit vermehrter Proliferation und verminderter Apoptose. Was allerdings diese genetischen Fehler auslöst, ist letztendlich unklar. Umwelteinflüsse und genetische Prädisposition bei bestimmten Syndromen wurden genannt, können jedoch nur einen sehr kleinen Teil der Fälle erklären.

Die Ätiologie kindlicher Tumoren ist also bis heute noch in weiten Teilen ungeklärt und Gegenstand der aktuellen Forschung.

1.1.2 Entitäten und Inzidenz

Krebs bei Kindern ist im Vergleich mit der Häufigkeit bei Erwachsenen eine seltene Erkrankung. Seine Bedeutung ist dennoch immens, sind Malignome nach Unfällen doch die zweithäufigste Todesursache im Kindesalter^[155].

Die Wahrscheinlichkeit für ein Neugeborenes bis zu seinem 15. Lebensjahr an Krebs zu erkranken, beträgt 0,2%, dies entspricht etwa jedem 470. Kind. Im Jahr 2004 kamen in Deutschland auf 100.000 Kinder (jünger als 15 Lebensjahre) 15,0 Krebserkrankungen. Die Inzidenz ist allerdings altersabhängig; sie beträgt für Säuglinge (Kinder <1 Jahr) 25/100.000 und fällt dann kontinuierlich bis zum zehnten Lebensjahr auf etwa 10/100.000, um dann bis zum Alter von 14 Jahren wieder auf 12/100.000 anzusteigen^[41]. Dies gilt für die Summe aller Malignome. Das Hodgkin-Lymphom und maligne

Knochtumoren beispielsweise zeigen ihre höchste Inzidenz bei älteren Kindern, wohingegen das Neuroblastom und der Wilms-Tumor bei eher kleinen Kindern auftreten ^[155]. Jungen sind häufiger betroffen als Mädchen, der Geschlechtsindex (Jungen : Mädchen) beträgt 1,2 ^[41].

Überwiegen bei Erwachsenen die Karzinome, so sind bei Kindern solide Malignome meist embryonalen Ursprungs, wobei sie seltener auftreten als hämatologische Malignome ^[56]: die häufigsten malignen Erkrankungen bei Kindern sind Leukämien, ZNS-Tumoren, Lymphome, Neuroblastome, Weichteilsarkome, Nierentumore und Knochtumore ^[41]. Einen Überblick über die häufigsten Entitäten gibt **Tabelle 1**.

Tabelle 1. Entitäten bei Krebserkrankungen im Kindesalter

Legende: *) altersstandardisiert. Standard: Westdeutschland 1987

Tabelle modifiziert nach Kaatsch, P. et al. Jahresbericht 2005 (Kinderkrebsregister) ^[79]

Diagnosen	Anzahl der Fälle 1980-2004		Inzidenzraten 1995-2004	
	absolut	relativ ^[137]	altersstandard. *)	kumulativ
Leukämien	12716	34,2	4,8	71,7
Lymphome	4557	12,3	1,7	24,9
ZNS-Tumoren	7431	20,0	3,0	45,5
Sympathikus-Tumoren	2979	8,0	1,3	19,0
Retinoblastom	848	2,3	0,3	4,6
Nierentumoren	2306	6,2	0,9	13,4
Lebertumoren	382	1,0	0,2	2,3
Knochtumoren	1816	4,9	0,6	9,0
Weichteilsarkome	2454	6,6	1,0	14,3
Keimzelltumoren	1219	3,3	0,5	7,2
Karzinome	42	1,1	0,2	2,8
Andere	40	0,1	0,0	0,3
Gesamt	37168	100,0	14,4	215,0

Aufgrund der geringen Fallzahlen werden die Patienten prinzipiell in spezialisierten Zentren betreut. So betreuen die sechs größten Zentren in Deutschland 25% aller Patienten; die weit überwiegende Zahl der Patienten (90%) wird an 47 Zentren behandelt ^[41]. Die Therapie erfolgt überwiegend im Rahmen von Studien. Dies erklärt sich aus den geringen Häufigkeit der einzelnen Krebsentitäten:

zur Erlangung einer signifikanten Aussage einer Studie bedarf es einer gewissen Anzahl an Studienteilnehmern, die hier nur durch das Zusammenfassen möglichst aller Erkrankter auf nationaler und zunehmend auch auf europäischer Ebene erreicht werden kann. Dadurch ist eine stetige Fortentwicklung und Optimierung der Therapie gewährleistet.

Tatsächlich konnte die Therapie ständig verbessert werden. Bessere Diagnostik und verbesserte Therapiekonzepte führten in den letzten 35 Jahren zu deutlich gestiegenen Heilungschancen von kindlichen Krebserkrankungen^[50]. Betrug in Deutschland die 10-Jahres-Überlebenswahrscheinlichkeit bei Kindern, die Mitte der 1980er Jahre an einem Malignom erkrankten, noch 67%, waren es Ende der 1990er Jahre bereits 76%. Aktuell liegt sie für den Zeitraum von 1999-2003 bei 78%^[41]. Betrachtet man den Zeitraum vor Gründung des Deutschen Kinderkrebsregisters, so stieg in Großbritannien die 5-Jahresüberlebenswahrscheinlichkeit nach Einführung der Chemotherapie von 26% im Zeitraum von 1962-1970 auf 50% zwischen 1971-1985 bzw. 65% in den Jahren 1986-1988^[64].

1.2 Sekundärmalignome

Das in Kapitel 1.1.2 geschilderte, kontinuierlich verbesserte Outcome führt zu einer Zunahme der Gruppe derer, die in ihrer Kindheit an einem Malignom erkrankt waren und geheilt wurden, auf einen Anteil von heute etwa 1:1000 der Gesamtbevölkerung^[64]. Damit steigt aber auch die Zahl der Komplikationen und Folgeerkrankungen, die aus der Grunderkrankung bzw. deren Therapie erwachsen, deren schwerwiegendste sicherlich die Entstehung eines Zweitmalignoms darstellt^[15].

1.2.1 Definition und Epidemiologie

Als Zweitmalignom (second primary neoplasm, SPN) bezeichnet man eine Neoplasie, die nach einer bereits bestehenden oder überstandenen Tumorerkrankung auftritt und sich histologisch vom Primärtumor unterscheidet. In den USA stehen die Zweitmalignome bereits an vierter oder fünfter Stelle der häufigsten Tumoren und machen insgesamt einen Anteil von etwa 6-10% aller diagnostizierten malignen neoplastischen Erkrankungen aus^[116]. Vergleicht

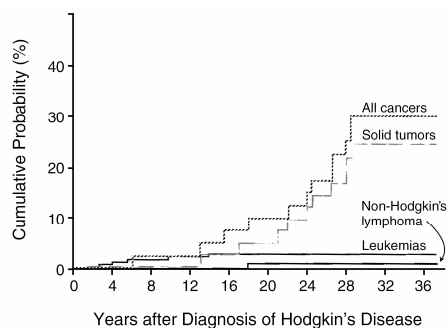
man nun erwachsene Tumorpatienten, die ihre Erkrankung überlebt haben, mit der hinsichtlich Alter und Geschlecht abgestimmten Normalbevölkerung, so zeigen diese kein ^[147] oder ein nur leicht ^[35, 43], d.h. weniger als zweifach, erhöhtes Risiko für die Entwicklung eines Sekundärmalignoms.

Bei Kindern dagegen ist die Zweitmalignomrate drei- bis sechsfach gegenüber dem Krebsrisiko der Normalbevölkerung erhöht ^[15]. Allerdings nähert sich dieses Risiko dem der Normalbevölkerung über die Jahrzehnte der Nachsorge an; so sinkt der standardisierte Inzidenz-Quotient (standardized incidence ratio, SIR), der angibt, um wie viel die Wahrscheinlichkeit nach einer Ersterkrankung im Kindesalter ein Sekundärmalignom zu entwickeln gegenüber der Normalbevölkerung erhöht ist, von 10,2 drei bis neun Jahre nach Diagnosestellung auf 2,4 nach mehr als dreißig Jahren der Nachsorge ^[76]. Damit liegt der SIR aber auch nach mehr als dreißig Jahren über dem der Patienten, die ihre Ersterkrankung im Erwachsenenalter hatten (siehe oben und ^[35, 43, 147]).

Nach Hodgkin-Lymphomen steigt indes die Inzidenz solider Sekundärmalignome mit einer Latenz von ca. 15 Jahren an, während die Inzidenz der Entartungen des blutbildenden Systems zwar mit geringerer Latenz, aber nicht so stark ansteigt (siehe Abbildung 1) ^[14].

Abbildung 1. Kumulatives Risiko für die Entwicklung eines Sekundärmalignoms bei 1380 pädiatrischen Hodgkin-Patienten

Abbildung aus Bhatia, S. und Sklar, C. in Nat Rev Cancer (2002) ^[15]



Dabei ist die absolute Anzahl der Fälle von Sekundärmalignomen nach Krebserkrankung im Kindesalter relativ gering; in den USA und Kanada

kommen auf 1000 Jahre Nachsorge nur 1,88 zusätzliche Tumorerkrankungen ^[114]. Allerdings zeigen diese Sekundärtumoren ein deutlich schlechteres Überleben, als es bei diesen Tumorentitäten zu erwarten wäre, wenn sie als primäre Erkrankung auftreten. Zum Zeitpunkt der Erhebung lebten von den Patienten, die bis dahin kein Sekundärmalignom entwickelt haben, noch 91,9% im Gegensatz zu 59,4% derer mit Zweittumor ^[114]. Dies unterstreicht eindrucksvoll die klinische Bedeutung dieses Themas.

Die Häufigkeit der Sekundärtumoren im Kindesalter beträgt 278 Fälle von 16541 nachbeobachteten Patienten bei einer mittleren Nachbeobachtungszeit von 10 Jahren, es sind dabei etwas mehr Jungen als Mädchen betroffen (männlich:weiblich=1,2). Die Patienten sind bei Diagnose des Ersttumors durchschnittlich 6,7 Jahre alt ^[76]. Der durchschnittliche Erkrankungszeitpunkt für den Zweittumor liegt bei 5,2 Jahren nach der Erstdiagnose; auch hier treten Leukämien nach durchschnittlich 3,3 Jahren etwas früher auf als solide Tumoren, die im Schnitt nach 6,5 Jahren diagnostiziert werden ^[84].

1.2.2 Entitäten der Sekundärmalignome

1.2.2.1 Überblick über alle Sekundärmalignome

Wie in Kapitel 1.1, **Tabelle 1** dargestellt, sind Leukämien (34%), ZNS-Tumoren (20%) und Lymphome (12%) die häufigsten Tumorentitäten im Kindesalter. Bei den Sekundärmalignomen nach Ersttumor im Kindesalter verändert sich das Bild mit Zunahme des Beobachtungszeitraums. So stehen nach einer Nachsorgedauer mit einem Median von sechs Jahren die Leukämien (35%) an erster Stelle der Sekundärmalignome vor ZNS-Tumoren (22%) und den Karzinomen sowie Lymphomen (jeweils 13%) ^[84]. Es zeigt sich dabei also nur eine geringe Verschiebung zu den Ersttumoren, die insbesondere das gehäufte Auftreten der Karzinome betrifft, die bei den Ersttumoren nur 1% ausmachen ^[41].

Ist dagegen der Median auf 15,4 Jahre mehr als verzweifacht, so steht an erster Stelle das Mammakarzinom (20%), gefolgt von Schilddrüsenkarzinom (14%) und ZNS-Tumoren (12%); die zuvor häufigsten Leukämien liegen nun mit 8% an vierter Stelle ^[114]. Es zeigt sich nun also ein ganz anderes Bild als zu Beginn.

Diese Daten stammen aus epidemiologischen Studien vergleichbarer Größe und nahezu zeitgleicher Publikation.

Zum einen handelt es sich dabei um die Veröffentlichungen des deutschen Kinderkrebsregisters in Mainz aus dem Jahr 2003 mit einem Kollektiv von 24.203 Kindern, Jugendlichen und jungen Erwachsenen (bei Diagnose jünger als 25 Lebensjahre), die zwischen 1980 und 1998 in Deutschland, der Schweiz, Österreich und den Niederlanden an Krebs erkrankt waren. Die mediane Nachbeobachtungszeit betrug 6 Jahre, dabei wurde das Auftreten von 276 Zweitneoplasien beobachtet, wofür keine Altersgrenze als Einschlusskriterium bestand ^[84].

Zum anderen wird die „Childhood Cancer Survivor Study“ aus dem Jahr 2001 angeführt, die zwischen 1970 und 1986 13.581 Kinder, Jugendliche und junge Erwachsene (bei Diagnose jünger als 21 Lebensjahre) an Zentren in den USA und Kanada im Median 15,4 Jahre nachbeobachtete und dabei das Auftreten von 298 Sekundärmalignomen mit einem mittleren Erkrankungsalter von 23,3 Jahren feststellte ^[114].

Die unterschiedlichen Ergebnisse der beiden Studien können also einerseits auf die unterschiedliche Dauer der Nachbeobachtung zurückgeführt werden, wie eine Langzeitstudie aus Großbritannien gezeigt hat. Teilt man demnach den Zeitraum der Nachsorge in Jahrzehnte ein, so zeigen sich für die ersten zehn Jahre nach Diagnosestellung ZNS-Tumoren als häufigste Entität der Sekundärmalignome, 10-19 Jahre später Knochentumoren und 20 Jahre oder später Tumoren des Gastrointestinaltraktes ^[76]. Andererseits kann aber auch der unterschiedliche Erfassungszeitraum eine Rolle spielen. Werden nämlich die Ersttumoren nach dem jeweiligen Diagnosezeitraum zusammengefasst, so ergibt sich für die jeweilige Kohorte ein unterschiedliches Spektrum an Zweittumoren. Für den Zeitraum vor 1970 stehen die gastrointestinalen Zweitneoplasien an erster Stelle der Häufigkeitsverteilung, in den siebziger Jahren dann sind es die ZNS-Tumoren und zwischen 1980 und 1987 die Leukämien. Von den Autoren wird dies auf unterschiedliche Therapieregimes in den einzelnen Jahrzehnten zurückgeführt; so wurde in den 1970ern, als die Chemotherapie aufkam, zunächst überwiegend eine Monotherapie angewandt,

während ab 1980 zunehmend mehrere Chemotherapeutika gemeinsam eingesetzt wurden ^[76].

1.2.2.2 Entitäten in Abhängigkeit des jeweiligen Primärtumors

Entscheidend für die Art des Sekundärmalignoms ist der zugrundeliegende Primärtumor. Häufig ist die Entität des Primärtumors mit einer bestimmten Entität des Zweitmalignoms assoziiert. Eine Übersicht über die Zweittumoren und die häufig zugrunde liegenden Ersttumoren gibt Tabelle 2.

Tabelle 2. Sekundärtumore mit häufigen Primärtumoren

Legende: Abkürzungen: ZNS: zentrales Nervensystem; ALL: akute lymphatische Leukämie.

Tabelle modifiziert nach Bhatia, S. und Sklar, C. in Nat Rev Cancer (2002) ^[15]

Sekundärtumor	häufige Primärtumore
ZNS-Tumore	ALL; Hodgkin-Lymphom; ZNS-Tumore
MDS/AML	ALL; Hodgkin-Lymphom; ZNS-Tumore
Mammakarzinom	ALL; Hodgkin-Lymphom; Non-Hodgkin-Lymphome; ZNS-Tumore; Knochentumore; Weichteilsarkome; Wilms-Tumor
Schilddrüsenkarzinom	ALL; Hodgkin-Lymphom; Non-Hodgkin-Lymphome; Knochentumore; Weichteilsarkome; Neuroblastom
Knochentumore	ALL; Knochentumore; Weichteilsarkome; (erbliches) Retinoblastom
Weichteilsarkome	ALL; Hodgkin-Lymphom; Knochentumore; Weichteilsarkome; Wilms-Tumor; (erbliche) Retinoblastome

Dabei ist, wie bei den Tumorsyndromen (siehe Kapitel 1.2.2.3), wiederum der Zusammenhang mit der Therapie wichtig. Es ist unklar, ob der Ersttumor eine unabhängige Variable für die Entstehung eines bestimmten Zweittumortyps ist, oder ob die für die jeweilige Erkrankung durchgeführte Therapie der entscheidende Grund für die Entwicklung eines spezifischen Sekundärmalignomes ist ^[15]. So sind beispielsweise Topoisomerasehemmer für die häufig genannten Sekundärleukämien prädisponierend. Eine Übersicht über Therapie und damit zusammenhängende Sekundärmalignome kann Tabelle 3 geben. In Kapitel 1.2.3 wird auf den Zusammenhang von Therapie und

Sekundärmalignom in der Folge ausführlich eingegangen, da die Therapie ausschlaggebend für die Entstehung weiterer Neoplasien ist.

Tabelle 3. Sekundärmalignome und prädisponierende Therapie

Legende: Abkürzungen: ZNS: zentrales Nervensystem; MDS: myelodysplastisches Syndrom; AML: akute myeloische Leukämie.

Tabelle modifiziert nach Bhatia, S. und Sklar, C. in Nat Rev Cancer (2002) ^[15]

Therapie	korrespondierendes Sekundärmalignom
Bestrahlung	ZNS-Tumoren; Mammakarzinom; Schilddrüsenkarzinom; Knochentumoren; Weichteilsarkome (je nach Bestrahlungsfeld)
Alkylantien	MDS/AML; Knochentumoren
Topoisomerase-II-Inhibitoren	MDS/AML
Anthrazykline	Weichteilsarkome

1.2.2.3 Entitäten bei Tumorsyndromen

Auch eine zugrundeliegende genetische Erkrankung kann, häufig in Zusammenhang mit einer bestimmten Therapieform, zu bestimmten Sekundärmalignomen prädisponieren. So häufen sich unter Patienten mit Defekt des Retinoblastom-Gens, die im Rahmen ihrer Behandlung bestrahlt wurden, Sarkome als Zweitneoplasien ^[186]. Patienten mit Li-Fraumeni-Syndrom sind aufgrund ihrer Erkrankung, einem Defekt des TP53-Tumor-Supressor-Gens, per se für die Entstehung von Tumoren empfänglich. Besonders vulnerabel sind diese Patienten gegenüber der Therapie einer Krebserkrankung im Kindesalter; die Zweittumoren entstammen dann meist dem für Li-Fraumeni typischen Spektrum (Mammakarzinom bei jungen Frauen, Weichteilsarkome bei Kindern) ^[15]. Schließlich tragen Patienten mit Ataxia-Teleangiektatika (Louis-Bar-Syndrom), wiederum im Zusammenhang mit Bestrahlung, sehr häufig in der Folge des Primärtumors ein erhöhtes Risiko für die Entwicklung von Mammakarzinomen ^[167].

1.2.3 Risikofaktoren für die Entwicklung eines Sekundärmalignoms

Die Entstehung eines Sekundärmalignoms ist an verschiedene Risikofaktoren geknüpft, von denen die meisten direkt mit dem Ersttumor zusammenhängen. Wie in Kapitel 1.2.2 ausgeführt, stellen die Art des Ersttumors sowie dessen Therapie die entscheidenden Variablen dar.

1.2.3.1 Geschlecht

Mädchen und Frauen zeigen ein erhöhtes Risiko für die Entwicklung von Sekundärmalignomen, zumindest was Brust- und Schilddrüsenkrebs als Zweitumor angeht ^[14]. Dies kann, wie Studien an erwachsenen Krebsüberlebenden zeigen, an der allgemein erhöhten Vulnerabilität von Frauen gegenüber der Entwicklung von Krebs liegen, was möglicherweise verursacht wird durch eine erhöhte Aktivität von Cytochrom P450 und anderen Enzymen, eine erhöhte Bildung von DNA-Bindungen, eine erhöhte Mutationsraten bei TP53 und vor allem den Auswirkungen von Hormonen, besonders Östrogenen, auf das Tumorwachstum ^[190].

1.2.3.2 Alter

Auch das Alter ist ein wichtiger Risikofaktor für die Entstehung von Zweitmalignomen. Je jünger die Kinder bei Diagnose, desto höher das Risiko für die Entwicklung pädiatrischer Sekundärneoplasien ^[18, 76, 114, 115, 129, 140, 172]. Dies scheint insbesondere für Kinder zu gelten, deren Ersttumor mit Strahlentherapie behandelt wurde. Ursache dafür könnte die erhöhte Vulnerabilität des betroffenen Gewebes sein, die erhöhte Zellteilungsrate im jüngeren Kindesalter oder die längere Zeit der Nachsorge, was späte Komplikationen eintreten lässt ^[15]. Bei der Chemotherapie ist dagegen höheres Alter mit einem erhöhtem Risiko verbunden ^[13, 37, 60, 146, 149, 175, 184] (siehe auch Kapitel 1.2.3.4).

1.2.3.3 Art des Primärtumors

Wie in Kapitel 1.1.2 dargestellt, zählen die Leukämien und ZNS-Tumore zu den häufigsten Malignomen des Kindesalters. Bei den Tumoren, denen gehäuft ein

pädiatrisches Sekundärmalignom folgt, sind beide Entitäten jedoch unterproportional vertreten. Es sind vielmehr die Hodgkin-Lymphome und Weichteilsarkome, die ein höheres Risiko für eine weitere maligne Entartung zeigen und, gemessen an ihrem primären Auftreten, als Vorläufer für Sekundärmalignome überrepräsentiert sind ^[114]. Ob dabei aber wirklich die Art des Ersttumors eine unabhängige Variable darstellt oder ob vielmehr die durchgeführte Therapie, die ja von der Diagnose abhängt, entscheidend ist, ist, wie oben ausgeführt, bislang unklar ^[15].

1.2.3.4 Therapie des Primärtumors

Die Therapie kindlicher Malignome besteht in der Regel aus Chemotherapie, je nach Entität und Stadium kombiniert mit Bestrahlung und bei soliden Tumoren mit einer chirurgischen Therapie. Dabei ist das Risiko für ein Zweitmalignom gegenüber der Normalbevölkerung nach Radiotherapie um das sechsfache erhöht; alleinige Chemotherapie zeigt ein relatives Risiko von 7,4 und werden sowohl Chemo als auch Bestrahlung eingesetzt, ergibt sich ein 12,5-faches Risiko. Allerdings ist das Zweitmalignomrisiko nach einer malignen Erkrankung bereits ohne Bestrahlung und ohne Chemotherapie um mehr als das dreifache (SIR=3,3) erhöht ^[76].

Für die Strahlentherapie gilt, dass einzelne Organsysteme gegenüber der karzinogenen Wirkung unterschiedlich vulnerabel sind. Dabei kommen die Sekundärmalignome überwiegend im bestrahlten Feld oder an dessen Rand vor; die Wahrscheinlichkeit für ein Sekundärmalignom steigt mit der Dosis ^[22, 58, 62, 65, 82, 100, 109, 157, 173, 174] und verhält sich umgekehrt zum Alter der Patienten: je jünger die Kinder, desto höher ist das Risiko ^[14, 18, 94, 115, 129, 140, 164, 172, 186]. Zwischen Zeitpunkt der Bestrahlung und der Diagnose des Zweittumors liegt meist eine Latenz von mehreren Jahren; beim Hodgkin-Lymphom beträgt sie im Mittel zehn Jahre ^[14, 15, 62, 109, 114].

Bei Chemotherapie weisen einzelne Bestandteile starke Unterschiede hinsichtlich des Risikoprofils auf. Klare Risikofaktoren hierbei sind Alkylantien und Topoisomerase-II-Inhibitoren. Diese erhöhen das Risiko insbesondere für Myelodysplasien, AML bzw. Leukämien allgemein, sowie für Knochen- und Blasenkrebs. Für Alkylantien gilt, dass das Risiko mit der Dosis und, umgekehrt

wie bei der Radiotherapie, auch mit dem Alter der Patienten zunimmt. Die Sekundärmalignome treten im Mittel nach einer Latenz von vier bis sechs Jahren auf ^[15].

Eine weitere Therapieoption für Patienten mit Hochrisikomalignomen stellt die hämatopoetische Stammzelltransplantation dar. Kinder, die diese Prozedur durchlaufen, zeigen ein zwanzigfach erhöhtes Risiko für die Entwicklung eines Zweitmalignoms; nach 15 Jahren liegt das kumulative Risiko bei 11%. Je früher die Therapie durchgeführt wird, desto höher ist das Risiko. Die hämatopoetische Stammzelltransplantation ist häufig mit einer Ganzkörperbestrahlung und intensiver Chemotherapie verbunden, was das erhöhte Risiko allerdings nur teilweise erklärt, da das Risiko für Sekundärmalignome durch Chemo- und Radiotherapie allein nur um das 12,5-fache erhöht ist, siehe oben ^[159]. Eine weitere Ursache des erhöhten Sekundärmalignomrisikos nach hämatopoetischer Stammzelltransplantation stellt die Immunsuppression dar, unter der viele dieser Patienten stehen, sei es zur Vorbereitung auf die Transplantation oder zur Prophylaxe einer Graft-versus-Host-Reaktion ^[13, 40]. Dabei handelt es sich allerdings eher um einen indirekten Effekt der Therapie des Primärtumors. Ein weiteres „indirektes Risiko“ stellt die Posttransfusions-Hepatitis dar.

Einige Patienten haben unter der Therapie des Primärtumors einen bedeutenden Bluttransfusionsbedarf. Blutprodukte wurden zwar in den letzten Jahren immer sicherer, eine absolute Sicherheit gibt es jedoch nicht, so dass sich ein gewisser Teil derer, die Blutprodukte transfundiert bekommen, mit Hepatitis infiziert. Eine virale Hepatitis nun ist ein Risikofaktor für die Entstehung des hepatozellulären Karzinoms ^[50].

1.2.3.5 Familiäre Prädisposition und genetische Syndrome

Zwei Aspekte sprechen für eine familiäre Komponente bei der Entwicklung von Zweitmalignomen. Zum einen zeigen Kinder aus Familien, in denen Erst- und Einzelmalignome gehäuft in jungem Alter auftreten, ein erhöhtes Risiko für die Entwicklung von Sekundärmalignomen.

Zum anderen haben Kinder, die an einem Zweittumor erkrankt sind, signifikant häufiger Verwandte mit maligner Erkrankung. Gehäuft handelt es sich dabei um die Tumorentität, die bei den Kindern als Sekundärmalignom auftritt^[164].

Genetische Syndrome spielen – wie bei pädiatrischen Tumoren allgemein – auch bei Zweitmalignomen eine Rolle. Eine Übersicht über ausgewählte Tumorsyndrome wurde bereits in Kapitel 1.1.1.3 gegeben.

Tabelle 4. Übersicht über bekannte Ursachen von Sekundärmalignomen

Legende: Abkürzungen: NF-1: Neurofibromatose I; Rb: Retinoblastom.

Tabelle modifiziert nach Feig, S. A. in Blood Cells Mol Dis (2001)^[50]

Entstehungsmechanismen von Sekundärmalignomen
<u>in direktem Zusammenhang mit der Therapie</u> Bestrahlung Alkylantien Topoisomerase II - Inhibitoren
<u>in indirektem Zusammenhang mit der Therapie</u> Immunsuppression Hepatitis
<u>genetische Faktoren</u> NF-1, Rb, p53, Xeroderma pigmentosum Ataxia teleangiectatica

1.2.4 Zusammenfassung pädiatrische Malignome und Sekundärmalignome

Die verbesserte Therapie in der pädiatrischen Onkologie ist ein großer Erfolg, der in seiner Bedeutung nicht hoch genug eingeschätzt werden kann. So stieg in den letzten Jahren und Jahrzehnten nicht nur die Zahl der Überlebenden kindlicher Tumoren an, auch die Überlebensdauern nahmen kontinuierlich zu. Damit wuchs allerdings auch die Zahl der Sekundärmalignome stetig, was dieses Thema mehr und mehr in den Fokus der aktuellen Krebsforschung bringt. Aber nicht nur die wachsende Häufigkeit, auch die schlechtere Prognose

macht Sekundärmalignome zu einem Aspekt mit hoher Relevanz in der pädiatrischen Onkologie und Hämatologie.

Die Entitäten der Sekundärmalignome unterscheiden sich dabei von den häufigsten Tumorentitäten im Kindesalter und sind abhängig von der Art des Ersttumors sowie dessen Therapie. Bei Vorliegen eines genetischen Tumorsyndroms herrschen wiederum andere Verteilungen unter den Zweitneoplasien. Die absolute Häufigkeit von Sekundärneoplasien ist allerdings gering, nur etwa 1,5% der an einem pädiatrischen Malignom Erkrankten entwickelt im Lauf von 10 Jahren ein Sekundärmalignom ^[76]. Dabei sind einige Risikofaktoren bekannt: Geschlecht (Mädchen mehr als Jungen) und Alter, die Art des Primärtumors (Hodgkin-Lymphome als Entität mit dem höchsten Risiko) sowie familiäre Prädisposition und das Vorkommen genetischer Tumorsyndrome.

Dabei ist die Ätiologie der Sekundärmalignome in der überwiegenden Zahl der Fälle weiterhin unklar.

1.3 Mikrosatelliten-Instabilität

1.3.1 DNA-Mismatch-Reparatur (MMR)

Bei den DNA-Mismatch-Reparatur-Genen handelt es sich um DNA-Stabilitätsgene, sogenannte Caretaker-Gene, die Replikationsfehler und Schäden, die durch mutagene Noxen induziert wurden, reparieren und so die Stabilität des Erbguts gewährleisten (s. Kapitel 1.1.1.2).

Dabei ist das Konzept des Mismatch-Repair-Systems bereits seit 1964/1965 bekannt ^[132]. Es wurde zunächst an *Escherichia coli* erforscht, aber erst 1993 gelang es Fishel et al., den Genort eines Homologs des bereits bekannten Mismatch-Repair-Proteins mutS aus *E. coli* beim Menschen zu identifizieren ^[54].

1.3.1.1 Aufgaben des Mismatch-Repair-Systems

Die Aufgaben des Mismatch-Repair-Systems sind vielfältig und wurden zu einem großen Teil erst im letzten Jahrzehnt erforscht, was vornehmlich an prokaryontischen Zellen erfolgte ^[78]. Da das Mismatch-Repair-System durch die Evolution hoch konserviert ist ^[86, 110], lassen sich die Ergebnisse vielfach

übertragen, beziehungsweise ist eine gezielte Suche nach bestimmten Genen, Genprodukten und dann auch Wirkmechanismen dieser Proteine in Eukaryonten möglich ^[132].

In menschlichen Zellen sind Proteine des Mismatch-Repair-Systems an verschiedenen Prozessen beteiligt:

- § Korrektur von Fehlern bei der Replikation während der Zellteilung, vor allem in repetitiven DNA-Abschnitten
- § Zellantwort auf DNA-Schädigung (verursacht durch Methylierung, Cisplatin, wahrscheinlich auch durch ionisierende Strahlung, Topoisomerase-Hemmer, Antimetaboliten, UV-Strahlung sowie DNA-Interkalation ^[163])
- § Regulation der Rekombination während der Meiose
- § Initiierung des „cross-overs“ während der Meiose
- § Bildung der Antikörpervielfalt ^[78]

Dabei soll im Rahmen dieser Arbeit auf die ersten beiden Punkte eingegangen werden, da diese bei der Tumorigenese besonders relevant sind.

1.3.1.1.1 Korrektur von Fehlern bei der Replikation während der Zellteilung

Mikrosatelliten sind im gesamten Genom häufig vorkommende repetitive Sequenzen einfacher Nukleotidmuster wie $[CA]_n$, sogenannte Repeats (siehe auch Kapitel 1.3.2). Während der Replikation dieser Mikrosatelliten kann es vorkommen, dass der Polymerasenkomplex kurzzeitig von dem zu replizierenden Strang dissoziiert und sich falsch wieder anlagert ^[89], die Polymerase „rutscht“ gewissermaßen ^[73], so dass es zu Mikrosatelliten ungleicher Länge kommt ($[CA]_{n\pm x}$). Die DNA-Polymerase besitzt eine hohe Spezifität zu Nukleotiden, zudem entfernen Exonukleasen entstandene Fehler sofort (proofreading-function der DNA-Polymerase), so dass die Replikation normalerweise weitgehend fehlerfrei verläuft ^[77, 90]. Dennoch können, im gesamten Genom – nicht nur im Bereich der Mikrosatelliten – Fehler während der Replikation auftreten. Bei diesen seltenen Ereignissen handelt es sich meist um so genannte „mismatches“, d.h. falsch eingebaute Basenpaare, die nicht komplementär sind, oder um ungepaarte Nukleotide, die durch Deletion oder Addition von Nukleotiden im Tochterstrang entstanden sind. Diese ungepaarten

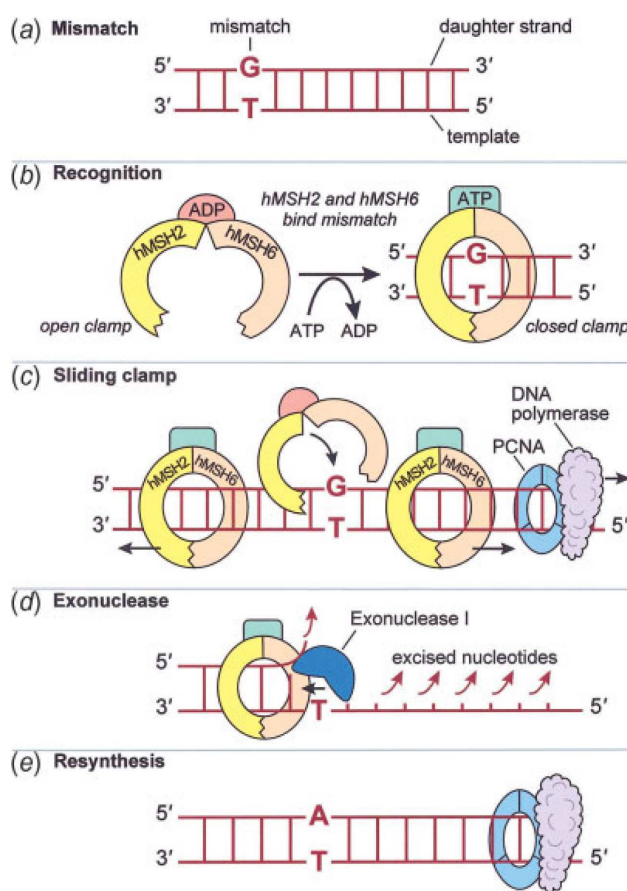
Basen bilden Schleifen („insertion/ deletion loops“, IDL), die sich außerhalb der Helix befinden. Das Mismatch-Repair-System (MMR) erkennt diese Schleifen und „mismatches“ und entfernt sie. Danach kann die Polymerase diesen Teil des Stranges neu synthetisieren ^[77].

Die genaue Funktionsweise dieses Mechanismus wurde zunächst an Prokaryonten erforscht. In *E.coli* wirken Proteinkomplexe aus vier Proteinen (*mutS*, *mutL*, *mutH* und *uvrD*) zusammen ^[93]. Die am Mismatch-Repair-System in Eukaryonten beteiligten Proteinkomplexe setzen sich aus Homologen dieser bei *E.coli* zuerst beschriebenen Proteine zusammen ^[77].

Maßgeblich beteiligt an der Reparatur von Replikationsfehlern beim Menschen sind die fünf Homologen von *mutS* (MSH) ^[91]. Dabei bilden MSH2 und MSH6 gemeinsam das Heterodimer MutS α , das für die Reparatur von Nukleotid-mismatches und kleinen IDLs zuständig ist ^[2, 45, 120], während MSH2 mit MSH3 MutS β bildet, das größere IDLs (mehr als 2 Nukleotide) wiederherstellt ^[2]. MSH2 ist die wichtigste Komponente, da ihr Ausfall den kompletten Verlust des Mismatch-Repair-Systems bedeutet, was Versuche mit Knock-out-Mäusen bestätigt haben: Mäuse mit Verlust von MSH3 oder MSH6 entwickeln mildere Phänotypen, als dies bei einem Verlust von MSH2 der Fall ist ^[39]. Aber nicht nur die Replikation bei der mitotischen Zellteilung wird durch das Mismatch-Repair-System überwacht, sondern auch die Meiose. MSH4 und MSH5 übernehmen bei der Meiose die Aufgaben von MutS α und MutS β bei der Beseitigung von mismatches und IDLs, indem sie gemeinsam ein Heterodimer bilden ^[17, 92]. Dies ist wohl auch der Grund dafür, warum Mäuse, bei denen nur MSH2 und MSH6 ausgeschaltet wurden, keine nennenswerten Schäden in der Keimzellbahn aufweisen ^[77].

Die vier beim Menschen bekannten Homologe von *mutL* MLH1, MLH3, PMS1 sowie PMS2 bilden drei Heterodimere, deren wichtigstes MutL α , geformt aus MLH1 mit PMS2, darstellt. MutL α wirkt zusammen mit MutS α und verbessert die Diskrimination zwischen Homo- und Heteroduplexen und ist an der Rekombination während der Meiose beteiligt ^[47, 59, 98, 130]. Wird MutL α ausgeschaltet, ergibt sich im knock-out-Modell ein ähnlich schwerer Phänotyp wie bei Fehlen von MSH2 ^[77]. Die Aufgabe von MutL β (MLH1 + PMS1) ist

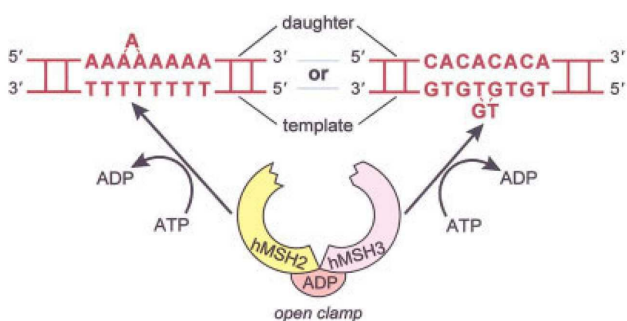
Abbildung 2. Mismatch-Reparatur eines einzelnen Nukleotids.



(a) Bei der Replikation in der S-Phase wurde durch die Polymerase anstatt einer Adenin-Base eine Guanin-Base in den neu replizierten Tochterstrang eingebaut. Dies resultiert in einem sogenannten „Mismatch“. (b) Das Heterodimer MutS α , bestehend aus hMSH2 und hMSH6, überwacht die Replikation der DNA. Sobald ein Fehler, wie hier die falsche Paarung T-G, erkannt wird, bindet MutS α unter ATP-Spaltung an den DNA-Strang. Dabei nimmt MutS α eine geschlossene Konfiguration an und besitzt nun die Fähigkeit, entlang des DNA-Stranges zu gleiten. (c) In dieser Konfiguration kann MutS α nun in beide Richtungen von der Stelle der falschen Paarung am DNA-Strang entlanggleiten, so dass sich weitere MutS α -Heterodimere anlagern können. Das MutS α -Molekül, das in 5'-3'-Richtung wandert, wird auf die DNA-Polymerase treffen und diesen

Enzymkomplex – nach der derzeit gängigen Hypothese – an die Stelle des „Mismatch“ verlagern. (d) Die Exonuklease 1 entfernt nun den neu replizierten Tochterstrang bis zu der Stelle der falsch eingebauten Guanin-Base. (e) Anschließend kann der Fehler durch Neusynthese korrigiert werden.

Abbildung 3. Reparatur von IDLs an Mikrosatelliten-DNA



Das Heterodimer MutS β aus hMSH2 und hMSH3 bindet unter ATP-Spaltung an die Stelle der Schlaufe von ungepaarten Nukleotiden, wie sie entstehen, wenn die DNA-Polymerase bei der Replikation von repetitiven DNA-Sequenzen „rutscht“. Analog zu Abbildung 2 wird dann der fehlerhafte Strang entfernt

und neu repliziert. Aus grafischen Gründen wurde hier jeweils nur eine kleine Schlaufe dargestellt. Diese werden normalerweise von MutS α repariert, während das hier dargestellte Heterodimer MutS β Schleifen mit einer Länge von mehr als zwei Nukleotiden, wie sie typischerweise bei der Replikation von Mikrosatelliten vorkommen, korrigiert.

Abb. aus Jascur, T. und Boland, C. R. in Int J Cancer (2006) ^[73]

unbekannt ^[133], während MutLy (MLH1 + MLH3) hauptsächlich eine Rolle in der meiotischen Zellteilung spielt, auf die hier nicht näher eingegangen werden soll. Außerdem besitzt MutLy wahrscheinlich eine Sicherungsfunktion für MutLa bei der Reparatur von kleinen mismatches und Schleifen ^[7, 27, 33].

MutH besitzt bei E.coli die Funktion einer Endonuklease, die nach Aktivierung durch mutS und mutL fehlerhafte Stellen in dem neu synthetisierten Strang schneidet. UvrD, eine Helicase, entwindet darauf die Helix, so dass Exonukleasen die fehlerhafte Stelle entfernen können. Sowohl für mutH als auch für uvrD konnten bei Eukaryonten keine Homologen gefunden werden ^[63, 78, 91].

1.3.1.1.2 Zellantwort auf DNA-Schädigung

Es ist bekannt, dass Zellen mit defektem Mismatch-Repair-System resistent gegen DNA schädigende Noxen sind, während Mismatch-Repair-kompetente Zellen nach Einwirkung dieser Stoffe im Zellzyklus verharren, beziehungsweise, je nach Dosis, in Apoptose gehen ^[28, 66].

Zellen mit nicht funktionierendem Mismatch-Repair-System besitzen nach Exposition gegenüber methylierenden Stoffen wie MNU oder MNNG eine 100-fach höhere Resistenz gegenüber Zelltod als Zellen mit intaktem Reparatursystem ^[163]. Diese methylierenden Substanzen vom S_N1-Typ übertragen ihre Methyl-Gruppe auf extrazyklische Sauerstoffatome der DNA-Basen, wobei O⁶-Methylguanin (^{Me}G) entstehen kann, welches hauptsächlich verantwortlich ist für die Toxizität dieser Wirkgruppe: ^{Me}G kann sowohl eine Bindung mit Cytosin als auch mit Thymin eingehen ^[77]. Diese Veränderung des Guanins betrifft den parentalen Strang, also das Original, während sich das unter Umständen fehlerhaft eingebaute Thymin im neu replizierten Strang befindet. Das Mismatch-Repair-System erkennt nun die falsche eingesetzte Base ^[46] und es kommt zur Lyse dieses Strangabschnittes (siehe Kapitel 1.3.1.1). Es wird bei der folgenden Neusynthese jedoch mit hoher Wahrscheinlichkeit erneut zum Einbau von Thymin kommen; der Reparaturmechanismus des Mismatch-Repair-Systems bleibt frustriert. Tritt dieser Vorgang mehrfach in einer Zelle auf, kann die Zelle den Checkpoint vor Eintritt in die Mitose nicht passieren, es kommt zum Stopp des Zellzyklus und

die Zelle verharrt in G2 [28, 66, 73]. Anders verhält es sich dagegen bei Zellen mit defektem Mismatch-Repair-System. Hier wird der falsche Baseneinbau nicht erkannt und die Zellteilung kann ungehindert weiterlaufen. Mismatch-Repair-defizitäre Zellen sind also nicht resistent gegen DNA-Schädigungen, sondern toleranter – auf Kosten einer hohen Mutationsrate [81].

Eine zehnfach erhöhte Resistenz gegenüber Zelltod weisen Mismatch-Repair-defekte Zellen auf, die gegenüber Antimetaboliten wie 6-Thio-Guanin exponiert sind. Der Mechanismus hierbei ist mit dem von methylierenden Substanzen vergleichbar [166, 181].

Zweifach erhöht ist die Resistenz bei Cisplatin (CDDP) [4, 53, 122]. CDDP führt innerhalb eines Stranges zu Quervernetzungen, die gewissermaßen eine mechanische Barriere für die DNA-Polymerase darstellen, so dass es innerhalb kurzer Zeit zum Stopp des Zellzyklus kommt. An dem Signalweg vom Halt der Polymerase bis zum Zellarrest sind Proteine des Mismatch-Repair-Systems beteiligt [152].

Die Mismatch-Repair-Proteine sind jedoch nicht nur am Stopp des Zellzyklus beteiligt, sie können nach erfolgter Schädigung die Zelle auch direkt in die Apoptose leiten [180]. Der genaue Mechanismus ist unbekannt, Jiricny et al. [77] vermuten eine direkte Interaktion der an die beschädigte Stelle gebundenen Mismatch-Repair-Proteine mit dem Signalweg der Apoptose [3, 77, 180].

1.3.1.2 Funktionsverlust des Mismatch-Repair-Systems

Jiricny bezeichnet das Mismatch-Repair-System als „facettenreich“. So sind die Mismatch-Repair-Proteine an zahlreichen Prozessen innerhalb der Zelle beteiligt, die den Stoffwechsel und die Homöostase der DNA betreffen [77]. Von daher ist es leicht zu verstehen, dass das Mismatch-Repair-System große Bedeutung im Erhalt der Integrität des Erbguts hat, vor allem im Hinblick auf die Entstehung von Tumoren. Diese immense Bedeutung des Mismatch-Repair-Systems für den menschlichen Organismus ist besonders deutlich bei einem Ausfall des Systems zu erkennen. Die klinischen und molekularpathologischen Konsequenzen eines Funktionsverlustes des Mismatch-Repair-Systems sollen in den folgenden Kapiteln dargestellt werden.

1.3.2 Definition und Vorkommen von Mikrosatelliten

Das menschliche Genom besteht aus circa 3000 Mega-Basen (Mb) DNA, von denen allerdings nur etwa 30% der Kodierung von Genen zugeordnet werden können. 70% dagegen liegen außerhalb codierender Abschnitte. Etwa ein Fünftel dieser annähernd 2100 Mb extragenen humaner DNA liegt als repetitive DNA vor.

Repetitive DNA besteht aus wiederholten Abschnitten, die an verschiedenen Stellen in das Genom eingestreut sind. Zum einen existieren mehrfach hintereinander kopierte Gene, die jedoch nicht abgelesen werden und deshalb nicht zu den codierenden Abschnitten zählen. Zum anderen liegt repetitive DNA als Satelliten-DNA vor, die aus einem einfachen Motiv einer Nukleotidabfolge besteht, das sich mehrfach hintereinander wiederholt. Meist handelt es sich bei diesem Motiv um die Basenfolge Cytosin – Adenosin in definierter Anzahl $(CA)_n$, kann theoretisch jedoch jede Anzahl sowie jede Basenreihenfolge annehmen. Enthält das Motiv 2-10 Basenpaare (bp), spricht man von einem Mikrosatelliten, bei Folgen von 10-100 bp von Minisatelliten, während klassische Satelliten Motive von 100-6500 bp enthalten. Das humane Genom enthält etwa 50.000 bis 100.000 Mikrosatelliten mit der Folge $(CA)_n$.^[123, 124]

Kommt es während der Replikation der Mikrosatelliten zu dem oben beschriebenen „Rutschen“ der DNA-Polymerase, so entstehen Mikrosatelliten ungleicher Länge (siehe Kapitel 1.3.1.1.1). Werden diese durch das Mismatch-Repair-System nicht erkannt und repariert, kommt es zur Persistenz der ungleich langen Mikrosatelliten. Dieses Vorkommen von Mikrosatelliten veränderter Länge nennt man Mikrosatelliten-Instabilität. Deren klinische Bedeutung wurde an HNPCC, einem erblichen Tumorsyndrom, erkannt.

1.3.3 Hereditäres nichtpolypöses Kolonkarzinom

Das hereditäre nichtpolypöse Kolonkarzinom (Hereditary non-polyposis colorectal carcinoma, HNPCC) ist die Bezeichnung für eine heterogene Gruppe von Erkrankungen^[74] mit familiär gehäuftem Auftreten von proximalem Kolonkarzinom und/oder Endometriumkarzinom bereits in jungem Alter (30.-40. Lebensjahr); ebenso sind Tumoren von Magen, Pankreas, Mamma, Nieren und

Harnleiter sowie Leukämien und Sarkome beschrieben ^[169, 182]. Es handelt sich dabei um eine autosomal-dominant vererbte Erkrankung mit variabler Penetranz ^[112].

Dabei ist HNPCC als eine Erkrankung zu sehen, deren Nomenklatur sich historisch mit wachsendem Verständnis von Pathologie und zugrunde liegenden molekularbiologischen Mechanismen entwickelt hat ^[19]. Der Begriff HNPCC wurde 1985 erstmals von Henry T. Lynch verwendet, der damit die beiden Krankheitsbilder Lynch-I-Syndrom (Patienten erkranken nur an proximalen Kolonkarzinomen) sowie Lynch-II-Syndrom (Betroffene erkranken an proximalen Kolonkarzinomen und extrakolonischen Malignomen) zusammenfasste. Er grenzte damit die Gruppe der HNPCC, bei der die Karzinome sich sehr schnell aus wenigen einzelnen Adenomen entwickeln ^[112], von der familiären adenomatösen Polyposis (FAP) ab ^[74], bei der sich die Karzinome über maligne Entartung aus zahlreichen adenomatösen Polypen entwickeln ^[112]. 1991 schloss Lynch noch das Muir-Torre-Syndrom mit in das Krankheitsbild ein ^[103]. Auch hierbei handelt es sich um eine autosomal-dominant erbliche Erkrankung, bei der neben viszeralen Malignomen noch zahlreiche benigne und maligne Talgdrüsentumore auftreten ^[44].

Zunächst wurde das „neue“ Syndrom mit Skepsis betrachtet ^[19]. Dies änderte sich erst, als finnische Arbeitsgruppen Ergebnisse von klinischen Untersuchungen zu diesem Thema veröffentlichten und dadurch Unterschiede von HNPCC zur FAP bewiesen und damit die Beobachtungen von Lynch unterstützten ^[105, 106]. Außerdem konnten besondere histologische Merkmale der mit HNPCC assoziierten Tumore, wie schlechte Differenzierung, fehlende Schleimproduktion und Lymphozyteninfiltration, gezeigt werden ^[75, 107].

Den Durchbruch in das Rampenlicht des medizinischen Interesses erreichte das Krankheitsbild aber erst 1993, als die zugrunde liegenden molekularen Mechanismen entdeckt und beschrieben wurden – nahezu zeitgleich von drei verschiedenen Arbeitsgruppen ^[1, 71, 125, 170].

Bei dem neu entdeckten der Erkrankung zugrunde liegenden Mechanismus handelt es sich um einen Keimbahndefekt der für das Mismatch-Repair-System (siehe Kapitel 1.3.1) codierenden Gene und einem damit verbundenen Ausfall

dieses Systems, was zu einer erhöhten Mutagenität führt, da während der Replikation entstehende Fehler nun nicht mehr repariert werden können ^[1]. In den meisten der untersuchten Fälle lag der Defekt in einem der beiden Mismatch-Repair-Gene MSH2 oder MLH1 ^[24, 54, 96, 121]. Damit war die klinische Bedeutung des Mismatch-Repair-Systems (siehe Kapitel 1.3.1) eindrucksvoll belegt: der Ausfall des Systems bewirkt eine Prädisposition zu einer Reihe von Tumoren, die in HNPCC beschrieben sind (siehe oben). Mit der Beschreibung des molekulargenetischen Mechanismus von HNPCC war es nun möglich, die Diagnose-Kriterien der Erkrankung neu zu fassen.

1991 hatte eine internationale Arbeitsgruppe (International Collaborative Group on Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer ICG-HNPCC ^[177]) erstmals Kriterien für die Diagnose der HNPCC festgelegt (Amsterdam-Kriterien), die sich jedoch bald als zu wenig sensitiv erwiesen ^[74], so dass eine revidierte Fassung erarbeitet wurde, die Amsterdam-II-Kriterien ^[178] (siehe Tabelle 5).

Tabelle 5. Diagnosekriterien für HNPCC

Tabelle modifiziert nach Jass, J. R. in World J Gastroenterol (2006) ^[74]

Bezeichnung	Kriterien
Amsterdam I	Drei Verwandte ersten Grades mit kolorektalem Karzinom Zwei Generationen sind betroffen Ein betroffenes Familienmitglied ist jünger als 50 Jahre Familiäre adenomatöse Polyposis wurde ausgeschlossen
Amsterdam II	Wie bei Amsterdam I, anstatt kolorektalem Karzinom jetzt auch Karzinome des Endometriums, des Dünndarms, des Nierenbeckens oder des Ureters (HNPCC-verwandt)
Bethesda (revidiert)	kolorektales Karzinom vor dem 51. Lebensjahr mehrere kolorektale oder HNPCC-verwandte Karzinome kolorektales Karzinom mit MSI-bedingter Histologie, Patient jünger als 60 Jahre kolorektales oder HNPCC-verwandtes Karzinom bei mindestens einem Verwandten ersten Grades, Patient jünger als 50 Jahre kolorektales oder HNPCC-verwandtes Karzinom bei mindestens zwei Verwandten ersten oder zweiten Grades, unabhängig vom Alter

1997 wurden mit den Bethesda-Kriterien erstmals Merkmale für die Diagnose der Erkrankung aufgestellt, die die neu entdeckte Mikrosatelliten-Instabilität berücksichtigten ^[74]. Die aktuelle Fassung der Bethesda-Kriterien, revidiert 2004, ist in Tabelle 5 dargestellt.

Dabei musste zunächst einmal der Terminus „MSI“ definiert werden. Das Vorkommen instabiler Mikrosatelliten bedeutet primär lediglich einen bestimmten Grad an genetischer Instabilität (siehe auch Kapitel 1.3.2) und bedeutet nicht per se das Vorliegen von HNPCC: Auch bei gesunden Individuen lassen sich – eine ausreichende Zahl von untersuchten Mikrosatelliten vorausgesetzt – instabile Mikrosatelliten nachweisen ^[20]. Dies ist Ausdruck einer „Grundinstabilität“ im Genom, die gewährleistet, dass sich eine Spezies unter der Prämisse der genetischen Stabilität langfristig an verschiedene Umweltbedingungen anpassen kann.

Es wurden zunächst die Begriffe MSI-High (MSI-H), MSI-Low (MSI-L) und MSS für stabile, in der Länge unveränderte Mikrosatelliten, etabliert. Als MSI-H werden Tumoren bezeichnet, bei denen die Mehrheit der untersuchten Marker instabil ist. Ist dagegen die Mehrheit stabil, spricht man von MSI-L. Nur wenn alle Mikrosatelliten stabil sind, gibt man die Bezeichnung MSS ^[31, 42, 101, 144, 171]. Schließlich wurde eine Referenzgruppe von fünf Mikrosatelliten („Bethesda Panel“) nach folgenden Kriterien ausgewählt. Zum einen sollten sie sensitiv sein und in mehr als 80% der als MSI-H eingestufteten Tumorproben in veränderter Länge, also instabil, vorliegen. Außerdem wurde nach der Spezifität ausgewählt, nach dem ein Marker in 20% der als MSI-L klassifizierten Proben stabil sein sollte. Die ausgewählten fünf Loci zeigt Tabelle 6. Dabei soll ein Tumor als MSI-H gelten, wenn zwei oder mehr der fünf untersuchten Satelliten instabil sind; bei einem instabilen Marker ist der Tumor MSI-L; als stabil wird er bezeichnet, wenn beide Allele aller Mikrosatelliten in der Länge gleich sind. Werden mehr als die fünf vorgeschlagenen Marker untersucht, gilt für die Auswertung die relative Anzahl instabiler Marker: mehr als 30-40% Längenvarianz bedeutet MSI-H, bei weniger Instabilität wird die Bezeichnung MSI-L vergeben und als stabil (MSS) ist ein Tumor auch hier nur dann zu werten, wenn alle untersuchten Loci stabil sind.

Tabelle 6. Internationale Richtlinien für die Bestimmung von MSI in kolorektalem Karzinom

Legende: MSI-H: MSI-High; MSI-L: MSI-Low; MSS: Mikrosatelliten-stabil

Tabelle modifiziert nach Boland, C. R. et al. in Cancer Res (1998) ^[20].

Bethesda-Panel			
Marker	Wiederholungseinheit	Accession-Nummer der Gen-Bank	
BAT25	Mononukleotid	9834508	
BAT26	Mononukleotid	9834505	
D5S346	Dinukleotid	181171	
D2S123	Dinukleotid	187953	
D17S250	Dinukleotid	177030	
Kriterien für die Interpretation			
	5 Loci analysiert	>5 Loci analysiert	Interpretation
Anzahl der Marker, die Instabilität zeigen	≥2	≥30-40%	MSI-H
	1	<30-40%	MSI-L
	0	0	MSS

Bei zwei der fünf ausgewählten Marker des ‚Bethesda Panels‘ handelt es sich um Mononukleotid-Mikrosatelliten, deren besonderer Vorteil es ist, dass sie interindividuell stabil sind. Man muss also nicht die Länge der Satelliten im Tumor mit der im Normalgewebe vergleichen um eine Aussage über die Stabilität an diesen Loci treffen zu können, sondern es genügt allein die Untersuchung im Tumorgewebe selbst, da die regelhafte Länge dieser Marker bekannt ist.

Den Teilnehmern des Konsensusmeetings in Bethesda 1997, das dieses Referenzpanel (‚Bethesda-Panel‘) festlegte, war klar, dass die ausgewählten fünf Loci nicht die einzigen sind, mit denen eine Klassifizierung in MSI-H, MSI-L oder MSS gelingen kann. Dennoch haben sie eine wichtige Funktion als Referenz-Panel zur Bewertung von etablierten Markern und neuen Loci und um Uniformität und damit Vergleichbarkeit in der Forschung zu erreichen.

1.3.4 Analyse von Mikrosatelliten außerhalb des HNPCC-Spektrums; EMAST-Instabilität

Eine wesentliche Feststellung ist, dass das ‚Bethesda-Panel‘ nur für die Feststellung des MSI-Status beim Kolonkarzinom aussagekräftig ist, nicht aber bei anderen bösartigen Tumorentitäten ^[20]. Daraus folgt die Frage, ob weitere Malignomentitäten inhärent Mikrosatelliten-instabil sein können, oder ob ein Defekt im Mismatch-Repair-System stets mit HNPCC und damit verwandten Tumoren assoziiert ist.

Untersucht man Kolonkarzinome von HNPCC-Patienten auf MSI, so sind diese in der Regel Mikrosatelliten-instabil. HNPCC ist eine autosomal-dominante Erkrankung, der ein Keimbahndefekt in den Mismatch-Repair-Genen zugrunde liegt. Dies äußert sich im Gewebe des Kolonkarzinoms als MSI-H. Das trifft allerdings nicht auf alle anderen Tumoren des HNPCC-Spektrums zu. Testet man HNPCC-assoziierte Tumoren auf MSI, so sind viele der untersuchten Malignome MSI-L oder gar MSS, obwohl das in der Familie vorkommende Kolonkarzinom MSI-H ist und auch in Tumorgewebe, das nicht dem Kolonkarzinom entstammt, der Defekt des Mismatch-Repair-Systems durch Ausfall beispielsweise von MSH2 (siehe Kapitel 1.3.1.1) nachweisbar ist ^[23]. Dieses Phänomen wird nicht nur bei Malignomen des HNPCC-Spektrums beobachtet, sondern auch bei anderen bösartigen Erkrankungen wie beispielsweise der AML (akute myeloische Leukämie). Hier wurden die Marker BAT-25 und BAT-26, die auch im Bethesda-Panel enthalten sind, sowie ein weiterer von Boland ^[20] vorgeschlagener Marker, BAT-40, in AML-Proben getestet. Bis auf wenige Ausnahmen waren diese Marker auch in den Proben stabil, deren Ursprungsgewebe als Mismatch-Repair-defizient bekannt waren ^[49]. Bei hämatologischen Malignomen ist das Bild generell uneinheitlich. Hier gibt es außer der oben genannten Studie sowohl Beobachtungen, die bei intaktem Mismatch-Repair-System eine hohe Rate an MSI feststellen ^[151], als auch Veröffentlichungen, die aus ihrem untersuchten Kollektiv zu der Schlussfolgerung kommen, dass alle hämatologischen Neoplasien mit MSI defizient im Mismatch-Repair-System sind ^[61]. Diese teilweise konträren

Aussagen sind am ehesten dadurch zu erklären, dass unterschiedliche Mikrosatelliten untersucht wurden ^[49, 151], unterschiedliche Labortechniken angewandt wurden und die Fallzahlen in den einzelnen Studien gering sind ^[49]. Es gibt also Tumoren, in denen das Mismatch-Repair-System defekt ist, die aber dennoch stabile Marker des Bethesda-Panels aufweisen und von daher mit den klassischen fünf Mikrosatelliten nicht als instabil zu diagnostizieren sind ^[20]. Daraus resultieren Bestrebungen, ein Panel zu etablieren, das ähnlich dem ‚Bethesda-Panel‘ für HNPCC für andere Tumorentitäten zuverlässig Mikrosatelliten-Instabilität detektiert (siehe Tabelle 6) ^[20]. Um dieses Ziel zu erreichen, wurden die komplexeren Tetranukleotid-Marker analysiert. Im Bethesda-Konsensustreffen wurde eine Instabilität dieser Marker – im Gegensatz zur „echten“ Form der MSI („true MSI“), wie sie bei HNPCC in Kolonkarzinom-Proben gefunden wird – als ‚EMAST‘ (elevated microsatellite alterations at selected tetranucleotides) bezeichnet ^[20]. Betrachtet man die Auftretenswahrscheinlichkeit von MSI und EMAST, so stellt man fest, dass es kaum Überschneidungen gibt von Tumoren, in denen sowohl EMAST als auch die „echte MSI“ erhöht sind ^[20]. Zwar gibt es Untersuchungen von Tumoren des HNPCC-Spektrums, in denen EMAST-positive Proben zu über 80% auch MSI-H sind, jedoch tritt EMAST in HNPCC-assoziierten Tumoren isoliert signifikant seltener auf als in Malignomen außerhalb des HNPCC-Formenkreises. In Tumoren, die nicht zu HNPCC gehören ist es dagegen so, dass EMAST-positives Gewebe nur selten „echte MSI“ aufweist; hier ist sowohl EMAST signifikant häufiger positiv als auch MSI-H signifikant weniger häufig, verglichen mit Malignomen des HNPCC-Spektrums ^[30].

Auch aus diesem Grund geht man nicht von einem Mismatch-Repair-Defekt als gemeinsamer Ursache sowohl für das Auftreten von true-MSI als auch EMAST aus, sondern postuliert eine andere Genese für EMAST ^[20]; zudem sind die Proteine des Mismatch-Repair-Systems bei EMAST-positiven Tumoren im immunhistochemischen Nachweis meist intakt ^[25, 30]. Ein Zusammenhang von EMAST-Instabilität und p53-Mutationen ist wahrscheinlich ^[5, 36], ferner tritt EMAST-Instabilität gehäuft bei Tumoren auf, in deren Genese Kanzerogene eine führende Rolle spielen (Kopf und Hals, Lunge, Harnblase im Gegensatz zu

Niere und Prostata ^[36, 187]). Ein Zusammenhang zwischen Umweltfaktoren und dem Auftreten von EMAS-Instabilität gilt als gesichert ^[158].

1.3.5 MSI und Sekundärmalignome

Nicht nur in der Therapie pädiatrischer Malignome konnten große Fortschritte erzielt werden (siehe auch Kapitel 1.2), auch in der Therapie von Malignomen bei Erwachsenen sind die Überlebensraten von Krebserkrankungen heute deutlich gestiegen – und damit auch die Zahl derer, die an einem Zweitmalignom erkranken ^[8]. Dennoch ist die Zahl der Krebspatienten gering, die im Laufe ihres weiteren Lebens an einer Sekundärneoplasie erkranken, weswegen eine erhöhte Vulnerabilität dieser Personen, beispielsweise durch Verlust des Mismatch-Repair-Systems, gegenüber Tumorleiden diskutiert wird ^[117]. Es liegt eine Vielzahl von Studien vor, die belegen, dass die Auftretenswahrscheinlichkeit von MSI bei Sekundärneoplasien deutlich erhöht ist gegenüber sporadisch auftretenden Krebserkrankungen ^[8, 9, 38, 117, 151]. Eine Assoziation dieser erhöhten Instabilität mit einem Mismatch-Repair-Defekt, nachweisbar als eine der häufigsten Mutationen in den Mismatch-Repair-Genen in hMLH1 oder hMSH2, ist dabei jedoch zumindest bei hämatologischen Erkrankungen nicht gegeben ^[117, 151]. Allerdings konnte in einer Studie gezeigt werden, dass die Ersttumoren der Mikrosatelliten-instabilen Sekundärmalignome häufig ebenfalls instabil sind, was eine erhöhte Suszeptibilität der betroffenen Patienten als Ursache für das Auftreten von beiden malignen Erkrankungen nahe legt ^[117].

Auch bei pädiatrischen Sekundärmalignomen konnte ein Zusammenhang zwischen Mikrosatelliten-Instabilität und dem Auftreten von Zweittumoren festgestellt werden. In einer Serie von neun pädiatrischen Zweitmalignomen unterschiedlicher Entitäten wurde eine MSI-Rate von 100% an fünf bis sieben Loci von insgesamt sieben untersuchten Markern festgestellt ^[57]. Dieses Ergebnis wird als Ausdruck eines Mutator-Phänotyps gesehen, der die Kinder zur Entstehung von Sekundärmalignomen prädisponiert. Dieser Phänotyp besteht demnach von Geburt an als Keimbahndefekt in einem der Stabilitätsgene und erhöht damit die Wahrscheinlichkeit für die Krebsentstehung bereits in frühen Lebensjahren. Die Wirkung dieses

Keimbahndefekts wird durch die Krebstherapie noch potenziert, da die hierdurch gesetzten Schäden nicht mehr suffizient repariert werden können und zu dem Schaden in den Stabilitätsgenen weitere Schäden beispielsweise in Tumorsuppressor- oder Onkogenen kommen. Die Wahrscheinlichkeit für eine weitere Krebserkrankung steigt dadurch überadditiv an. Eine alternative Hypothese besagt, dass der Defekt in den Stabilitätsgenen erst durch die Therapie des Primärtumors entstanden ist und nun dadurch die Wahrscheinlichkeit für eine Sekundärneoplasie erhöht ist ^[57]. Diese zweite Hypothese ist allerdings nicht mit der von Olipitz et al. gemachten Beobachtung in Einklang zu bringen, wonach bei der Mehrheit der Fälle bereits die Primärtumoren Instabilität der Mikrosatelliten aufweisen ^[117].

1.3.6 Zusammenfassung Mikrosatelliten-Instabilität

Das Mismatch-Repair-System und die Mikrosatelliten-Instabilität haben also Bedeutung weit über HNPCC hinaus. MSI konnte bei vielen Tumoren nachgewiesen werden, die nicht unter das HNPCC-Spektrum fallen. Genomische Instabilität ist als integraler Bestandteil der Karzinogenese beschrieben. Diese Erkenntnis wird bisweilen als eine der wichtigsten Fortschritte auf dem Gebiet der Krebsforschung bezeichnet ^[57]. Und mit dem EMAS-Panel konnte eine weitere Form der MSI definiert werden, die eine genetische Instabilität unabhängig von einer Defizienz der Gene des Mismatch-Repair-Systems zu definieren scheint ^[20].

Bemerkenswert ist die Feststellung, dass gerade bei Sekundärmalignomen die Rate von Tumoren mit MSI-H signifikant gegenüber sporadischen bzw. de-novo-Tumoren erhöht ist und bei pädiatrischen Sekundärmalignomen sogar 100% erreichen kann ^[57]. Vor diesem Hintergrund stellt sich die Frage, ob eine detaillierte Analyse von Mikrosatelliteninstabilität Aspekte der pädiatrischen Karzinogenese (siehe Kapitel 1.1.1) aufklären kann und ob für Kinder, die aufgrund ihrer Genetik ein erhöhtes Risiko für die Entwicklung eines Zweitmalignoms besitzen ^[117], ihrer besonderen Vulnerabilität bei der Wahl eines Therapieschemas Rechnung getragen werden sollte ^[57]. Diesen Fragen soll die vorliegende Arbeit nachgehen

1.4 Fragestellung und Ziel

Die Bedeutung der Mikrosatelliteninstabilität als möglicher Ursache der postulierten erhöhten genetischen Vulnerabilität von Patienten mit Sekundärmalignomen nach Ersterkrankung im Kindesalter konnte in den vorigen Kapiteln dargelegt werden.

Mit der vorliegenden Arbeit sollte nun zunächst geklärt werden, ob sich in diesen Sekundärmalignomen tatsächlich gehäuft MSI nachweisen lässt, wie es nach Literaturlage zu erwarten wäre. Sollte dies der Fall sein, dann ist folgende Fragestellung von klinischer Bedeutung:

- a) Handelt es sich bei den MSI-positiven Patienten um eine Hochrisikogruppe mit vorbestehendem Mutator-Phänotyp, bei der sich zwei Risiken addieren: das grundsätzlich erhöhte Tumorrisiko und die erhöhte Vulnerabilität gegenüber der Mutagenität der applizierten Chemotherapie
- b) Wird bei Patienten mit Sekundärmalignom die MSI durch die vorausgegangene, intensive Chemotherapie induziert und ist dadurch das Risiko für eine zweite Neoplasie erhöht

Zwischen diesen beiden Thesen kann derzeit nicht differenziert werden.

Im vorliegenden Projekt wurden in Zusammenarbeit mit der Tübinger Universitäts-Kinderklinik, dem Deutschen Kinderkrebsregister und 29 pädiatrisch-onkologischen Zentren retrospektiv Patienten mit Sekundärmalignom nach Neoplasie im Kindesalter auf das Vorliegen von MSI untersucht. Dabei wurde die Rate von MSI-positiven Sekundärmalignomen in Bezug auf die Entität des Primär- und des Sekundärmalignoms untersucht sowie bei Verfügbarkeit von paraffinfixiertem Gewebe bzw. Knochenmarksausstrichen der MSI-Status des primären Malignoms bestimmt, um die oben angeführte Frage zu beantworten, ob es sich bei MSI um eine bereits dem primären Tumor zugrunde liegende Störung oder um ein therapieinduziertes Sekundärphänomen handelt.

Die Beantwortung der Frage, welche der beiden Thesen zutrifft, ist von hoher klinischer Relevanz. Sollte es sich bei den Patienten mit MSI-positivem Sekundärmalignom um eine Patienten-Gruppe mit hereditärem Mutator-

Phänotyp handeln, dann wäre langfristig über ein MSI-Screening bei Diagnosestellung der Ersterkrankung nachzudenken mit dem Ziel einer angepassten Chemotherapie und Follow-up-Strategie, die einerseits die möglicherweise vermehrte Therapie-Vulnerabilität berücksichtigen muss und andererseits dem erhöhten Risiko eines Sekundärtumors Rechnung tragen sollte. Die frühzeitige Identifizierung solcher Kinder hätte auch für ihre Familien unmittelbare diagnostische und möglicherweise therapeutische Konsequenzen. Trifft die These zu, dass MSI erst durch die Therapie induziert wird, dann stellt sich für weitergehende Forschungsarbeiten die Frage, ob und welche Therapie-Elemente mit Induktion von Mismatch-Repair-Defekten assoziiert sind und welche Defekte des Reparatur-Systems induziert werden, um diesem Risiko in weiteren Therapieplanungen zu begegnen.

2 Material und Methodik

2.1 Patientencharakteristika

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Proben von Kindern untersucht, die an einem Sekundärmalignom erkrankt waren. Die Daten dieser Kinder wurden auf Anfrage der Autoren vom Deutschen Kinderkrebsregister in Mainz dem behandelnden Zentrum übermittelt, die dann Probenmaterial und klinische Daten für die vorliegende Studie zur Verfügung stellten. Dieses Register erfasst seit 1980 in enger Zusammenarbeit mit ca. 130 kooperierenden kideronkologischen Zentren bundesweit (seit 1991 auch in den neuen Bundesländern) Krebserkrankungen bei Kindern. Bis 2004 wurden 37.169 Patienten gezählt auf einer Bevölkerungsgrundlage von ca. 13 Millionen (Kinder in Deutschland bis 15 Jahre). Der Vollzähligkeitsgrad der Erfassung liegt bei 95%, obwohl die behandelnden Ärzte nach Zustimmung der Betroffenen freiwillig an das Register melden. Es handelt sich um ein epidemiologisches Krebsregister mit Integration klinischer Daten. Neben einem Langzeit-Follow-up hinsichtlich Überlebenswahrscheinlichkeiten, Spätfolgen und Zweittumoren werden epidemiologische Studien durchgeführt. Von daher arbeitet das Institut eng mit der Gesellschaft für Pädiatrische Onkologie und Hämatologie (GPOH) zusammen, die in Studien die Behandlung von 90% aller pädiatrischen Krebspatienten überwacht und optimiert ^[79].

Nach Übermittlung der Daten konnten die behandelnden Krankenhäuser direkt angeschrieben werden mit der Bitte um die Zusendung von in Paraffin eingebettetem Tumorgewebe bzw. von Ausstrichen von Knochenmark oder Blut des Erst- und Zweitmalignoms, sowie zugehörigem Normalgewebe der jeweiligen Patienten. Dieses Material wurde zu Diagnostik und Therapie mit „informed consent“ entnommen, wobei explizit die Verwendung des Gewebes zu wissenschaftlichen Zwecken mit eingeschlossen ist. Zudem wurde die hier dokumentierte Untersuchung im November 2004 auf der 64. Halbjahrestagung der GPOH in Frankfurt/Main vorgestellt und um Mitarbeit geworben.

Vom Deutschen Kinderkrebsregister wurden 275 Patienten mit Sekundärmalignom erfasst; in dieser Arbeit konnten insgesamt 181 Proben untersucht werden (siehe Tabelle 7). Eine ausführliche Tabelle ist dieser Arbeit angehängt (siehe Kapitel 6 (Anhang) Tabelle 20). Die Gewebeproben wurden von den einzelnen Kliniken stets mit pathologischem Befund zugesandt, so dass eine eindeutige Zuordnung der einzelnen Gewebeblöcke möglich war.

Als Referenzgewebe für entsprechende Entitäten der Einzel malignome wurden Proben des Pathologischen Institutes der Universität Tübingen herangezogen. Dabei wurde angestrebt, Proben von jeweils ca. 20 Patienten der häufigsten Entitäten pädiatrischer Malignome zusammen zu stellen (vgl. Kapitel 1.1.2). Aus logistischen Gründen konnten keine Referenzproben von ZNS-Tumoren und von Leukämien einbezogen werden. Insgesamt wurde in Paraffin eingebettetes Gewebe von 66 Patienten in die Referenzgruppe eingeschlossen (siehe Tabelle 7).

Tabelle 7. Patientencharakteristika

Legende: ¹⁾ Erstmalignom/Zweitmalignom

Abkürzungen: ZNS: zentrales Nervensystem; ALL: akute lymphatische Leukämie; AML: akute myeloische Leukämie; NHL: Non-Hodgkin-Lymphom; MDS: myelodysplastisches Syndrom.

	Anzahl	Alter		
		Median	min. Wert	max. Wert
Gesamtsumme	181	6,7/12,6 ¹⁾	0,0/0,8 ¹⁾	19,9/32,2 ¹⁾
gesundes Gewebe	107			
Erstmalignome	80	5,6	0,0	16,9
gesundes Gewebe	52			
ZNS-Tumoren	14	3,8	0,9	16,9
solide Tumoren (ohne ZNS)	9	5,4	0,0	11,2
<i>Knochentumoren</i>	2	10,3	9,3	11,2
<i>Weichteiltumoren</i>	3	2,1	0,0	2,1
<i>Neuroblastom</i>	4	4,6	3,5	6,8
hämatologische Malignome	52	5,7	0,3	16,1
<i>ALL</i>	32	5,6	1,4	15,2
<i>AML</i>	7	4,0	0,3	16,1
<i>sonstige Leukämien</i>	2	9,6	8,8	10,5
<i>NHL</i>	8	7,6	3,6	14,7
<i>Hodgkin-Lymphom</i>	3	10,3	3,6	10,3
sonstige Malignome	5	8,7	0,7	16,5
Zweitmalignome	128	12,5	0,8	32,2
gesundes Gewebe	73			
ZNS-Tumoren	18	13,4	6,3	32,2
solide Tumoren (ohne ZNS)	13	12,3	1,3	28,7
<i>Knochentumoren</i>	3	10,7	7,5	13,9
<i>Weichteiltumoren</i>	7	12,3	3,8	28,7
<i>Neuroblastom</i>	3	9,6	1,3	17,9
hämatologische Malignome	80	11,1	0,8	22,5
<i>ALL</i>	8	12,3	2,8	18,9
<i>AML</i>	27	12,1	0,8	22,5
<i>MDS</i>	33	10,5	1,3	21,0
<i>sonstige Leukämien</i>	4	12,2	6,5	16,3
<i>NHL</i>	8	12,7	3,2	16,5
<i>Hodgkin-Lymphom</i>	0	-	-	-
sonstige Malignome	17	13,8	0,9	25,6
Einzelalignome	66	12,7	0,5	22,6
gesundes Gewebe	40			
solide Tumoren (ohne ZNS)	34	11,3	0,5	16,9
<i>Knochentumoren</i>	13	13,4	11,4	16,9
<i>Weichteiltumoren</i>	21	4,4	0,5	16,9
hämatologische Malignome	32	11,1	4,2	22,6
<i>NHL</i>	12	11,5	4,2	22,6
<i>Hodgkin-Lymphom</i>	20	14,4	5,7	21,5

2.2 Methodik

2.2.1 Auswahl der Mikrosatelliten

Ob ein Tumor Mikrosatelliten-stabil oder -instabil ist, hängt stark davon ab, wieviele und welche Mikrosatelliten man untersucht ^[127]. Deshalb sind in der Literatur sehr unterschiedliche Angaben bezüglich der MSI-Rate zu finden. Bei Therapie-induzierter akuter myeloischer Leukämie (t-AML) beispielsweise findet man Raten von 7-94% ^[9, 21, 70, 117, 135, 151]. Aus diesem Grund wurde schließlich 1997 auf einer internationalen Konsensus-Konferenz für HNPCC und assoziierte Tumoren ein Referenz-Panel von fünf Mikrosatelliten festgelegt, durch das bei HNPCC auf MSI getestet wird (Bethesda-Panel, siehe auch Kapitel 1.3.3) ^[20]. Zwei dieser fünf zu untersuchenden Loci (BAT25 und BAT26) sind mononukleotidische Mikrosatelliten. Diese haben den Vorteil, interindividuell stabil zu sein. Ihre Länge ist also bekannt, Abweichungen von der Norm, d.h. Instabilität an diesem Ort, können somit ohne Abgleich mit gesunder, konstitutioneller DNA festgestellt werden. Bei interindividuell verschiedenen Mikrosatelliten, wie den drei übrigen dinukleotidischen Markern des HNPCC-Panels, ist stets ein Vergleich mit Normalgewebe des betroffenen Individuums notwendig, um eine Längenänderung des Mikrosatelliten feststellen zu können, da sich die Länge dieser Mikrosatelliten unterscheidet von Individuum zu Individuum, nicht jedoch innerhalb einer gesunden Person. Dies macht eine Untersuchung kostspieliger und zeitaufwändiger, zudem können zusammengehörende Proben von Tumor und Normalgewebe eines Patienten verwechselt werden, was zu falsch-positiven Ergebnissen führt ^[127]; des weiteren ist die Auswertung erschwert, was zu einer weiteren Quelle der Missklassifikation werden kann ^[102].

Die beiden mononukleotidischen Mikrosatelliten des Bethesda-Panels für HNPCC, BAT25 und BAT26 sind allerdings bei einem nicht unerheblichen Anteil von Afro-Amerikanern polymorph (18,4% für BAT25 bzw. 12,6% für BAT26 ^[127, 131, 145]), so dass eine Auswertung ohne Normalgewebe hier nicht mehr möglich ist; auch bei einem geringen Prozentsatz der kaukasischen Bevölkerung wird Polymorphismus hinsichtlich dieser Marker beobachtet ^[145, 160].

^{191]}. Aus diesem Grund sind BAT25 und BAT26 nicht geeignet, alleine für ein MSI-Screening in allen Populationen eingesetzt zu werden ^[165]. Suraweera et al. etablierten deshalb ein Set von weiteren drei mononukleotidischen Markern, die in afrikanischen und kaukasischen Bevölkerungen quasimonomorph, d.h. nur zu einem geringen Prozentsatz polymorph sind und ohne Vergleich mit Normalgewebe beurteilt werden können. Diese Marker erreichen zusammen mit BAT25 und BAT26 aus dem Bethesda-Panel eine Sensitivität und Spezifität von 100% für die Testung auf MSI bei HNPCC und -assoziierten Tumoren ^[165].

Bei Tumoren, die nicht zu diesem Formenkreis gehören, erreichen jene Marker nicht diese hohe Sensitivität. Untersuchungen haben sogar gezeigt, dass BAT25 und BAT26 komplett insensitiv sind gegenüber MSI bei akuter myeloischer Leukämie ^[49]. Deshalb wäre für die Untersuchung von Malignomen, die nicht zum Kreis der HNPCC-assoziierten Tumoren gehören, die Etablierung eines eigenen Panels von Markern wünschenswert. Bislang wurde jedoch kein entsprechendes Konsensus-Panel definiert, weshalb in der Literatur meist auf die erste Konsensus-Konferenz von 1997 verwiesen wird mit der Regelung, bei >30-40% instabiler Marker von MSI-H zu sprechen (siehe auch Tabelle 6 sowie Kapitel 1.3.3) ^[20, 49].

Da nun die oben genannten Loci keine sicheren Aussagen für Tumoren außerhalb des HNPCC-Spektrums ermöglichen, wird häufig eine weitere Form der Mikrosatelliteninstabilität getestet. Dabei handelt es sich nicht um Mono- oder Dinukleotide sondern um ausgewählte Tetranukleotide (Elevated Microsatellite Alterations at Selected Tetranucleotides, EMAST; siehe auch Kapitel 1.3.4). Eine Instabilität für diese Marker wird beschrieben bei Hauttumoren (unter Ausschluss des malignen Melanoms), Blasenkarzinomen, Tumoren des Urogenitalsystems, nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinomen sowie Ovarialkarzinomen ^[5, 26, 30, 36, 153], mit einer Häufigkeit der Instabilität bis zu 75% bei Hauttumoren ^[36].

Bei EMAST gilt für die Bewertung dasselbe wie bei der „echten MSI“, die Ergebnisse hängen von der Anzahl und Auswahl der untersuchten Loci ab. Xu et al. etablierten in ihrer Arbeit 2001 aus 61 am nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinom untersuchten Markern 12 Mikrosatelliten ^[187], für die er

nachweisen konnte, dass sie EMAST detektieren. Acht von diesen wurden von Catto et al. für Untersuchungen epithelialer Tumoren des Urogenitalsystems übernommen ^[30].

Für die vorliegende Arbeit wurden aus den oben angeführten Gründen zur Detektion der „echten MSI“ die im Bethesda-Panel vorgeschlagenen fünf Marker verwendet und zusätzlich die von Suraweera et al. hinzugefügten drei mononukleotidischen Loci. Dieses Panel wird im Folgenden „MSI-Panel“ genannt.

Zur Untersuchung von EMAST-Instabilität wurden die von Catto et al. verwendeten acht Mikrosatelliten ausgewählt ^[30], das im Folgenden als „EMAST-Panel“ bezeichnet wird. Für eine Übersicht siehe Tabelle 12, Kapitel 6 (Anhang).

2.2.2 DNA-Extraktion

Die DNA der in Paraffin eingebetteten Proben wurde durch Phenol-Extraktion nach dem in den Labors der molekularen Pathologie üblichen Protokoll gewonnen (siehe Tabelle 11, Kapitel 6 (Anhang)). Dabei werden die Probenblöcke geraspelt und in Xylol gegeben wobei sich das Paraffin in Xylol löst und abgezogen werden kann. Nach Reinigung des Gewebes mit Ethanol von Xylol-Paraffin-Resten wird das Gewebe in einen Puffer aufgenommen und von Proteinase K verdaut. Nach dem Verdau wird die freischwimmende DNA in Phenol aufgenommen, um sie von den restlichen Zelltrümmern zu separieren. Danach wird die DNA mit einer Ethanol-fällung gewonnen und in destilliertes Wasser aufgenommen. Anschließend wird die DNA-Konzentration photometrisch bestimmt und die Lösung auf 50µg/ml verdünnt.

Ausstriche von Blut oder Knochenmark auf Objektträgern wurden in P2-Puffer aufgenommen und danach dem Proteinase K - Verdau zugeführt. Anschließend wurde analog oben beschriebenem Protokoll verfahren (siehe ab Punkt 2 Tabelle 11 in Kapitel 6 (Anhang)).

An Geräten wurde die Zentrifuge MC12V der Firma Sorvall verwendet sowie ein Thermoblock der Firma Liebisch. Die photometrische Messung wurde mit dem Photometer SmartSpec 3000 der Firma Biorad durchgeführt.

2.2.2.1 Mikrodissektion

Wird DNA aus in Paraffin konserviertem Gewebe extrahiert, wie in Kapitel 2.2.2 beschrieben, so stammt diese DNA aus allen in dem verwendeten Gewebeblock enthaltenen Zellen; dies können Tumorzellen sein ebenso wie gesunde Zellen, wenn es sich bei der Gewebeprobe beispielsweise um einen nur teilweise befallenen Lymphknoten handelt, der noch von Binde- und Fettgewebe umgeben ist. Um im nächsten Schritt einzelne DNA-Abschnitte mittels Polymerasenkettenreaktion (PCR) untersuchen zu können (siehe Kapitel 2.2.3), muss der Tumoranteil jedoch mindestens 5% betragen, wie Verdünnungsexperimente für Fluoreszenz-PCR, wie sie in dieser Arbeit zur Anwendung kam, zeigten ^[118]. Soll jedoch konstitutionelle DNA aus gesundem Gewebe zu Vergleichszwecken analysiert werden, muss diese aus komplett tumorfreiem Gewebe extrahiert werden. Normalerweise wird hierzu ein Gewebeblock verwendet, der sich in pathologischen Untersuchungen als tumorfrei erwiesen hat und der Phenol-Extraktion wie oben beschrieben zugeführt werden kann. Ist ein solcher Block nicht vorhanden oder liegt in einem Block der Tumoranteil unter den 5% der sicheren Nachweisgrenze in der PCR, wird vor der eigentlichen Phenolextraktion Gewebe mittels Mikrodissektion separiert und angereichert.

Mikrodissektion ist ein Verfahren zur Selektion distinkter Zellen und Gewebeareale. Sie wird eingesetzt, wenn das Ausgangsmaterial sehr heterogen vorliegt, jedoch für die weiteren Untersuchungen möglichst homogenes Gewebe benötigt wird. Hierbei werden von einem in Paraffin eingebetteten Gewebeblock mehrere Schichten abgetragen und auf Glas-Objektträger verbracht. Die Dicke dieser Schichten bewegt sich von 5µm ^[11] bis 10µm ^[30]. Die oberste Schicht wird mit Hämatoxylin-Eosin (HE) gefärbt und von Pathologen, im Rahmen dieser Arbeit von jenen des Pathologischen Instituts der Universität Tübingen, lichtmikroskopisch beurteilt. Tumorgewebe sowie tumorfreies Normalgewebe werden markiert. Durch Übereinanderlegen der einzelnen Schichten kann nun gezielt Tumor- oder tumorfreies Gewebe gewonnen und anschließend mittels Phenolextraktion DNA daraus extrahiert werden. Dadurch ist gewährleistet, dass das jeweilige Gewebe nahezu rein

vorliegt. Zudem kann mit dieser Methode aus einem Block DNA für die Untersuchung des Tumors und des Normalgewebes gewonnen werden. So konnte eine Mikrosatellitenanalyse auch dann durchgeführt werden, wenn von einem Patienten nur wenig Material vorhanden war.

2.2.3 Polymerasekettenreaktion

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) ist eine *in vitro* Methode zur Amplifikation von DNA, die auf der enzymatischen Synthese von DNA-Sequenzen mittels DNA-Polymerase beruht. Die PCR-Methode beruht auf der zyklischen Wiederholung von thermischer Denaturierung, Primerhybridisierung (Annealing) und DNA-Synthese (Elongation). Spezifische Oligonukleotide (Primer) flankieren den zu vermehrenden DNA-Abschnitt von den 3'-Strangenden her und dienen als Initiationsstelle für den Polymerisationsprozess der thermostabilen DNA-Polymerase. Nach Verdoppelung der Einzelstränge wird die DNA erneut denaturiert und der Zyklus beginnt von neuem^[143].

Wie in Kapitel 2.2.1 bereits erläutert wurde, wurden in dieser Arbeit zur Feststellung des MSI-Status 16 Mikrosatelliten untersucht.

Für die Beurteilung der "true-MSI" wurde das bei HNPCC übliche Bethesda-Panel von fünf Markern angewandt. Hierfür wurde ein Multiplex-PCR-Ansatz verwendet, der von Berg et al.^[11] etabliert wurde und die gleichzeitige Amplifikation aller fünf Loci in einem PCR-Ansatz erlaubt. In eigenen Vorversuchen in den Labors der molekularen Pathologie der Universität Tübingen wurde diese Pentaplex-PCR von Berg et al. um drei weitere mononukleotidische Marker (siehe Kapitel 2.2.1) zu einer Oktaplex-PCR erweitert (der Begriff „MSI-Panel“ wird synonym für diese acht Mikrosatelliten sowie die zugehörige Oktaplex-PCR verwendet). Für das PCR-Protokoll und Angaben zu den Primern siehe Tabelle 12 und Tabelle 13, Kapitel 6 (Anhang).

Zur Feststellung der E-MAST-Instabilität wurden wie in Kapitel 2.2 erläutert die von Catto et al. vorgeschlagenen acht tetranukleotidischen Mikrosatelliten untersucht. Da diese acht Loci jedoch nicht störungsfrei in einer gemeinsamen Multiplex-PCR amplifiziert werden konnten, war hier die Entwicklung dreier separater PCR-Ansätze nötig. Für das PCR-Protokoll und Angaben zu den Primern siehe Tabelle 12 und Tabelle 13, Kapitel 6 (Anhang).

Die PCRs wurden durchgeführt mit Geräten der Firma Biometra (T Gradient Thermoblock, Serien-Nr.: 2009143) sowie der der Firma Peqlab (Clemens Primus 25, Serien-Nr.: 13872.0002). Es wurden im Rahmen dieser Arbeit fluoreszenzmarkierte Primer verwendet.

2.2.4 Frequenzlängenanalyse

Die Analyse der PCR-Produkte erfolgte mittels Frequenzlängenanalyse. Bei der herkömmlichen Gel-Elektrophorese werden die Amplifikate in einem Gel ihrer Größe nach elektrophoretisch aufgetrennt. Fragmente gleicher Größe kumulieren dabei an derselben Stelle. Diese als „Banden“ bezeichneten Anhäufungen von DNA können beispielsweise mit Ethidiumbromid markiert und dann durch UV-Licht sichtbar gemacht werden. Setzt man in die Gel-Elektrophorese parallel einen Standard ein, bei dem die Länge der Fragmente bekannt ist, so kann durch Vergleich der Banden von Probe und Standard die Länge der Probe abgeschätzt werden.

Bei der Frequenzlängenanalyse erfolgt die Auftrennung der Fragmente nach deren Länge durch den Sequenzierapparat. Dabei sind die Amplifikate durch die bei der vorausgegangenen PCR verwendeten Fluoreszenz-markierten Primer fluoreszierend. Der Sequenzierapparat detektiert nun dieses Fluoreszenzsignal und kann damit dem Amplifikat eine entsprechende Position zuweisen. Durch die Beimengung eines kommerziellen Standards in die Probe kann diese Position als eine bestimmte Länge des detektierten Fragments definiert werden. Diese Länge wird in Basenpaaren (basepairs, bp) angegeben und ist auf 1bp genau. Zudem ist neben der qualitativen Analyse eine semiquantitative Auswertung möglich, da die Stärke des Fluoreszenzsignals mit der Menge der DNA korreliert.

In dieser Arbeit kam der Sequenzierapparat Ceq 8000 Genetic Analysis System der Firma Beckman Coulter zum Einsatz. Analysiert wurde mit der zugehörigen Software Ceq System 8000 in der Version 9.0.25 Instrument Version. Eine Übersicht über die verwendeten Geräte und Materialien sowie den Reaktionsansatz gibt Tabelle 14 in Kapitel 6 (Anhang).

2.2.5 Auswertung

Bei der Frage, ab wie vielen instabilen Markern ein Tumor als MSI bzw MSI-H, MSI-L oder MSS (stabil) zu werten ist, herrscht seit der Konsensus-Konferenz des NCI und der Festlegung der Bethesda-Kriterien weitgehend Klarheit: werden die fünf Loci des Bethesda-Panels getestet, so spricht man bei zwei oder mehr instabilen Mikrosatelliten von MSI-H, ein instabiler Locus definiert MSI-L; keine Instabilität bedeutet Stabilität (MSS). Wurden mehr als diese fünf Marker getestet oder andere, so gilt eine verhältnismäßige Einteilung, wonach von MSI-H gesprochen wird, wenn >30-40% der untersuchten Marker instabil sind; weniger Instabilität bedeutet MSI-L, gar keine wird als MSS bezeichnet ^[20]. Ganz anders sieht es bei der Definition aus, wann ein einzelner Marker als instabil zu werten ist. Hier finden sich in der Literatur unterschiedliche Angaben, wobei häufig eine präzise Angabe fehlt und lediglich vom „Auftauchen neuer Banden“ (Gelelektrophorese) oder von „klarer Abweichung der Peaks nach links“ (Fragmentlängenanalyse) als Kriterium für Instabilität gesprochen wird ^[8, 23, 30, 57, 117, 135, 151]. Am ausführlichsten widmen sich Berg et al. diesem Thema ^[11]. Sie fordern für jeden Marker ein umgebendes „Stottern“ kleiner werdender Peaks in der Form eines Deltas oder einer Gauß'schen Normalverteilung, verursacht durch die Fehler der Polymerase bei der Polymerisation der Mikrosatelliten (siehe auch Kapitel 1.3.2), welche durch das Fehlen von Reparaturmechanismen in der PCR nicht korrigiert werden können. Einzelstehende Peaks bezeichnen sie aus diesem Grund als Artefakte. Besitzt ein Allel in einer Tumorprobe zwei Gipfel, d.h. zwei dominante Peaks, die das „Stottern“ überragen, so gilt dieser Marker in dieser Probe als instabil. Ansonsten wird die Länge der Peaks in Basenpaaren (bp) gemessen und das Ergebnis von Tumor- und Normalgewebe verglichen. Ergibt sich ein Unterschied, ist der Marker instabil, falls nicht, stabil.

Da die einzelnen Marker, auch die interindividuell stabilen mononukleotidischen BAT25, BAT26, NR21, NR22 sowie NR24, von PCR zu PCR leichte Schwankungen zeigen können, legten Suraweera et al. ^[165] nach eigenen Untersuchungen eine Grenze von +/-3bp für BAT25, NR 21, NR22 und NR24 sowie von +/-4bp für BAT26 als normale Schwankungsbreite fest. Als instabil

gilt demnach nur ein Marker, dessen Länge um mehr als 3bp bzw. 4bp zu- oder abgenommen hat ^[165]. Andere fordern generell einen Unterschied von 4bp zur „am häufigsten beobachteten Allellänge“ eines Locus, um von MSI sprechen zu können ^[49, 191].

In dieser Arbeit wurden sowohl mononukleotidische als auch di- sowie tetranukleotidische Mikrosatelliten untersucht. Die Literatur kennt aber nur für mononukleotidische Marker Auswertekriterien, die sich jedoch je nach Publikation unterscheiden, für Tetranukleotide sind keine genaue Angaben zur Klassifikation in instabil/stabil zu finden. Deshalb wurde für die vorliegende Arbeit ein neues Regime erstellt, das sich an den Angaben aus der Literatur orientiert. Für die „MSI-PCRs“ mit den mono- und dinukleotidischen Markern gilt als sicher instabil ein Locus, dessen Peak um mehr als zwei Einheiten vom Normwert abweicht. Mit Einheit ist hier die Repetitionslänge des jeweiligen Mikrosatelliten gemeint: „ein Basepair“ bei Mononukleotid-Repeats und „zwei Basepairs“ bei Dinukleotid-Repeats. Alternativ gilt als Kriterium für sichere Instabilität eine veränderte Morphe des Peaks mit umgebendem „Stottern“, analog zum zweiten dominanten Peak bei Berg. Als leicht instabil gilt ein Mikrosatellit, der um eine oder zwei Einheiten verschoben ist. Bei der EMAST-Instabilität ist ein Locus eindeutig instabil, wenn sein Peak um zwei oder mehr Einheiten verschoben ist, eine Alteration um eine Einheit gilt als schwach instabil. Bei den Tetranukleotiden besteht eine Einheit analog aus 4bp. Bei EMAST konnte das Kriterium der veränderten Morphe weiter spezifiziert werden. Dabei wird folgender Quotient aus der Länge der beiden Allele jeweils in der Tumor- und der Normalgewebprobe bestimmt (siehe Abbildung 4). Nimmt dieser Quotient Werte größer 3 oder kleiner $\frac{1}{3}$ an, gilt der entsprechende Locus ebenfalls als instabil.

In Abbildung 5 ist eine Auswertungskurve der Fragmentlängenanalyse einer „MSI-PCR“ dargestellt; Abbildung 6 zeigt einen Ausschnitt aus der EMAST-Auswertung.

Abbildung 4. Quotient zur Charakterisierung der Morphe eines Mikrosatelliten

Legende: $Probe_N$: Höhe des Peaks des tumorfreien Normalgewebes; $Probe_T$: Höhe des Peaks des Tumorgewebes.

$\frac{Probe_N \text{ Allel}_1}{Probe_N \text{ Allel}_2}$

$\frac{Probe_T \text{ Allel}_1}{Probe_T \text{ Allel}_2}$

Abbildung 5. Auswertungskurve der Fragmentlängenanalyse einer „MSI-PCR“

Die obere Kurve stellt die des Normalgewebes dar, die untere des Ersttumors. Dabei sind die beiden dinukleotidischen Marker D5S346 (links) sowie D2S123 (rechts) um 2bp bzw 4bp verschoben, also leicht instabil. Bei den anderen Peaks handelt es sich um (von links nach rechts; Position in Klammern): *grün* NR21 (103bp), BAT25 (124bp), NR22 (142bp); *blau* D17S250 (152bp); *schwarz* BAT26 (120bp), NR24 (132bp). Die roten Peaks stellen den Längenstandard dar.

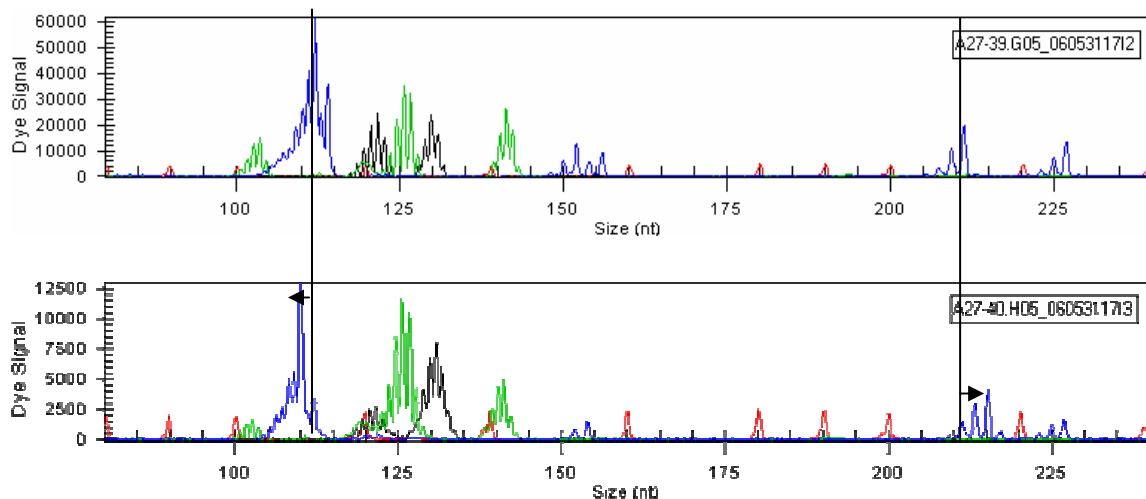
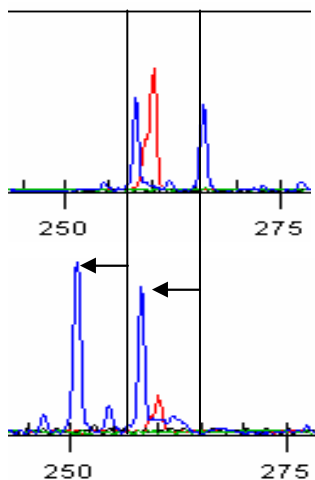


Abbildung 6. Ausschnitt aus einer Auswertungskurve der Fragmentlängenanalyse einer E-MAST-PCR

Der hier dargestellte Mikrosatellit D11S488 (blau) ist um 8bp nach links verschoben und wird damit als eindeutig instabil klassifiziert. Die rote Kurve ist wiederum der Längenstandard.



Wie oben bereits dargestellt wurde, wird in der Literatur zur Klassifikation eines Tumors in MSI-H, MSI-L oder MSS nach Auswertung mehrerer Mikrosatelliten der Konsensus der Bethesda-Konferenz herangezogen. In dieser Arbeit wurde jedoch auf die Einteilung in diese Kategorien verzichtet, um eine höhere Transparenz und bessere Übersichtlichkeit der Ergebnisse zu gewährleisten, ist die Deklaration MSI-H/ MSI-L oder MSS doch bereits eine Zusammenfassung von Ergebnissen, nämlich der Stabilität oder Instabilität an bis zu 16 Loci. Zudem ist die Relevanz der Unterscheidung von MSI-L und MSS bislang nicht geklärt. Es gibt keinen Anhalt für einen Unterschied zwischen MSS und MSI-L, weder in Bezug auf klinische noch auf pathologische Parameter ^[20]. Die Konsensus-Konferenz des NCI im Jahre 1997 empfahl dennoch die Differenzierung von MSS und MSI-L beizubehalten, da weitere Forschung eventuell doch noch eine Relevanz von MSI-L erbringen könnte, vor allem in Bezug auf die Entdeckung und Erforschung weiterer Mikrosatelliten ^[20]. Häufig werden die Gruppen MSI-L und MSS in der Literatur aber zusammengefasst ^[165]; die revidierten Bethesda-Richtlinien schließlich empfehlen ebenfalls eine Trennung von MSI-L und MSS nur noch in Bezug auf die Erforschung neuer

Marker, die eine Instabilität in einem im Entstehen begriffenen Tumor detektieren könnten ^[176]. Aus diesen Gründen wird in dieser Arbeit auf eine Unterteilung in die verschiedenen Instabilitätsgrade verzichtet und stattdessen ein Quotient aus der Zahl der instabilen Marker und der Zahl der untersuchten beziehungsweise auswertbaren Marker angegeben. Dies vermeidet ein durch die Klassifizierung verursachten Informationsverlust, da die Ergebnisse detailliert wiedergegeben werden können.

2.2.6 Statistik

Um zwischen den in der Fragestellung in Kapitel 1.4 formulierten Thesen:

a) Mikrosatelliteninstabilität als Risikogenotyp bereits vor der ersten Tumorerkrankung bestehend und damit prädisponierend sowohl für das erste Malignom als auch für das Sekundärmalignom bzw.

b) MSI induziert durch die Therapie des Primärmalignoms und danach prädisponierend für eine zweite Neoplasie,

vorausgesetzt eine erhöhte MSI-Rate in Sekundärmalignomen im Vergleich mit Einzelmalignomen, unterscheiden zu können, ist es wichtig, eine unterschiedliche Häufigkeit von Mikrosatelliteninstabilität in Einzel- bzw. Sekundärmalignomen (Hinweis für das Zutreffen von These A) oder aber zwischen Primär- und Sekundärmalignomen (Hinweis für das Zutreffen für These B) festzustellen. Dazu wurden unterschiedliche statistische Verfahren in verschiedener Anordnung angewandt.

2.2.6.1 Vergleich von SPN mit Einzelmalignomen

Zum Nachweis unterschiedlicher Häufigkeiten von MSI im Vergleich von Sekundärmalignomen mit Einzelmalignomen wurde der T-Test für unverbundene Stichproben durchgeführt. Dieser Test überprüft, ob das Verhältnis der Mittelwerte zweier unabhängiger Stichproben zufällig zustande gekommen ist, oder ob es allgemein Gültigkeit besitzt und somit im statistischen Sinne signifikant ist ^[80].

2.2.6.2 Untersuchung von SPN: Vergleich von Erst- und Zweittumor

2.2.6.2.1 Häufigkeit von Instabilitätsrate von Erst- und Zweitmalignomen

In einer ersten Untersuchung wurde die Häufigkeit von Instabilität in Zweitmalignomen mit der in Erstmalignomen verglichen, jeweils getrennt nach „MSI“- und EMAST-Panel-Instabilität. Dabei wurde die Anzahl instabiler Marker in Zweitmalignomen abgezogen von der in Erstmalignomen, jeweils gepaart nach korrespondierenden Tumoren, d.h. es wurde jeweils nur die Instabilität des Primärtumors mit der des Sekundärtumors derselben Person miteinander verglichen. Dabei spricht ein Ergebnis größer Null für eine höhere Rate an Instabilität in Zweitmalignomen, ein Ergebnis kleiner Null bedeutet eine Abnahme der Instabilität in Zweitmalignomen und ein Ergebnis von Null entspricht einer gleich hohen Rate an Instabilität in Erst- und Zweittumoren.

2.2.6.2.2 Vergleich der Instabilität einzelner Marker

In einer zweiten Analyse wurde das Auftreten von Instabilität in Erst- und Zweittumoren, getrennt nach einzelnen Markern, untersucht: es wurde also direkt die Instabilität in Primär- und Sekundärmalignom für einen einzelnen Marker verglichen, beispielsweise für den ersten Locus des „MSI-Panels“. Hier wurden nur korrespondierende Malignome miteinbezogen, also Tumoren von den Patienten, von denen je sowohl eine Probe des Erst- als auch des Zweittumors vorlag und auswertbar war, da sonst keine Aussage über das Verhalten von Instabilität in Erst- und Zweitmalignomen zu treffen gewesen wäre. Allerdings verringerte sich dadurch die Zahl der einzubeziehenden Ergebnisse, da vielfach eine Auswertung nur für den Ersttumor oder nur für den Zweittumor möglich war, weniger häufig aber bei beiden. Zudem konnten nicht für jede Probe immer alle Marker des „MSI“-/EMAST-Panels ausgewertet werden, teilweise konnten nur einzelne Mikrosatelliten amplifiziert werden, so dass für manche Loci nur wenige Proben zur Verfügung standen.

Infolgedessen verringerte sich die Fallzahl in der Weise, dass als statistisches Modell nur der „exakte Test nach Fisher“ in Frage kam. Bei diesem Test handelt es sich um einen Signifikanztest, der auch bei kleinen Fallzahlen angewandt werden kann. Dabei werden die Ergebnisse in einer Vierfeldertafel dargestellt

(als Beispiel die für diese Arbeit eingesetzte Tabelle, siehe Tabelle 8) und die Summen der Spalten und Reihen berechnet. Nun wird bestimmt, wie viele Möglichkeiten einer Vierfeldertafel es gibt, die dieselben Reihen- und Zeilensummen aufweist, deren Felder a-d aber andere Werte besitzen, um darüber die Signifikanz der erzielten Ergebnisse zu bestimmen. Die Signifikanz wird dabei mit dem p-Wert angegeben. Dieser wird für drei Fragestellungen berechnet: Left, Right und 2-Tail. Diese Fragestellungen geben eine Aussage über das Zutreffen einer Hypothese. Trifft „Left“ zu, bedeutet dies für diese Arbeit, dass ein stabiler Ersttumor mit hoher statistischer Wahrscheinlichkeit von einem instabilen Zweittumor gefolgt wird. Bei zutreffendem „Right“ folgt auf einen instabilen Ersttumor mit großer Wahrscheinlichkeit ein ebenfalls instabiler Zweittumor. Dabei bedeutet ein niedriger p-Wert ($<0,05$) ein Zutreffen der jeweiligen These, hohe p-Werte sprechen für Nicht-Zutreffen.

Tabelle 8. Vierfeldertafel

Legende: Σ : Summe; n: Gesamtanzahl

	stabil bei Zweitmalignom	instabil bei Zweitmalignom	Σ
stabil bei Erstmalignom	a	b	a+b
instabil bei Erstmalignom	c	d	c+d
Σ	a+c	b+d	n=a+b+c+d

2.2.6.2.3 Vergleich der Instabilität zwischen Erst- und Zweitmalignom

Wurden zunächst, wie in Kapitel 2.2.6.2.2 dargestellt, die einzelnen Marker untersucht hinsichtlich Stabilität an allen Erst- bzw. Zweitmalignomen, die an dem jeweiligen Marker auswertbar waren, so wurden nun Primär- und Sekundärmalignom der einzelnen Patienten verglichen auf Unterschiede der Stabilität im gesamten „MSI“- und EMAS-Panel. Dies wurde wiederum mit dem „exakten Test nach Fisher“ auf Signifikanz überprüft.

2.2.6.3 Merkmalsdefinitionen

Der besseren Lesbarkeit wegen wurde im Rahmen dieser Arbeit in Bezug auf Mikrosatelliten immer von ‚stabil‘ und ‚instabil‘ gesprochen. Tatsächlich jedoch unterteilt sich das Merkmal ‚instabil‘ in ‚leicht instabil‘ und ‚eindeutig instabil‘. Auf diesen Unterschied wurde bei der Darstellung der Auswertekriterien in Kapitel 2.2.5 bereits ausführlich eingegangen. Ist bei der Darstellung der Ergebnisse dieser Arbeit nun von instabilen Mikrosatelliten die Rede, so sind stets die eindeutig instabilen Marker gemeint, während zu den stabilen Markern sowohl die stabilen als auch die leicht instabilen Mikrosatelliten gezählt wurden. Für die Wahl dieser strengen Merkmalsdefinition spricht deren größere Schärfe und Genauigkeit des Ergebnisses sowie die Vorlagen aus der Literatur, die zwar nicht unisono, aber doch zu einem großen Teil für diese Klassifizierung von stabil/instabil wie hier vorgenommen, sprechen. Demnach gilt als instabil ein Marker, wenn er mehr als 4bp in seiner Länge von der des Standards bzw. der des tumorfreien Gewebes abweicht ^[49, 165, 191] (siehe auch Kapitel 2.2.5). Dies entspricht dem „eindeutig stabil“ bei dieser Arbeit, wohingegen eine Abweichung von weniger als 4bp als „leicht instabil“ gewertet wurde.

Dennoch liegt auch im Falle der leichten Instabilität eine Abweichung von der regelhaften Länge vor und es ist eine Instabilität vorhanden, auch wenn deren Relevanz nicht eindeutig geklärt ist. Aus einer unbekanntem Ursache, welche möglicherweise in einem Defekt eines DNA-Reparatursystems begründet ist, kam es zu der Längendifferenz an diesem Marker. Aus diesem Grund wurde zusätzlich eine zweite statistischen Auswertung durchgeführt, die auf einer erweiterten Merkmalsdefinition beruht, wonach als ‚stabil‘ nun ausschließlich die stabilen Marker gewertet werden und als ‚instabil‘ die leicht instabilen ebenso wie die eindeutig stabilen. Die Ergebnisse dieser zweiten statistischen Auswertung nach der erweiterten Merkmalsdefinition sind in einem gesonderten Abschnitt des Ergebnisteils unter Kapitel 3.2.4 dargestellt.

3 Ergebnisse

Insgesamt standen für diese Arbeit 181 Proben zur Verfügung (siehe Tabelle 7), die jeweils mit dem „MSI“- und dem EMAST-Panel analysiert wurden. Mit dem „MSI-Panel“ konnte bei 148 Proben verwertbare Ergebnisse erzielt werden, beim EMAST-Panel waren 82 Proben auswertbar. Für beide Gruppen waren etwas mehr Zweit- als Erstmaligome auswertbar, wie ja auch insgesamt mehr Proben von Zweit- als von Erstmaligomen vorhanden waren (Verhältnis Erst- zu Zweittumor insgesamt 1:1,6; für das „MSI-Panel“ 1:1,5; bei EMAST 1:1,4), siehe auch Tabelle 7 und Tabelle 9.

Für die Referenzgruppe der Einzel malignome waren insgesamt 66 Proben untersucht worden, davon waren 65 mittels „MSI-Panel“ auswertbar gegenüber 32 bei den EMAST-Mikrosatelliten.

Eine Übersicht über die Ergebnisse gibt Tabelle 9.

Tabelle 9. Ergebnisübersicht

Legende: Abkürzungen: ZNS: zentrales Nervensystem. Der MSI-Status ist angegeben als Quotient von instabilen Markern zu auswertbaren Markern.

	„MSI-Panel“				EMAST			
	auswertbare Proben	MSI-Status			auswertbare Proben	MSI-Status		
		Median	min. Wert	max. Wert		Median	min. Wert	max. Wert
Gesamtsumme	148	0,0	0,0	0,8	82	0,3	0,0	1,0
gesundes Gewebe								
Erstmaligome	60	0,0	0,0	0,5	34	0,5	0,0	1,0
gesundes Gewebe								
ZNS-Tumoren	10	0,0	0,0	0,3	2	0,5	0,0	0,5
solide Tumoren (ohne ZNS)	5	0,2	0,0	0,5	3	0,0	0,0	0,0
Leukämien	32	0,0	0,0	0,4				
Lymphome	9	0,0	0,0	0,1	27	0,5	0,0	1,0
sonstige Malignome	4	0,0	0,0	0,2	2	0,2	0,2	0,3
Zweitmaligome	88	0,0	0,0	0,8	48	0,3	0,0	1,0
gesundes Gewebe								
ZNS-Tumoren	15	0,0	0,0	0,8	5	0,2	0,0	0,2
solide Tumoren (ohne ZNS)	5	0,0	0,0	0,0	2	1,0	0,0	1,0
Leukämien	50	0,0	0,0	0,4				
Lymphome	4	0,0	0,0	0,3	31	0,4	0,0	1,0
sonstige Malignome	14	0,0	0,0	0,0	10	0,2	0,0	0,8
Einzelmaligome	65	0,2	0,0	0,4	32	0,4	0,0	1,0
gesundes Gewebe								
solide Tumoren (ohne ZNS)	33	0,2	0,0	0,4	21	0,4	0,0	1,0
Hämatologische Malignome	32	0,2	0,0	0,3	11	0,5	0,0	1,0

3.1 Vergleich von SPN mit Einzel malignomen

Aus den in Tabelle 9 dargestellten Ergebnissen lässt sich ablesen, dass kein signifikanter Unterschied besteht zwischen der Häufigkeit von Instabilität in Einzel malignomen und Sekundärneoplasien. Der Median des MSI-Status von Sekundär malignomen und Einzel malignomen unterscheidet sich in keinem Fall signifikant und ist häufig deckungsgleich. Dies gilt sowohl für das „MSI“- als auch das EMAST-Panel.

3.2 Untersuchung von SPN: Vergleich von Erst- und Zweittumor

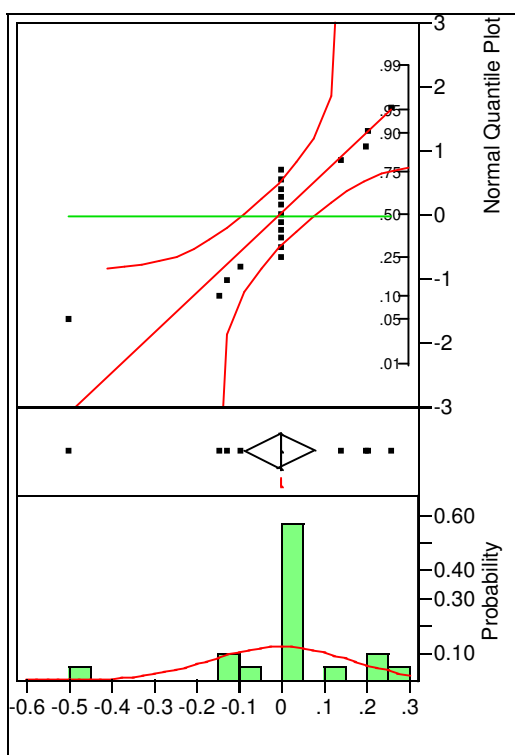
3.2.1 Globale Instabilitätsrate von Erst- und Zweit malignomen

Hierbei waren die Ergebnisse in beiden Gruppierungen sowie für das „MSI-Panel“ als auch das EMAST-Panel identisch. Der Median betrug stets Null, womit kein signifikanter Unterschied in der Auftretenshäufigkeit von Mikrosatelliteninstabilität in Erst- und Zweittumor pädiatrischer Sekundär malignome vorliegt. Beispielhaft wurde die grafische Auswertung dieser Untersuchung in Abbildung 7 vorgestellt.

Abbildung 7. Häufigkeit von MSI in Erst- und Zweitmalignomen

Die Darstellung gibt die Auswertung der Marker des EMAS-Panel wieder.

In der oberen Grafik sind die einzelnen Paare aus Erstmalignom und zugehörigem Zweitmalignom als Punkte wiedergegeben, die über die Werte der voneinander subtrahierten Instabilitätshäufigkeit von Erst- und Zweitmalignom verteilt sind. Die Ordinate gibt dabei die Verteilung in Standardabweichungen an. In der unteren Grafik sind diese Werte dargestellt in Abhängigkeit von der Wahrscheinlichkeit, mit der sie eintreten. Hier wird deutlich, dass der Wert „0“ die mit Abstand größte Wahrscheinlichkeit und damit Häufigkeit von circa 60% besitzt.



3.2.2 Vergleich der Instabilität einzelner Marker

Auch bei der paarweisen Analyse der einzelnen Marker zeigt sich kein signifikant häufigeres Auftreten von Instabilität unter den Zweitmalignomen. Allerdings ist für den einzelnen Marker die Wahrscheinlichkeit für Instabilität im Zweitmalignom erhöht, wenn er bereits im Erstmalignom instabil war. Dies lässt sich als Tendenz durchgehend beobachten und erreicht für einzelne Marker signifikante Werte. Für einen Überblick siehe Tabelle 10.

Tabelle 10. Vergleich der Instabilität an einzelnen Markern

Legende: O2: 2. Marker des „MSI-Panels“; O7 und weitere analog; E1: 1. Marker des EMAST-Panels; E2 und weitere analog. Für einzelne Marker mit zu geringer auswertbarer Probenzahl konnte keine statistische Analyse durchgeführt werden. Signifikante Werte sind grau unterlegt.

Mikrosatellit	„Fisher-Test“	p-Wert
„MSI-Panel“		
	Left	1,0000
O2	Right	0,1667
	2-Tail	0,1667
	Left	1,0000
O7	Right	1,0000
	2-Tail	1,0000
	Left	0,9890
O8	Right	0,2747
	2-Tail	0,2747
„EMAST-Panel“		
	Left	1,0000
E1	Right	0,1429
	2-Tail	0,1429
	Left	1,0000
E2	Right	1,0000
	2-Tail	1,0000
	Left	1,0000
E3	Right	0,0455
	2-Tail	0,0455
	Left	1,0000
E4	Right	0,3333
	2-Tail	0,3333
	Left	0,9848
E5	Right	0,3182
	2-Tail	0,3182
	Left	0,9990
E6	Right	0,0410
	2-Tail	0,0410
	Left	0,9545
E7	Right	0,4545
	2-Tail	0,4545
	Left	1,0000
E8	Right	0,0083
	2-Tail	0,0083

Hierbei fällt auf, dass alle signifikanten Werte bei den EMAST-Mikrosatelliten zu finden sind.

Sämtliche signifikanten Werte treten bei „Right“ und „2-Tail“ auf. „Right“ bedeutet zunächst, dass auf einen instabilen Marker bei Ersttumor mit hoher statistischer Wahrscheinlichkeit ein instabiler Marker beim Zweittumor folgt.

Dies wird noch deutlicher, vergleicht man im Folgenden die Gesamtheit aller Marker des „MSI“- bzw. EMAST-Panels in Erst- und Zweitmalignom. Für 159 auswertbare „MSI-Marker“ gilt: in 145 Fällen sind Erst- und Zweitmalignom stabil, in 6 Fällen sind beide instabil. In einem Fall ist das Erstmalignom stabil und das Zweitmalignom instabil, in sieben Fällen umgekehrt. Diese Assoziation ist hochsignifikant („exakter Test nach Fisher“, $p < 0,00001$). Ähnliches gilt für insgesamt 101 auswertbare EMAST-Marker: in 55 Fällen sind Erst- und Zweitmalignom stabil, in 18 Fällen sind beide instabil. In 14 Fällen ist das Erstmalignom stabil und Zweitmalignom instabil, ebenso in 14 Fällen umgekehrt. Die Assoziation ist signifikant („exakter Test nach Fisher“, $p < 0,05$) (Daten siehe Kapitel 6 (Anhang) Tabelle 15, Tabelle 16).

Diese Ergebnisse belegen, dass Instabilität in Zweittumoren kein Zufallsbefund ist, der mit derselben Häufigkeit auch in Ersttumoren vorkommt, sondern dass eine signifikante Korrelation besteht zwischen der Stabilität bzw. Instabilität eines Mikrosatelliten im Primär- und korrespondierenden Sekundärmalignom.

3.2.3 Vergleich der Instabilität zwischen Erst- und Zweitmalignom der einzelnen Patienten

Waren im vorherigen Kapitel die einzelnen Marker in Erst- und Zweitmalignom verglichen worden, so wurden im vorliegenden Kapitel Erst- und Zweitmalignom jedes einzelnen Patienten direkt hinsichtlich der Instabilität der Marker des „MSI“- bzw. EMAST-Panels miteinander verglichen, wiederum mit dem „exakten Test nach Fisher“. Die Datengrundlage für diese Analyse ist in Tabelle 15 und Tabelle 16 dargestellt.

Dabei gilt für insgesamt 25 Patienten mit auswertbaren „MSI“-Markern: in 17 Fällen sind Erst- und Zweitmalignom stabil, in zwei Fällen sind beide instabil. In zwei Fällen ist das Erstmalignom stabil und Zweitmalignom instabil, in vier

Fällen umgekehrt. Die Assoziation ist nicht signifikant („exakter Test nach Fisher“, $p = 0,23$).

Allerdings gilt für insgesamt 15 auswertbare EMAST-Marker: in 10 Fällen sind Erst- und Zweitmalignom stabil, in fünf Fällen sind beide instabil. In keinem Fall ist das Erstmalignom stabil und Zweitmalignom instabil, die umgekehrte Konstellation tritt ebenfalls nicht ein. Diese Assoziation ist hoch signifikant („exakter Test nach Fisher“, $p < 0,005$).

Damit lässt sich nachweisen, dass nicht nur bestimmte Marker überzufällig häufig in Erst- und Zweitmalignom instabil sind, sondern auch, dass Patienten, die einen instabilen Primärtumor haben, signifikant häufiger einen instabilen Sekundärtumor besitzen.

Es fällt auf, dass Mikrosatelliten, die sowohl beim ersten als auch beim zweiten Malignom instabil sind, häufig die gleiche Morphologie der Peaks in der Fragmentlängenanalyse aufweisen. Konnte in den beiden Abschnitten zuvor (siehe Kapitel 3.2.2 und Kapitel 3.2.3) die Assoziation von Instabilität in Erst- und zugehörigem Zweitmalignom anhand des „exakten Tests nach Fisher“ an einzelnen Markern, sowie einzelnen Patienten gezeigt werden, so kann nun die ähnliche aberrante Morphologie der Peaks von Mikrosatelliten in Erst- und zugehörigen Zweitmalignomen als ein weiterer Hinweis auf das Bestehen eines Zusammenhangs der Mikrosatelliteninstabilität zwischen Primär- und Sekundärmalignom gewertet werden. Siehe hierfür Abbildung 8 und Abbildung 9.

Abbildung 8. Auswertungskurve einer Fragmentlängenanalyse des „MSI-Panels“

Bei dem ersten blauen, hier instabilen Marker, handelt es sich um D5S346. Die obere Kurve zeigt das tumorfreie Gewebe, die mittlere Kurve den Primärtumor und die untere Kurve stellt das Sekundärmalignom dar. Auffallend die Verschiebung von 122bp auf 116bp, die beim ersten Malignom auftritt und sich in derselben Morphe auch im Sekundärmalignom zeigt. Auch wenn die Qualität der unteren Kurve schlechter ist, ist doch die zweigipflige Gestalt des Peaks deutlich zu erkennen. Auch der dritte blaue Marker (D2S123) ist in Primär- und Sekundärtumor in gleicher Weise in seiner Gestalt verändert. Bei den anderen Peaks handelt es sich um (von links nach rechts; Position in Klammern): *grün* NR21 (103bp), BAT25 (124bp), NR22 (142bp); *blau* D17S250 (152bp); *schwarz* BAT26 (120bp), NR24 (132bp). Die roten Peaks stellen den Längenstandard dar. In der oberen Kurve kommt NR21 nicht zur Darstellung.

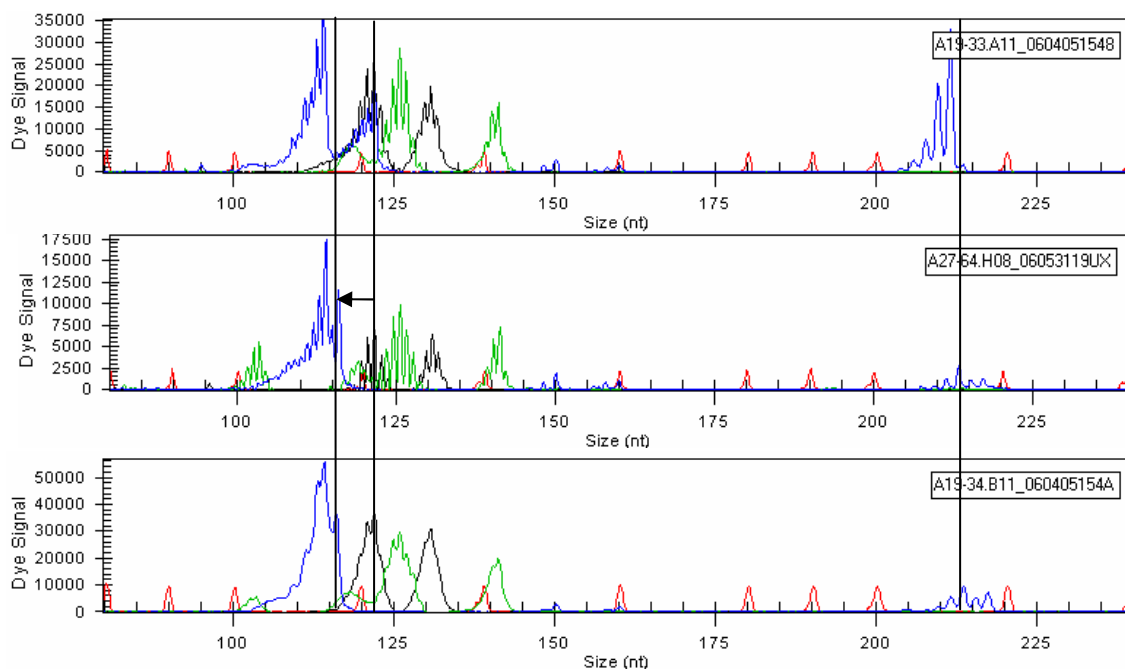
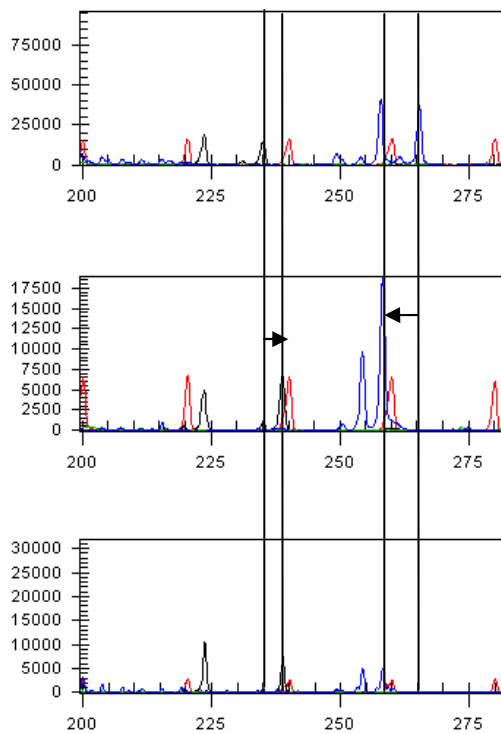


Abbildung 9. Ausschnitt aus einer Auswertungskurve einer Fragmentlängenanalyse des EMAST-Panels

Der schwarze Marker stellt D20S82 dar; bei dem blauen handelt es sich um D11S488. Auch hier fällt auf, dass die Morphologie bei beiden Malignomen in gleicher Weise instabil ist. Bei den roten Peaks handelt es sich um den Längenstandard.



3.2.4 Erweiterte Merkmalsdefinition

Die Ergebnisse nach erweiterter Merkmalsdefinition (siehe Kapitel 2.2.6.3) unterscheiden sich lediglich in Details von der im Hauptteil dargestellten Auswertung, die Schlussfolgerungen bleiben unverändert. Aus diesem Grund kann an dieser Stelle auf eine ausführliche Darstellung zugunsten einer besseren Übersichtlichkeit verzichtet werden. Für die Aufführung der Ergebnisse analog zu den Kapiteln 3.2.1 bis 3.2.3 wird auf auf Kapitel 6 (Anhang) Abbildung 10 sowie Tabelle 17 bis Tabelle 19 verwiesen.

4 Diskussion

4.1 Einleitung

Die Ätiologie kindlicher Tumoren ist immer noch in den meisten Fällen ungeklärt. Ebenso ungeklärt ist die Entstehung von Sekundärmalignomen nach Ersterkrankung im Kindesalter. Die Untersuchungen dieser Arbeit sollten klären, ob ein Defekt des Mismatch-Reparatur-Systems mit der Entwicklung eines Sekundärmalignoms nach einem pädiatrischen Malignom assoziiert ist. Wenn dies zuträfe, dann sollte erarbeitet werden, ob dieser Defekt erworben oder vorbestehend ist. Dazu wurden Proben von an Einzel- und Sekundärmalignomen erkrankten Kindern auf das Vorkommen von Mikrosatelliteninstabilität untersucht und die Häufigkeit zunächst in Einzel- und Sekundärmalignomen verglichen, in einem zweiten Schritt dann zwischen Erst- und Sekundärmalignomen, einmal gegliedert nach Markern und einmal nach Patienten.

Ein signifikant häufigeres Auftreten von MSI in Sekundärmalignomen gegenüber Einzelmalignomen oder gegenüber den Ersttumoren konnte nicht nachgewiesen werden. Statistisch signifikant erwies sich allerdings ein Zusammenhang zwischen einer Instabilität im Primärtumor und Instabilität in der Sekundärneoplasie: tritt in einem pädiatrischen Malignom Mikrosatelliteninstabilität an einem Marker auf und kommt es zur Entwicklung einer Sekundärneoplasie, so ist mit erhöhter Wahrscheinlichkeit dieser Marker wiederum instabil. Dieser Zusammenhang gilt nicht nur für die Instabilität einzelner Markerpaare, sondern auch für die gesamter korrespondierender Malignome.

4.2 Diskussion der Thesen

In der vorliegenden Arbeit konnte eindeutig nachgewiesen werden, dass kein Unterschied besteht in der Häufigkeit von Mikrosatelliteninstabilität in Einzelmalignomen und Sekundärmalignomen (siehe Kapitel 3.1). Deshalb ist

ein Zusammenhang zwischen einem vorbestehenden Defekt des Mismatch-Repair-Systems und der Entwicklung pädiatrischer Sekundärmalignome unwahrscheinlich. Anhand der Häufigkeit von MSI in Einzel- und Sekundärmalignomen lässt sich kein Hinweis auf einen „Mutator-Phänotyp“ ermitteln, der sowohl die Entstehung des Erst- als auch des Zweittumors bedingt und der zum „Hochrisikoprofil“ von Kindern, die ein zweites Malignom entwickeln, beitragen würde. Die Bestimmung des MSI-Status bei Erstdiagnose eines Malignoms in der Pädiatrie hat demnach keine Konsequenz für die Therapie, da Mikrosatelliteninstabilität kein Prädiktor ist für die Entwicklung einer Zweitneoplasie.

Ebensowenig zeigt sich ein Unterschied in der Häufigkeit von MSI zwischen Erst- und Zweitmalignom (siehe Kapitel 3.2.1). Damit ergibt sich kein Hinweis darauf, dass eine Schädigung des Mismatch-Repair-System durch die mutagene Therapie des Primärmalignoms zu genomischer Instabilität führte und damit den Sekundärtumor begünstigte.

Vergleicht man nun die Häufigkeit von MSI getrennt nach „MSI“- und EMAST-Instabilität in Sekundärmalignomen, so fällt auf, dass Instabilität an den Loci des „MSI-Panels“ nur selten auftritt. Der mediane Quotient des MSI-Status für das „MSI-Panel“ liegt bei Null, was kompletter Stabilität der untersuchten Mikrosatelliten entspricht; Instabilität an allen acht untersuchten Loci bei einem Tumor wurde nicht beobachtet. Demgegenüber beträgt der mediane Quotient des MSI-Status bei der EMAST-Instabilität 0,3 (30 % der Marker sind instabil); Instabilität an allen Loci tritt bei mehreren Proben auf (siehe Tabelle 9). Eine „echte MSI“ (siehe Kapitel 1.3.4), wie sie bei der HNPCC mit zugrunde liegendem Mismatch-Repair-Defekt beschrieben wird, spielt demnach bei pädiatrischen Malignomen keine Rolle, da die Marker des „MSI-Panels“, das auf das Bethesda-Panel bei HNPCC zurückgeht (siehe Kapitel 2.2.3), kaum Instabilität aufweisen. Das Bethesda-Panel wurde 1997 etabliert und detektiert in Gewebe von Kolonkarzinomen zuverlässig Mikrosatelliteninstabilität. Tritt hier MSI auf, so gilt ein ursächlich zugrunde liegender Defekt des Mismatch-Repair-Systems als gesichert (Kapitel 1.3.3). Allerdings ist das Bethesda-Panel in seiner Sensitivität auf das Kolonkarzinom beschränkt ^[20]. So gibt es

Untersuchungen, bei denen nachweislich Mismatch-Repair-defizientes Gewebe aus Nebennieren- sowie Schilddrüsen-Tumoren auf MSI getestet wurde und im Test stabil blieb ^[23]. Auch bei einigen hämatologischen Erkrankungen konnte diese Beobachtung von nachgewiesenem Mismatch-Repair-Defekt und stabilen Mikrosatelliten gemacht werden ^[49]. Allerdings gibt es auch Berichte von Fällen, in denen sich eine hohe Rate an Mikrosatelliteninstabilität zeigte, das Mismatch-Repair-System aber erwiesenermaßen intakt war ^[151]. Obwohl die Studienlage uneinheitlich ist und Fälle von Mismatch-Repair-Defekten bei Mikrosatelliten-Instabilität beschrieben sind, scheint es unwahrscheinlich, dass die „echte MSI“ mit zugrunde liegendem Defekt des Mismatch-Reparatur-Systems bei pädiatrischen Sekundärmalignomen eine Rolle spielt. Die beiden Studien, die in Tumoren außerhalb des HNPCC-Spektrums Mikrosatelliten-Stabilität bei vorhandenem Mismatch-Repair-Defekt beschreiben, weisen sehr geringe Fallzahlen auf (2 Patienten bei Broaddus et al. ^[23], 16 Fälle von AML bei Faulkner et al. ^[49]). Zudem untersuchten Faulkner et al. nur drei der fünf im Bethesda-Panel festgelegten Marker, womit auch eine geringere Rate an Instabilität zu erwarten ist, während im Rahmen dieser Arbeit drei weitere von Suraweera et al. für HNPCC empfohlenen Loci ^[165] untersucht wurden, wonach ein deutlich sensitiverer Nachweis von Instabilität zu erwarten wäre. Eine Nachfolgestudie wird dieser Frage mittels immunhistochemischem Nachweis der wichtigsten Mismatch-Reparaturgene MLH1, MSH2 und MSH6 weiter nachgehen.

Damit stehen die Ergebnisse dieser Arbeit im Gegensatz zu den Ergebnissen von Gafanovich et al., die bei pädiatrischen Sekundärmalignomen 100% Instabilität nachwiesen und damit die Existenz eines Mutator-Phänotyps postulierten, der für das Auftreten des Zweitmalignoms verantwortlich sei. Allerdings war bei dieser Studie die Fallzahl mit neun Patienten sehr klein, zudem wurden sieben Mikrosatelliten getestet, von denen nur einer (BAT25) im Bethesda-Panel beinhaltet ist. Darüberhinaus wurde die Auswertung mit radioaktiv markierten Sonden auf Gelbasis durchgeführt, was eine deutlich höhere Fehlerrate aufweist im Vergleich zur Fragmentlängenanalyse mittels Kapillarelektrophorese, die in der vorliegenden Arbeit eingesetzt wurde.

Ist bei der „echten MSI“ bei HNPCC der Zusammenhang zu einem Defekt in den Mismatch-Repair-Genen gesichert, so ist der EMAS-Instabilität keine eindeutige Ursache zugeordnet. Der Einfluss verschiedener Umweltfaktoren sind bei der Entstehung dieser Art der MSI zwar belegt ^[5, 30, 36, 158, 187], können aber gerade bei pädiatrischen Malignomen aufgrund der fehlenden Expositionsdauer vernachlässigt werden (siehe auch Kapitel 1.1.1.1). Auch ein Einfluss der Therapie des Erstmalignoms als Auslöser der EMAS-Instabilität kann ausgeschlossen werden, da hier zwar eine ausreichend hohe Intensität der Exposition vorliegt, die konsekutive Längenveränderungen an den entsprechenden Mikrosatelliten wäre dann allerdings erst in den Sekundärmalignomen zu erwarten. Dort gibt es jedoch kein erhöhtes Auftreten von Instabilität im Vergleich mit den Erstmalignomen. Es wird diskutiert, dass Mutationen von p53 an der Entstehung von EMAS-Instabilität beitragen könnten ^[5, 36], die in pädiatrischen Malignomen häufig nachzuweisen sind ^[51, 87]. Die Ursache der EMAS-Instabilität kann durch die vorliegende Arbeit nicht geklärt werden; ihre Bedeutung ist eher als Indikator genomischer Instabilität zu interpretieren, der anzeigt, dass das präzise System der Erhaltung der Integrität der Erbsubstanz in Replikation und bei Schädigung (siehe Kapitel 1.3.1.1) nicht mehr zuverlässig und fehlerfrei arbeitet. Dadurch ist die Entstehung von Mutationen begünstigt und konsekutiv die Kanzerogenese ^[85].

4.3 Zusammenhang zwischen Instabilität am Primärtumor und zugehörigem Zweittumor

Die in dieser Arbeit ermittelten Daten zur Instabilität von Mikrosatelliten sind jedoch nicht nur als unspezifische Indikatoren einer genomischen Instabilität zu werten. Mikrosatelliten-Instabilität ist nicht zufällig auf Erst- und Zweitmalignome verteilt, sondern es gibt – wie in Kapitel 3.2.3 dargestellt – eine Assoziation zwischen Instabilität in Erst- und Zweitmalignom, wonach mit erhöhter Wahrscheinlichkeit auf einen instabilen Primärtumor ein instabiler Sekundärtumor folgt. Aufgrund dieser Konstellation kann spekuliert werden, dass beide Malignome dieselbe Ursache haben und dass der Mechanismus,

der zu der Instabilität führt, zu der Entstehung sowohl des Primärmalignoms als auch des Sekundärmalignoms geführt hat.

Ein weiteres Argument für eine gemeinsame Ursache der beiden Neoplasien ist die ähnliche Morphe der instabilen Peaks in Primär- und Sekundärmalignom (s. Kapitel 3.2.3). Wäre die Instabilität an einem Marker durch unterschiedliche Mechanismen entstanden, so wäre ein jeweils anderes Bild zu erwarten, es zeigt sich jedoch gehäuft dieselbe alterierte Morphologie. Es ist wichtig an der Stelle nochmals zu betonen, dass es sich bei den Sekundärmalignomen um eigenständige Tumorentitäten handelt und nicht um ein Rezidiv oder eine Metastase des Primärtumors (siehe Kapitel 1.2.1). In diesem Fall wäre eine gleiche Morphe des Peaks eines instabilen Markers erklärbar dadurch, dass das Rezidiv aus dem Gewebe des ersten Tumors hervorgegangen ist. Hier allerdings handelt es sich um zwei eigenständige Neoplasien, die aus jeweils unterschiedlichem Gewebe hervorgegangen sind und dennoch die gleiche Form des Peaks zeigen.

Es ist anzunehmen, dass eine gemeinsame, vorbestehende Alteration vorliegt, welche die genomische Stabilität schwächt. Dadurch kommt es zu vermehrten Mutationen, die auch Onkogene und Tumorsuppressorgene betreffen (siehe Kapitel 1.1.1.2) mit konsekutiv erhöhter Malignomwahrscheinlichkeit, die sich in der Entstehung des Primär- und später des Sekundärtumors manifestiert.

Über diese gemeinsame Ursache kann mit den Daten der vorliegenden Arbeit keine Antwort gegeben werden. Denkbar sind folgende Strukturen:

§ Mismatch-Repair-System:

Ein Defekt in diesem in Kapitel 1.3.1 beschriebenen System bewirkt erwiesenermaßen Instabilität im Genom und erklärt damit die Tumorigenese ebenso wie die Mikrosatelliteninstabilität ^[1]. Dass Defekte im Mismatch-Repair-System mit erhöhtem Aufkommen von Tumoren und Mikrosatelliteninstabilität assoziiert sind, ist für HNPCC und verwandte Tumoren bewiesen (siehe Kapitel 1.3.3). Allerdings gibt es für durch Mismatch-Repair-Defekte verursachte Kanzerogenese außerhalb von HNPCC nur spärliche Hinweise, während in dieser Arbeit mehrfach die Gegenargumente diskutiert wurden (s. Kapitel 1.3.4 und Kapitel 1.3.5). So zum Beispiel die in dieser Arbeit auftretende weitgehende

Stabilität an dem auf die „echte MSI“ abgestimmten „MSI-Panel“, ebenso das uneinheitliche Bild in der Literatur, was den immunhistochemischen Nachweis eines Ausfalls des Mismatch-Repair-Systems in instabilen Tumoren außerhalb des HNPCC-Spektrums anbelangt ^[49, 151].

§ Weitere Stabilitäts-Gene

Stabilitäts-Gene (caretaker-Gene) sind Gene, die für die Stabilität und Integrität des Genoms verantwortlich sind. Ihr Ausfall resultiert in einer erhöhten Mutationsrate und damit in einem steigenden Tumorrisiko (siehe auch Kapitel 1.1.1.2). Bei dem Mismatch-Repair-System handelt es sich um einen solchen caretaker-Mechanismus. An der Aufrechterhaltung der genomischen Stabilität sind jedoch mehrere Stabilitätsgene beteiligt ^[97], so dass ein Ausfall eines anderen DNA-Reparaturmechanismus als Ursache der in dieser Arbeit diskutierten genomischen Instabilität vorstellbar ist. Einige sollen im Folgenden dargestellt werden:

- BRCA1 und BRCA2. Hierbei handelt es sich um zwei Stabilitätsgene, die neben zahlreichen anderen Aufgaben in der DNA-Replikation Funktionen der DNA-Reparatur wahrnehmen. Ihr Ausfall führt zu dramatisch erhöhtem Risiko für Mamma- und Ovarialkarzinom ^[189].
- RecQ-Helicase. Dies stellt einen in der Evolution hoch konservierten Mechanismus zur Erhaltung der DNA-Stabilität dar. Seine spezifische Aufgabe ist die Reparatur defekter Replikationsgabeln, sein Ausfall mündet in Erkrankungen, die mit erhöhtem Malignomrisiko assoziiert sind (Werner-Syndrom: Vergreisungssyndrom mit Beginn des Alterungsprozesses ab der Pubertät, dabei tritt Ausdünnen und Graufärbung der Haare auf sowie bilaterale Katarakt, Diabetes mellitus Typ II, Osteoporose und Atherosklerose; ein Krebsrisiko besteht vor allem gegenüber Weichteilsarkomen und Osteosarkomen. Bloom-Syndrom: seltene Erkrankung mit Wachstumsstörungen im Sinne eines proportionalen Kleinwuchses, Immundefizienz, Infertilität, Diabetes mellitus Typ II, Lichtempfindlichkeit sowie einer erhöhten Suszeibilität gegenüber Krebserkrankungen, wobei die Entitäten das gesamte Spektrum an Malignomen des Erwachsenen umfassen; mittleres Erkrankungsalter der

Tumoren: 24 Jahre. Rothmund-Thomson-Syndrom: Vergreisungssyndrom mit nur gering erhöhtem Malignomrisiko ^[111].) ^[67].

Allerdings ist der Ausfall oben angeführter Stabilitätsmechanismen mit einem relativ genau definierten Tumorspektrum verbunden, wie BRCA1-Mutationen und Mamma- bzw. Ovarialkarzinom, so dass ein kausaler Zusammenhang zwischen der im Rahmen dieser Arbeit beobachteten Mikrosatelliteninstabilität und dem Auftreten mehrerer histologisch eigenständiger Tumoren unwahrscheinlich ist, da er die große Vielfalt an auftretenden Malignomen nicht erklären kann.

§ Überexpression der apurinischen/ apyrimidinischen Endonuklease (APE)

Die APE ist eine Endonuklease, die sowohl bei der Reparatur zellulärer DNA als auch an der Regulation der Transkriptionsfaktoren beteiligt ist. In einer Reihe von Malignomen (Ovarialkarzinom, Zervixkarzinom, Prostatakarzinom, Gliome, Rhabdomyosarkome, Keimzelltumore) konnte eine deutliche Mikrosatelliteninstabilität (MSI-H) bei Überexpression von APE nachgewiesen werden. Dies wird erklärt durch einen blockierenden Effekt von APE auf das Mismatch-Repair-Protein MSH6, das an der Reparatur von Fehlpaarungen innerhalb der DNA beteiligt ist (siehe Kapitel 1.3.1.1.1), so dass bei immunhistochemischem Nachweis aller Mismatch-Repair-Proteine das Mismatch-Repair-System dennoch nicht suffizient arbeitet. Dieser Mechanismus erklärt erhöhte Raten an Instabilität sowie vermehrtes Auftreten von Malignomen. Ausgelöst wird die Überexpression von APE durch freie Radikale, die gehäuft in entzündlichen Prozessen auftreten, so dass der Pfad aus erhöhtem APE-Level, insuffizientem Mismatch-Repair-System, daraus resultierend erhöhter Mutationsrate und vermehrter Karzinogenese als Erklärung für die inflammations-vermittelte Onkogenese dient ^[32]. Allerdings handelt es sich bei den pädiatrischen Malignomen nicht um Tumore, die auf entzündlicher Basis entstehen, zudem ist die durch Blockierung durch APE verursachte Mismatch-Repair-Insuffizienz wiederum mit einer eindeutigen Instabilität im „MSI-Panel“ verknüpft, welche in dieser Arbeit nicht vorliegt.

§ Defekt von p53

Dieses Tumorsuppressorgen wird codiert durch TP53 auf Chromosom 17p13 [12]. Dieses Gen ist das häufigste, das in Malignomen beim Menschen Veränderungen aufweist [68, 69]. P53 ist an der Regulation des Zellzyklus beteiligt und reagiert auf genotoxische Noxen (ionisierende Strahlung, UV-Strahlung, zytotoxische Medikamente) ebenso wie auf nicht genotoxische Schädigungen der Zelle (Hypoxie, Verlust des Zellkontaktes) jeweils mit Stopp des Zellzyklus (Seneszenz) oder Überleitung in die Apoptose [12, 142]. Außerdem hat es einen hemmenden Einfluss auf die Angiogenese und begünstigt die DNA-Reparatur [12]. Neben den sporadischen Veränderungen von TP53, die in der Hälfte aller Krebserkrankungen des Menschen auftreten [10], gibt es einen Defekt von p53, der bereits in der Keimbahn angelegt ist. Dieser Defekt führt zu einem erblichen Tumorsyndrom, dem Li-Fraumeni-Syndrom (siehe Kapitel 1.2.2.3 und Kapitel 1.2.3.5), das zu einem weiten Spektrum von Tumoren prädisponiert in Abhängigkeit von der Lokalisation der Mutation in TP53 und welches von Kolon über Lunge, Ösophagus, Mamma, Leber und ZNS bis zum hämatopoietischen System reicht [69, 142]. Auch in pädiatrischen Malignomen wird ein Zusammenhang mit p53-Defekten gesehen. So zeigten sich in kindlichen Ewing-Sarkomen und Rhabdomyosarkomen in einem hohen Prozentsatz Veränderungen an p53 [51, 87]. Ein Zusammenhang zwischen Mutationen von p53 und Sekundärmalignomen beschränkt sich bislang auf hereditäre p53-Defekte. Träger einer solchen Mutation allerdings haben ein erhöhtes Risiko für die Entwicklung von Sekundärmalignomen [99, 126, 142], insbesondere aufgrund erhöhter Vulnerabilität gegenüber der Therapie des Erstmalignoms [126].

Es sind die große Häufigkeit, mit der ein verändertes TP53 in Tumoren gefunden wird und die große Bandbreite der Tumorentitäten, für die es prädisponiert, die die prominente Bedeutung dieses Tumorsuppressorgens für die Onkogenese ausmachen. Im Kontext dieser Arbeit jedoch ist der Aspekt von besonderer Relevanz, dass ein Defekt von p53 zu genomischer Instabilität führt. Im Falle eines Defekts in den Mismatch-Repair-Genen zeigt sich diese genomische Instabilität in Veränderungen an Mikrosatelliten. Bei p53-Mutationen dagegen wird häufig Aneuploidie festgestellt, d.h. einzelne oder

mehrere Chromosomen liegen nicht zweifach vor, sondern einzeln oder mehrfach. Diese Instabilität wird im Gegensatz zur Mikrosatelliteninstabilität auch als chromosomale Instabilität bezeichnet. Aneuploidie ist häufig in soliden Tumoren nachweisbar ^[88] und entsteht während der Mitose. Eine solche dysbalancierte Mitose wird normalerweise verhindert durch einen Arrest im „mitotic checkpoint“, an dem mehrere Gene beteiligt sind, die der Gruppe der Tumorsuppressorgene zuzuordnen sind: Außer p53 sind daran BRCA1 (siehe unten) und RB (siehe 1.1.1.3) beteiligt ^[188].

Aneuploidie und Mikrosatelliteninstabilität wie sie im HNPCC-Spektrum gesehen wird, werden als zwei unterschiedliche Formen der genomischen Instabilität gesehen, die beide zur Entwicklung von Malignomen prädisponieren ^[6, 128, 154, 168, 183], sich jedoch in ihrer Ätiologie unterscheiden. Während die „echte MSI“ verursacht wird durch einen Ausfall des Mismatch-Repair-Systems, ist Aneuploidie unter anderem auf p53-Defekte zurückzuführen ^[188]. Für die Entstehung der EMAS-Instabilität werden verschiedene Ursachen diskutiert; als gesichert gilt ein Einfluss von Umweltfaktoren und als wahrscheinlich ein Zusammenhang mit p53-Mutationen ^[5, 36].

Bei p53 handelt es sich demnach um ein Tumorsuppressorgen, dessen Ausfall eine EMAS-Instabilität verursachen kann, wie sie in dieser Arbeit beobachtet wird, und die im Zusammenhang mit genomischer Instabilität und Tumorprädisposition gesehen wird. Des Weiteren findet sich ein p53-Defekt nicht nur in 50% aller Malignome, sondern gehäuft auch in pädiatrischen Malignomen. Es kann spekuliert werden, dass es sich bei dem oben postulierten Mechanismus, der sowohl das Erst- als auch das Zweitmalignom begünstigt, um eine Störung im p53-System handelt.

Dadurch ließe sich mehr erklären als nur die Entstehung einiger am EMAS-Panel instabiler Sekundärmalignome, deren Zahl gemessen an der Gesamtheit aller Zweittumore klein ist. P53-Defekte werden ja erwiesenermaßen nicht nur in den Zusammenhang mit EMAS-Instabilität gebracht, sondern sind auch für Aneuploidie verantwortlich, die in den meisten Malignomen gesehen wird. Zudem wird der Defekt von p53 selbst in der Hälfte aller Tumoren gefunden, so dass die Ätiologie eines weitaus größeren Anteils von Sekundärmalignomen

und pädiatrischen Krebserkrankungen zumindest teilweise erklärt werden könnte. Diese Überlegungen sind jedoch in ihren Schlussfolgerungen spekulativ und bedürfen weiterer Forschung. Eine weitere Untersuchung von Proben von Sekundärmalignomen nach Ersterkrankung im Kindesalter sollte auf p53-Defekte testen sowie die Häufigkeit des Auftretens von Aneuploidie feststellen. Sollten dabei signifikante Assoziationen zwischen p53-Defekt, Aneuploidie sowie EMAS-Instabilität gefunden werden, würde dies die These von p53 als zu Sekundärmalignomen prädisponierendem Mechanismus weiter stützen.

4.4 Schlussfolgerung

Jedoch bleibt festzuhalten, dass diese unbekannte gemeinsame Ursache nur einen Teil der pädiatrischen Malignome und Zweitmalignome erklärt, da der überwiegende Teil der Malignome stabile Mikrosatelliten aufweist. Die Ätiologie pädiatrischer Malignome ist in den meisten Fällen multifaktoriell, und der oben postulierte Mechanismus trüge nur zu einem Ausschnitt der beobachteten Malignome bei. Die beobachtete Mikrosatelliteninstabilität selbst ist dabei kein vorbestehender Risikofaktor für die Entwicklung von Malignomen, da kein gehäuftes Auftreten von MSI in Sekundärmalignomen im Vergleich zu Einzelmalignomen beobachtet werden kann. Ebenso wenig tritt eine Instabilität häufiger in Sekundärtumoren verglichen mit den Primärtumoren auf, so dass eine therapieassoziierte Genese der Malignome unwahrscheinlich ist.

Bei der Subgruppe von Malignomen jedoch, bei denen eine Assoziation besteht zwischen dem Auftreten von Instabilität am Primärtumor und zugehörigem Sekundärmalignom und bei der auch dieselbe aberrante Morphologie der Peaks der Fragmentlängenanalyse (siehe Kapitel 3.2.3) beobachtet wird, ist ein Zusammenhang zwischen dem Entstehungsmechanismus der Tumoren sowie dem Auftreten der Mikrosatelliteninstabilität denkbar.

Für das Zustandekommen der in dieser Arbeit beobachteten Mikrosatelliteninstabilität und die Assoziation des Auftretens in Tumorproben einer Person wurden in Kapitel 4.3 verschiedene Mechanismen diskutiert. Es wird angenommen, dass es einen Pathomechanismus gibt, der beide Phänomene verursacht; sowohl das Auftreten der Instabilität an einem Marker

und, da er die Instabilität sowohl im Primär- als auch im Sekundärtumor verursacht, auch deren Assoziation. Neben diesen oben genannten Störungen, die über den Weg der Mikrosatelliteninstabilität für die Entstehung von Primär- und Sekundärtumor verantwortlich sein könnten, sind weitere Mechanismen wie p53-Mutationen vorstellbar. P53 wird im Zusammenhang gesehen mit der in dieser Arbeit beschriebenen Instabilität an EMAST-Markern ^[5, 36], sowie mit der Entstehung von Malignomen allgemein ^[10, 51, 87] und könnte somit beides erklären, die Mikrosatelliteninstabilität als auch das Auftreten von Sekundärmalignomen.

Die Klärung der Ätiologie pädiatrischer Malignome wird also ganz allgemein Gegenstand der Forschung bleiben, ebenso wie im Speziellen die Untersuchung der Frage nach den zugrundeliegenden Mechanismen der Entstehung von Sekundärmalignomen und dem Zusammenhang zwischen Erst- und Zweitmalignom. Wird dieser Pathomechanismus eruiert und sind die ätiologischen Zusammenhänge bei der Entstehung pädiatrischer Malignome besser verstanden, so kann durch gezielte Adaptation von Diagnostik und Therapie die Prognose dieser Erkrankungsgruppe weiter verbessert werden. Damit wäre ein großer Schritt getan bei der Bewältigung der größten Herausforderung in der Langzeitnachsorge pädiatrischer Tumorpatienten, die Prävention, Früherkennung und Behandlung von Sekundärmalignomen nach Ersterkrankung im Kindesalter ^[76, 139].

5 Zusammenfassung

Die Ätiologie kindlicher Malignome ist bislang weitgehend ungeklärt. Da eine Akkumulation von Schäden, welche durch Noxen aus der Umwelt gesetzt wurden, wegen der zu geringen Expositionsdauer als Auslöser wenig wahrscheinlich ist, werden endogene Ursachen wahrscheinlicher. Dies gilt in besonderer Weise für Kinder, die eine Sekundärneoplasie entwickeln.

Diese erhöhte genetische Prädisposition zur Entwicklung von Malignomen kann in einem Defekt des DNA-Mismatch-Repair-Systems begründet sein. Dieser Defekt äußert sich in zunehmender Fehlerhaftigkeit der DNA, da aberrante DNA nicht mehr korrigiert wird. Diese genomische Instabilität kann durch Instabilität von Mikrosatelliten (MSI) detektiert werden. Tatsächlich konnten einige Arbeiten eine erhöhte Rate von MSI in Zweitmalignomen nach Ersterkrankung im Kindesalter feststellen ^[29, 57].

Falls eine Mismatch-Repair-Störung in Zweitmalignomen gehäuft nachweisbar ist, stellt sich die Frage, ob dieser Defekt, falls ursächlich für die Entstehung von Sekundärmalignomen, bereits vor der Ersterkrankung bestand und sich gewissermaßen zwei Risiken zu einem Risikoprofil addieren, nämlich die Vulnerabilität per se gegeben durch das inaktive DNA-Reparatursystem und zudem das dadurch potenzierte mutagene Potential der Therapie des Primärmalignoms. Alternativ ist denkbar, dass die schädigende Wirkung der Therapie des Erstmalignoms einen Defekt des Mismatch-Repair-Systems erst auslöst und damit zu Sekundärmalignomen prädisponiert.

Zur Beantwortung dieser Fragestellung wurden alle über das Kinderkrebsregister in Mainz zugänglichen Proben (insgesamt 181 Proben, siehe Kapitel 2.1) von pädiatrischen Sekundärmalignomen sowie eine Serie von pädiatrischen Einzelmalignomen (66 Proben, siehe Kapitel 2.1) auf das Vorliegen von Mikrosatelliteninstabilität hin untersucht. Es wurde sowohl die sogenannte „echte MSI“ getestet, als auch eine weitere Form der MSI, die EMAST-Instabilität, welche auf Umwelteinflüsse und in vorausgehenden Studien mit einem p53-Defekt assoziiert war ^[5, 36]. Dabei ergab sich kein signifikanter Unterschied in der Häufigkeit von MSI, weder zwischen Einzel- und

Sekundärmalignomen, noch zwischen Primär- und Sekundärtumoren. Eine „echte MSI“ wurde nur vereinzelt beobachtet. Damit ist ein Defekt des Mismatch-Repair-Systems als Ursache und Auslöser der Zweitneoplasie unwahrscheinlich, weder als vorbestehend noch als durch die Therapie des Erstmalignoms ausgelöst. Diese Beobachtung kann durch den immunhistochemischen Nachweis der wichtigsten Mismatch-Reparaturgene MLH1, MSH2 sowie MSH6 in einer Folgestudie weiter bestätigt werden.

Allerdings konnte eine signifikante Assoziation zwischen einem instabilen Marker der E-MAST-Instabilität im Erstmalignom und zugehörigen Zweitmalignom gefunden werden, wonach ein instabiler Marker mit hoher statistischer Signifikanz im folgenden Zweitmalignom ebenso instabil ist. Dies ist umso bemerkenswerter, als dass diese Zweitneoplasie eine histologisch eigenständige Entität darstellt, die nicht aus dem Gewebe des Primärtumors hervorgegangen ist. Für die Subgruppe der Malignome, die eine Instabilität aufweist, kann deshalb über eine noch nicht definierte gemeinsame Ursache des Erst- und Zweitmalignoms spekuliert werden. Diese könnte beispielsweise in einem Defekt des Tumorsuppressorgens p53 begründet sein, da dieser Defekt einerseits das Auftreten der in dieser Arbeit beobachteten E-MAST-Instabilität erklären könnte, andererseits p53-Mutationen direkt an der Entstehung von Tumoren beteiligt sind. An dieser Stelle wären weitere Studien wünschenswert, die das Auftreten von E-MAST-Instabilität und p53-Mutationen in pädiatrischen Sekundärmalignomen untersuchen und so die Ätiologie pädiatrischer Malignome weiter erhellen.

6 Anhang

Tabelle 11. Protokoll Phenolextraktion

Legende: Abkürzungen: rpm: Umdrehungen; EtOH: Ethanol; dH₂O: destilliertes Wasser; IAA: Isoamyl-Alkohol; TE: Tris-EDTA-Puffer

1. Entparaffinierung

- Geraspelte Paraffinschnitte + 900 µl Xylol
- gut vortexen, zentrifugieren: 2 min, 13000 rpm
- Xylolüberstand abziehen, in Sondermüll
- Xylol-Zugabe wiederholen
- Xylol-Zugabe 2. mal wiederholen
- Pellet + 900 µl EtOH 100%
- gut vortexen, zentrifugieren: 3 min, 13000 rpm,
- EtOH-Zugabe wiederholen
- Pellet 15 min im Exsikkator trocknen

2. Lyse

- Pellet in 200 µl P2 Puffer resuspendieren
- ggf. 10 min bei 100 °C kochen
- auf Eis abkühlen, + 10 µl Proteinase K (20 mg/ml)
- 2 h bei 56 °C auf Thermoschüttler inkubieren oder über Nacht bei 37 °C

3. Aufreinigung DNA-Überstand

- 210 µl Prot.K-verdaute Probe + 210 µl Phenol/Chloroform/IAA 25:24:1 (TE-gesättigt)
- vortexen, zentrifugieren: 10 min, 13000 rpm,
- Überstand in ein neues Eppendorf-Gefäß
- Untere Phenolphase mit 200µl dH₂O,
- erneut vortexen und zentrifugieren
- Überstand mit dem des 1. Durchgangs vereinigen
- 400 µl Chloroform/IAA (24:1) zugeben
- vortexen, zentrifugieren: 5 min, 13000 rpm,
- Überstand in neues Eppendorf-Gefäß
- + 1/10 Vol 8M LiCl- = 40µl
- + 2,5 Vol 100% EtOH = 1000µl
- EtOH-Fällung über Nacht bei -20 °C

4. "Ernten" der Nukleinsäuren

- Alle Arbeiten auf Eis durchführen
- zentrifugieren: 30 min, 13000 rpm, 4 °C
- Ethanol abpipettieren-Pellet
- 800 µl 70% EtOH (-20 °C), vortexen
- 3 Minuten anzentrifugieren, 13000 rpm, 4 °C
- Überstand komplett abziehen
- Pellet 15 min lyophilisieren
- Pellet in 25-200µl dH₂O aufnehmen
- Für Photometermessung: 1:25 (3 mit 72 Aqua) verdünnen
- Anschließend auf 50µg/ml verdünnen

Tabelle 12. Polymerasenkettenreaktion: Primer, Ansatz und Protokoll

Legende: Abkürzungen: bp: Basenpaare; dH₂O: destilliertes Wasser; dNTP: Desoxyribonukleosidtriphosphate. Multiplex-Kit siehe Tabelle 13.

Literatur: Primer: „MSI-Panel“: Berg, K.D. et al. in J Mol Diagn (2000) ^[11] und Suraweera, N. et al. in Gastroenterology (2002) ^[165]; EMAS: Xu, L. et al. in Int J Cancer (2001) ^[187].

I Primer		
“MSI-Panel“:		
1. NR21	Primer: Forward Reverse Größe des Produkts: Position im Genom:	Nukleotidsequenz 5' - 3' TAA ATG TAT GTC TCC CCT GG ATT CCT ACT CCG CAT TCA CA 103bp
2. D5S346	Primer: Forward Reverse Größe des Produkts: Position im Genom:	Nukleotidsequenz 5' - 3' ACT CAC TCT AGT GAT AAA TCG GG AGC AGA TAA GAC AGT ATT ACT AGT T 105bp-111bp
3. BAT26	Primer: Forward Reverse Größe des Produkts: Position im Genom:	Nukleotidsequenz 5' - 3' TGA CTA CTT TTG ACT TCA GCC AAC CAT TCA ACA TTT TTA ACC C 120bp
4. BAT25	Primer: Forward Reverse Größe des Produkts: Position im Genom:	Nukleotidsequenz 5' - 3' TCG CCT CCA AGA ATG TAA GT TCT GCA TTT TAA CTA TGG CTC 124bp
5. NR24	Primer: Forward Reverse Größe des Produkts: Position im Genom:	Nukleotidsequenz 5' - 3' CCA TTG CTG AAT TTT ACC TC ATT GTG CCA TTG CAT TCC AA 132bp
6. NR22	Primer: Forward Reverse Größe des Produkts: Position im Genom:	Nukleotidsequenz 5' - 3' AAT TCG GAT GCC ATC CAG TT GAG GCT TGT CAA GGA CAT AA 142bp
7. D17S250	Primer: Forward Reverse Größe des Produkts: Position im Genom:	Nukleotidsequenz 5' - 3' GGA AGA ATC AAA TAG ACA AT GCT GGC CAT ATA TAT ATT TAA ACC 143bp-160bp
8. D2S123	Primer: Forward Reverse Größe des Produkts: Position im Genom:	Nukleotidsequenz 5' - 3' AAA CAG GAT GCC TGC CTT TA GGA CTT TCC ACC TAT GGG AC 204bp-215bp

EMAST:		
1. D9S242	Primer: Forward Reverse Größe des Produkts: Position im Genom:	Nukleotidsequenz 5' - 3' GTG AGA GTT CCT TCT GGC ACT CCA GTA CAA GAC TCT G 160bp 9q32-33
2. CSF1R	Primer: Forward Reverse Größe des Produkts: Position im Genom:	Nukleotidsequenz 5' - 3' CAG GTT GCT AAC CAC CCT GT GTG CAC CAT TGG ACA GCA TT 180bp 5q33.4-34
3. ACTBP2	Primer: Forward Reverse Größe des Produkts: Position im Genom:	Nukleotidsequenz 5' - 3' AAT CTG GGC GAC AAG AGT GA ACA TCT CCC CTA CCG CTA TA 230bp 5
4. D20S82	Primer: Forward Reverse Größe des Produkts: Position im Genom:	Nukleotidsequenz 5' - 3' GCC TTG ATC ACA CCA CTA CA GTG GTC ACT AAA GTT TCT GCT 250bp 20
5. UT5320	Primer: Forward Reverse Größe des Produkts: Position im Genom:	Nukleotidsequenz 5' - 3' ACC GAC AGA CTC TTG CCT C TTG AGA TGA CCC TGA GAC TG 265bp 8
6. D11S488	Primer: Forward Reverse Größe des Produkts: Position im Genom:	Nukleotidsequenz 5' - 3' AGG CAA TCG AGA CCC TGT G GAT GAA TTG TTA CTG AGA G 280bp 11q24.1-25
7. UT5037	Primer: Forward Reverse Größe des Produkts: Position im Genom:	Nukleotidsequenz 5' - 3' GGA TAT AGC TGG CAA TGG C TCG GAA TGC CTA CTT CCC AG 313bp 8
8. L17686	Primer: Forward Reverse Größe des Produkts: Position im Genom:	Nukleotidsequenz 5' - 3' GCA CCA ATG CTC CAG AAA TG TCA TGG TGC CAT GAT AGG AG 326bp 7q31-32

II Ansatz				
„MSI-Panel“:	Reaktionsansatz:	10µl		
	Template	1µl	Konzentration:	50 µg/ml
	Aqua	3µl		dH ₂ O
	Primer-Mix „MSI“ 1-8	1µl	Konzentration:	je 0,25 µM
	2fach Multiplex-Kit	5µl		enthält Taq, Puffer, MgCl, dNTP
EMAST I:	Reaktionsansatz:	10µl		
	Template	1µl	Konzentration:	50 µg/ml
	Aqua	3µl		dH ₂ O
	Primer-Mix EMAST 1+5	1µl	Konzentration:	je 0,25 µM
	2fach Multiplex-Kit	5µl		enthält Taq, Puffer, MgCl, dNTP
EMAST II	Reaktionsansatz:	10µl		
	Template	1µl	Konzentration:	50 µg/ml
	Aqua	3µl		dH ₂ O
	Primer-Mix EMAST 2+3	1µl	Konzentration:	je 0,25 µM
	2fach Multiplex-Kit	5µl		enthält Taq, Puffer, MgCl, dNTP
EMAST III	Reaktionsansatz:	10µl		
	Template	1µl	Konzentration:	50 µg/ml
	Aqua	3µl		dH ₂ O
	Primer-Mix EMAST 4+6-8	1µl	Konzentration:	je 0,25 µM
	2fach Multiplex-Kit	5µl		enthält Taq, Puffer, MgCl, dNTP
III PCR-Protokoll				
„MSI-Panel“:	1. Denaturierung, initial	95°C	15'	
	2. Denaturierung	94°C	30"	
	3. Annealing	58°C	90"	die Schritte 2.-4. werden 45x wiederholt
	4. Elongation	72°C	60"	
	5. Elongation, final	60°C	30'	
EMAST I-III:	1. Denaturierung, initial	95°C	15'	
	2. Denaturierung	94°C	30"	
	3. Annealing	58°C	90"	die Schritte 2.-4. werden 35x wiederholt
	4. Elongation	72°C	60"	
	5. Elongation, final	60°C	30'	

Tabelle 13. Quiagen Multiplex PCR Kit

Legende: Abkürzungen: kDa: kilo-Dalton, DNA: Desoxyribonukleinsäure, EC: Escherichia coli, PCR: Polymerasekettenreaktion, dNTP: Desoxyribonukleosidtriphosphat, dATP: Desoxyadenosintriphosphat, dCTP: Desoxycytidintriphosphat, dGTP: Desoxyguanosintriphosphat, dTTP: Desoxythymidintriphosphat.

Katalog-Nr.:	206143
Inhalt:	
HotStarTaq DNA Polymerase	modifizierte Form einer rekombinanten 94kDa DNA-Polymerase von <i>Thermus aquaticus</i> , kloniert in <i>E.coli</i> (DNA Desoxynucleotidyltransferase, EC 2.7.7.7)
Multiplex PCR-Puffer	6mM MgCl ₂ , pH 8,7 (20 °C)
dNTP Mischung	dATP, dCTP, dGTP, dTTP
„Q-Lösung“	fünffach konzentriert
RNase-freies Wasser	PCR-Qualität

Tabelle 14. Fragmentlängenanalyse

Legende: Abkürzungen: SLS: Sample-Loading-Solution.

Sequenzierapparat:	Ceq 8000 Genetic Analysis System der Firma Beckman Coulter Seriennummer 3066820
Software:	Ceq System 8000, Version 9.0.25 Instrument Version
Algorithmen:	Sequence Analysis Algorithm Version 2.3.13 Fragment Analysis Algorithm Version 2.3.4
Ansatz:	1µl PCR-Produkt 30µl SLS-Puffer 0,8µl Standard 400 überschichtet mit 50µl Mineralöl
Standard 400:	Genome-Lab DNA-Größenstandard der Firma Beckman Coulter Bestell-Nr.: 608098
SLS-Puffer:	Sample-Loading-Solution der Firma Beckman Coulter

Tabelle 15. Vergleich der Instabilität an einzelnen Markern: EMAST

Dargestellt sind hier die Untersuchungen des EMAST(E)-Panels, bei denen Ergebnisse jeweils sowohl für Erst(1)- als auch für das Zweitmaligom(2) vorhanden waren.

Legende: 0=stabil; 1=leicht instabil; 2= instabil (siehe auch Kapitel 2.2.5). Rot eingefärbt sind Instabilitäten, die in Erst- und Zweittumor an diesem Marker vorkommen; Grün bedeutet Instabilität nur im Primärtumor; Blau steht für Instabilität nur im Sekundärtumor. Keine Werte sind bei Markern eingetragen, die in dieser Probe nicht auswertbar waren. IQ steht für Instabilitätsquotient und bezeichnet das Verhältnis instabiler Marker zur Anzahl auswertbarer Marker einer Probe. Die Probennummer identifiziert die einzelnen Proben und ist hier nicht fortlaufend, da nur die Proben dargestellt sind, bei denen eine Auswertung sowohl des Erst- als auch des Zweittumors möglich war.

Probennummer	1E1	1E2	1E3	1E4	1E5	1E6	1E7	1E8	IQ*)	2E1	2E2	2E3	2E4	2E5	2E6	2E7	2E8	IQ*)
3	-	0	0	-	0	-	-	-	0	-	0	0	-	0	0	0	0	0
7	-	0	-	-	-	0	1	-	1/3	-	0	-	-	-	0	0	-	0
8	-	0	0	-	0	0	0	1	1/6	-	0	-	-	0	1	0	-	1/4
9	-	-	-	0	-	1	0	1	1/2	-	0	0	0	0	0	0	0	0
13	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	0	0	0	0	0	0	0	0
17	-	0	0	0	0	0	0	0	0	-	0	0	0	0	0	0	0	0
18	-	0	0	-	0	0	1	-	1/5	-	0	0	-	0	0	0	0	0
43	2	0	2	1	2	2	0	2	3/4	-	0	2	2	-	2	2	2	5/6
64	1	0	0	0	0	2	2	2	1/2	0	0	0	2	0	0	0	3	1/4
65	0	0	0	1	0	0	0	1	1/4	0	0	0	1	0	0	1	1	3/8
66	0	0	0	0	0	-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
130	-	1	2	1	1	2	2	2	1	-	1	2	-	2	2	2	2	3/4
139	2	2	2	-	2	-	-	-	1	2	0	2	0	2	2	1	1	3/4
206	0	0	3	0	0	0	-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
208	-	0	2	2	2	2	0	-	2/3	-	1	0	2	0	2	2	2	5/7

Tabelle 16. Vergleich der Instabilität an einzelnen Markern: „MSI-Panel“

Legende: analog zu Tabelle 15 sind hier die Ergebnisse des „MSI(O)-Panels“ dargestellt.

Probennummer	1O1	1O2	1O3	1O4	1O5	1O6	1O7	1O8	IQ*)	2O1	2O2	2O3	2O4	2O5	2O6	2O7	2O8	IQ*)
7	0	0	-	0	-	0	0	-	0	0	-	0	0	0	0	-	-	0
8	-	0	-	-	-	-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
9	0	2	0	0	0	0	1	0	¼	0	0	0	0	0	0	0	0	0
17	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1/8
18	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
38	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
43	0	1	0	0	0	0	1	2	3/8	0	1	0	0	0	0	1	2	3/8
64	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
65	-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
66	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
99	0	2	0	0	0	0	-	-	1/6	0	2	0	0	0	0	0	0	1/8
106	0	0	0	2	0	0	-	-	1/6	-	0	-	0	-	-	0	0	0
111	-	0	0	0	-	0	-	-	0	-	0	0	0	0	0	-	-	0
128	-	0	0	0	0	0	-	-	0	0	0	0	0	0	0	-	-	0
130	0	0	0	0	0	0	1	0	1/8	0	0	0	0	0	0	1	0	1/8
131	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
139	-	2	0	0	0	0	0	2	2/7	0	0	0	0	0	0	0	0	0
140	2	-	0	2	0	0	-	-	2/5	0	0	0	0	-	0	-	-	0
148	0	-	0	0	0	0	-	-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
156	0	-	0	0	0	0	-	-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
196	-	-	0	0	0	0	-	-	0	-	0	0	0	0	0	-	0	0
206	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	0	0
208	0	0	0	0	0	0	0	1	1/8	0	0	0	0	0	0	0	2	1/8
209	0	-	0	0	0	0	-	-	0	-	1	0	0	0	0	-	2	2/7
259	0	-	0	0	0	0	-	-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
263	-	-	0	0	0	0	-	-	0	-	0	0	0	0	0	-	0	0
264	0	-	0	0	0	0	-	-	0	0	0	0	0	0	0	-	0	0

Abbildung 10. Häufigkeit von MSI in Erst- und Zweitmalignomen (nach erweiterter Merkmalsdefinition)

Die Darstellung gibt die Auswertung der Marker des „MSI-Panels“ wieder.

In der oberen Grafik sind die einzelnen Paare aus Erstmalignom und zugehörigem Zweitmalignom als Punkte wiedergegeben, die über die Werte der voneinander subtrahierten Instabilitätshäufigkeit von Erst- und Zweitmalignom verteilt sind. Die Ordinate gibt dabei die Verteilung in Standardabweichungen an. In der unteren Grafik sind diese Werte dargestellt in Abhängigkeit von der Wahrscheinlichkeit, mit der sie eintreten. Hier wird deutlich, dass der Wert „0“ die mit Abstand größte Wahrscheinlichkeit und damit Häufigkeit von circa 75% besitzt.

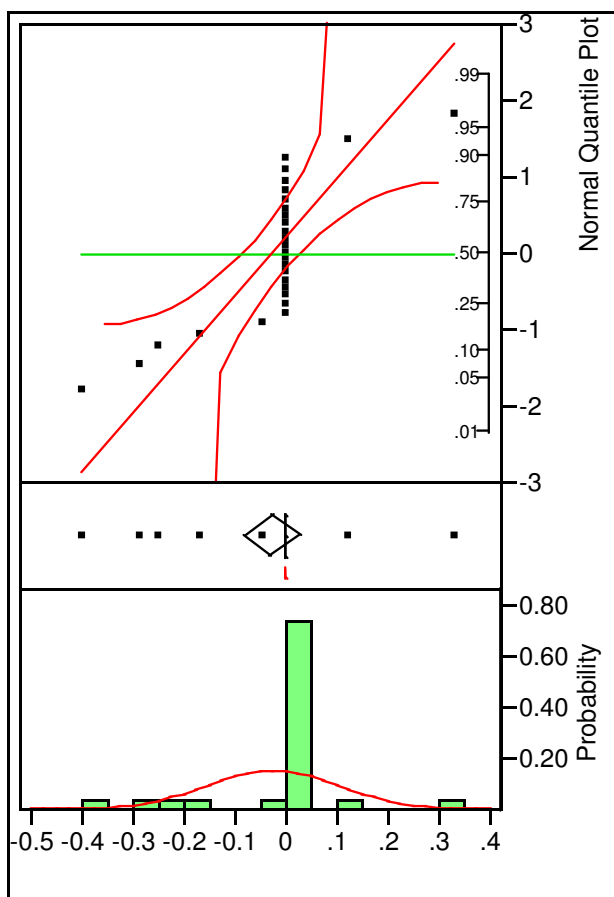


Tabelle 17. Vergleich der Instabilität an einzelnen Markern (nach erweiterter Merkmalsdefinition)

Legende: O2: 2. Marker des „MSI-Panels“; O4 und weitere analog; E1: 1. Marker des EMAST-Panels; E2 und weitere analog. Für einzelne Marker mit zu geringer auswertbarer Probenzahl konnte keine statistische Analyse durchgeführt werden. Signifikante Werte sind grau unterlegt.

Mikrosatellit	„Fisher-Test“	p-Wert
„MSI-Panel“		
	Left	1,0000
O2	Right	0,0392
	2-Tail	0,0392
	Left	1,0000
O4	Right	1,0000
	2-Tail	1,0000
	Left	1,0000
O7	Right	0,0385
	2-Tail	0,0385
	Left	0,9973
O8	Right	0,0934
	2-Tail	0,0934
„EMAST-Panel“		
	Left	1,0000
E1	Right	0,2857
	2-Tail	0,2857
	Left	0,9890
E2	Right	0,2747
	2-Tail	0,2747
	Left	1,0000
E3	Right	0,0455
	2-Tail	0,0455
	Left	1,0000
E4	Right	0,0476
	2-Tail	0,0476
	Left	1,0000
E5	Right	0,0455
	2-Tail	0,0455
	Left	0,9770
E6	Right	0,2028
	2-Tail	0,2657
	Left	0,5939
E7	Right	0,8586
	2-Tail	1,0000
	Left	1,0000
E8	Right	0,0238
	2-Tail	0,0476

Tabelle 18. Vergleich der Instabilität zwischen Erst- und Zweitmalignom der einzelnen Patienten („EMAST-Panel“, nach erweiterter Merkmalsdefinition)

Legende: Σ : Summe der Spalten bzw. der Zeilen.

Dargestellt sind die Ergebnisse für das „EMAST-Panel“ in erweiterter Merkmalsdefinition. Datengrundlage sind die Zahlen der Tabelle 15.

	Stabil bei Zweitmalignom	Instabil bei Zweitmalignom	Σ
stabil bei Erstmalignom	5	0	5
instabil bei Erstmalignom	3	7	10
Σ	8	7	15

„exakter Test nach Fisher“:	left	1,0000
	right	0,0186
	2-tail	0,0256

Tabelle 19. Vergleich der Instabilität zwischen Erst- und Zweitmalignom der einzelnen Patienten („MSI-Panel“, nach erweiterter Merkmalsdefinition)

Legende: Σ : Summe der Spalten bzw. der Zeilen.

Dargestellt sind die Ergebnisse für das „MSI-Panel“ in erweiterter Merkmalsdefinition. Datengrundlage sind die Zahlen der Tabelle 16.

	Stabil bei Zweitmalignom	Instabil bei Zweitmalignom	Σ
stabil bei Erstmalignom	17	2	19
instabil bei Erstmalignom	4	4	8
Σ	21	6	27

„exakter Test nach Fisher“:	left	0,9963
	right	0,0441
	2-tail	0,0441

Tabelle 20. Gesamttabelle Entitäten

Abkürzungen: ZNS: zentrales Nervensystem; ALL: akute lymphatische Leukämie; AML: akute myeloische Leukämie; NHL: Non-Hodgkin Lymphom; MDS: myelo-dysplastisches Syndrom; s: Standardabweichung.

- Legende: 1) bei Gruppen $n < 6$ wurde keine Standardabweichung berechnet
 2) von Diagnose Erstmalignom an bzw. bei Zweitmalignomen von Diagnose Zweitmalignom an
 3) Quotient aus Anzahl instabiler Marker / auswertbarer Marker
 4) nur eine auswertbare Probe
 5) Erstmalignom/Zweitmalignom

Auflistung der einzelnen Entitäten:

Erstmalignome	
<i>solide Malignome:</i>	Astrozytom, Meningeom, pilozytisches Astrozytom, PNET, Ependymom, spez. ZNS-Tumor
ZNS-Tumoren	spez. ZNS-Tumor
Knochentumoren	Ewingsarkom, Osteosarkom
Weichteiltumoren	Rhabdomyosarkom, spez. Weichteilsarkom
Neuroblastom	Neuroblastom
<i>hämatologische Malignome:</i>	
ALL	ALL
AML	AML
sonstige Leukämien	CML, unspez. Leukämie
NHL	Burkitt-Lymphom, NHL
Hodgkin-Lymphom	Hodgkin-Lymphom
<i>sonstige Malignome:</i>	Nephroblastom, Schilddrüsen-Carcinom, Keimzelltumor, unbekannt
Zweitmalignome	
<i>solide Malignome:</i>	anaplastisches Meningeom, Astrozytom, PNET, Ependymom, spez. ZNS-Tumor
ZNS-Tumoren:	spez. ZNS-Tumor
Knochentumoren:	Osteosarkom
Weichteiltumoren:	Rhabdomyosarkom, Fibrosarkom, anaplast. Leyomyosarkom, Synovialsarkom, spez. Weichteiltumor
Neuroblastom	Neuroblastom
<i>hämatologische Malignome:</i>	
ALL	ALL
AML	AML
MDS:	MDS, sekundäre MDS
sonstige Leukämien:	CML, CMML, unspez. Leukämie
NHL:	Burkitt-Lymphom, NHL, lymphoretikuläre NPL
Hodgkin-Lymphom	Hodgkin-Lymphom
<i>sonstige Malignome:</i>	AS in Remission; Gonaden-TU: embryonales Karzinom; fibröses malignes Histiozytom; Keimzelltumor; LCH; malignes Melanom; Ovarial-Teratom; papilläres apokrines Karzinom; Schilddrüsen-Karzinom; Sigma-Karzinom; unbekannt

Geschlechterverteilung:

	Anzahl	Jungen	[%]	Mädchen	[%]	Sex unbekannt	[%]
Proben insgesamt	181	99	55%	71	39%	11	6%
<u>Erstmalignome</u>	80	45	56%	35	44%	1	1%
<i>solide Malignome:</i>							
ZNS-Tumoren	14	10	71%	4	29%	0	0%
Knochentumoren	2	1	50%	1	50%	0	0%
Weichteiltumoren	3	0	0%	2	67%	1	33%
Neuroblastom	4	2	50%	2	50%	0	0%
<i>hämatologische Malignome:</i>							
ALL	32	17	53%	15	47%	0	0%
AML	7	5	71%	2	29%	0	0%
sonstige Leukämien	2	0	0%	2	100%	0	0%
NHL	8	5	63%	3	38%	0	0%
Hodgkin-Lymphom	3	1	33%	2	67%	0	0%
<i>sonstige Malignome:</i>							
Entitäten siehe oben	5	4	80%	1	20%	0	0%
<u>Zweitmalignome</u>	128	67	52%	54	42%	7	5%
<i>solide Malignome:</i>							
ZNS-Tumoren	18	10	56%	7	39%	1	6%
Knochentumoren	3	0	0%	2	67%	1	33%
Weichteiltumoren	7	4	57%	3	43%	0	0%
Neuroblastom	3	1	33%	1	33%	1	33%
<i>hämatologische Malignome:</i>							
ALL	8	3	38%	5	63%	0	0%
AML	27	16	59%	11	41%	0	0%
MDS	33	18	55%	14	42%	1	3%
sonstige Leukämien	4	4	100%	0	0%	0	0%
NHL	8	5	63%	2	25%	1	13%
Hodgkin-Lymphom	-	-	-	-	-	-	-
<i>sonstige Malignome:</i>							
Entitäten siehe oben	17	6	35%	9	53%	2	12%
Referenzproben insgesamt	66	45	68%	21	32%	0	0%
<i>solide Malignome:</i>							
Osteosarkom	13	7	54%	6	46%	0	0%
Rhabdomyosarkom	21	16	76%	5	24%	0	0%
<i>hämatologische Malignome:</i>							
NHL	12	10	83%	2	17%	0	0%
Hodgkin-Lymphom	20	12	60%	8	40%	0	0%

Altersverteilung:

	Alter				
	Durchschnitt	unbekannt	s	min. Wert	max. Wert
Proben insgesamt	6,74/12,61 ⁵⁾	27/8 ⁵⁾	4,75/6,00 ⁵⁾	0,00/0,75 ⁵⁾	19,92/32,17 ⁵⁾
<u>Erstmalignome</u>	6,62	2	4,58	0	16,92
<i>solide Malignome:</i>					
ZNS-Tumoren	6,39	0	5,68	0,92	16,92
Knochentumoren	10,25	0	¹⁾	9,33	11,17
Weichteiltumoren	5,64	0	¹⁾	0,00	2,08
Neuroblastom	4,90	0	¹⁾	3,50	6,83
<i>hämatologische Malignome:</i>					
ALL	5,78	0	3,43	1,42	15,17
AML	6,10	1	5,96	0,33	16,08
sonstige Leukämien	9,63	0	¹⁾	8,75	10,5
NHL	8,36	0	4,57	3,58	14,67
Hodgkin-Lymphom	9,08	0	¹⁾	3,58	10,33
<i>sonstige Malignome:</i>					
Entitäten siehe oben	8,65	1	¹⁾	0,67	16,50
<u>Zweitmalignome</u>	12,39	7	6,24	0,75	32,17
<i>solide Malignome:</i>					
ZNS-Tumoren	14,25	1	5,89	6,25	32,17
Knochentumoren	10,71	1	¹⁾	7,50	13,92
Weichteiltumoren	15,25	0	10,00	3,75	28,67
Neuroblastom	9,63	1	¹⁾	1,33	17,92
<i>hämatologische Malignome:</i>					
ALL	12,63	0	5,54	2,75	18,92
AML	12,24	0	6,55	0,75	22,50
MDS	10,98	1	5,52	1,25	21,00
sonstige Leukämien	11,77	0	¹⁾	6,50	16,25
NHL	11,17	1	4,58	3,17	16,50
Hodgkin-Lymphom	-	-	-	-	-
<i>sonstige Malignome:</i>					
Entitäten siehe oben	13,41	2	6,91	0,92	25,58
Referenzproben insgesamt	11,18	0	5,82	0,5	22,58
<i>solide Malignome:</i>					
Osteosarkom	13,70	0	2,07	11,42	16,92
Rhabdomyosarkom	6,03	0	5,33	0,50	16,92
<i>hämatologische Malignome:</i>					
NHL	12,57	0	7,06	4,17	22,58
Hodgkin-Lymphom	14,12	0	3,21	5,67	21,5

Anzahl untersuchter Proben:

	Anzahl					
	Normal gewebe	[%]	Tumorgewebe (Ersttumor)	[%]	Tumorgewebe (Zweittumor)	[%]
Proben insgesamt	107	59%	80	44%	128	71%
<u>Erstmalignome</u>	52	65%	80	100%	46	58%
<i>solide Malignome:</i>						
ZNS-Tumoren	4	29%	14	100%	7	50%
Knochentumoren	1	50%	2	100%	1	50%
Weichteiltumoren	2	67%	3	100%	3	100%
Neuroblastom	4	100%	4	100%	4	100%
<i>hämatologische Malignome:</i>						
ALL	22	69%	32	100%	16	50%
AML	6	86%	7	100%	3	43%
sonstige Leukämien	2	100%	2	100%	1	50%
NHL	6	75%	8	100%	7	88%
Hodgkin-Lymphom	2	67%	3	100%	2	67%
<i>sonstige Malignome:</i>						
Entitäten siehe oben	3	60%	5	100%	2	40%
<u>Zweitmalignome</u>	73	57%	46	36%	128	100%
<i>solide Malignome:</i>						
ZNS-Tumoren	3	17%	7	39%	18	100%
Knochentumoren	0	0%	1	33%	3	100%
Weichteiltumoren	0	0%	2	29%	7	100%
Neuroblastom	2	67%	0	0%	3	100%
<i>hämatologische Malignome:</i>						
ALL	4	50%	4	50%	8	100%
AML	16	59%	11	41%	27	100%
MDS	26	79%	4	12%	33	100%
sonstige Leukämien	3	75%	4	100%	4	100%
NHL	6	75%	4	50%	8	100%
Hodgkin-Lymphom	-	-	-	-	-	-
<i>sonstige Malignome:</i>						
Entitäten siehe oben	14	82%	8	47%	17	100%
Referenzproben insgesamt	40	61%	26	39%		
<i>solide Malignome:</i>						
Osteosarkom	12	92%	13	100%		
Rhabdomyosarkom	14	67%	21	100%		
<i>hämatologische Malignome:</i>						
NHL	8	67%	12	100%		
Hodgkin-Lymphom	6	30%	20	100%		

Daten des Follow-up:

	Follow-up				
	Follow-up	verstorben	Follow-up-Dauer (Median) ²⁾	min. Wert	max. Wert
Proben insgesamt	156	72/156	8,88	0,00	33,92
<u>Erstmalignome</u>	79	34/79	8,83	0,50	25,08
<i>solide Malignome:</i>					
ZNS-Tumoren	14	6/14	11,83	2,08	25,08
Knochentumoren	2	2/2	5,21	4,33	6,08
Weichteiltumoren	3	1/3	5,92	3,83	15,33
Neuroblastom	4	3/4	6,38	2,67	9,00
<i>hämatologische Malignome:</i>					
ALL	32	14/32	8,75	1,00	24,42
AML	7	1/7	10,83	5,92	22,50
sonstige Leukämien	2	2/2	9,67	5,58	13,75
NHL	8	5/8	4,88	0,50	11,75
Hodgkin-Lymphom	3	0/3	13,83	7,50	15,25
<i>sonstige Malignome:</i>					
Entitäten siehe oben	4	0/4	16,67	2,25	18,75
<u>Zweitmalignome</u>	123	51/123	2,17	0,08	22,17
<i>solide Malignome:</i>					
ZNS-Tumoren	17	9/17	2,08	0,42	9,33
Knochentumoren	2	2/2	0,79	0,05	1,08
Weichteiltumoren	7	3/7	2,08	0,92	22,17
Neuroblastom	2	1/2	4,04	0,67	7,42
<i>hämatologische Malignome:</i>					
ALL	8	4/8	2,88	0,92	6,17
AML	27	16/27	0,58	0,08	14,17
MDS	33	9/33	2,92	0,17	7,58
sonstige Leukämien	4	2/4	3,42	0,25	16,92
NHL	7	1/7	5,92	0,25	11,08
Hodgkin-Lymphom	-	-	-	-	-
<i>sonstige Malignome:</i>					
Entitäten siehe oben	16	4/16	4,29	0,75	17,00
Referenzproben insgesamt					
<i>solide Malignome:</i>					
Osteosarkom					
Rhabdomyosarkom					
<i>hämatologische Malignome:</i>					
NHL					
Hodgkin-Lymphom					

Instabilitätsquotient Erstumoren „MSI-Panel“:

	Instabilitätsquotient ³⁾ Erstumor „MSI-Panel“				
	Median	Mittelwert	s	min. Wert	max. Wert
Proben insgesamt	0,00	0,05	0,11	0,00	0,38
<u>Erstmalignome</u>					
<i>solide Malignome:</i>					
ZNS-Tumoren	0,00	0,05	0,11	0,00	0,25
Knochentumoren		0,00	⁴⁾		
Weichteiltumoren		0,50	⁴⁾		
Neuroblastom	0,17	0,11	¹⁾	0,00	0,17
<i>hämatologische Malignome:</i>					
ALL	0,00	0,03	0,09	0,00	0,38
AML	0,00	0,04	0,10	0,00	0,25
sonstige Leukämien	0,19	0,19	¹⁾	0,13	0,25
NHL	0,00	0,04	0,06	0,00	0,13
Hodgkin-Lymphom	0,00	0,00	¹⁾	0,00	0,00
<i>sonstige Malignome:</i>					
Entitäten siehe oben	0,00	0,11	¹⁾	0,00	0,17
<u>Zweitmalignome</u>					
<i>solide Malignome:</i>					
ZNS-Tumoren	0,00	0,00	¹⁾	0,00	0,00
Knochentumoren		0,40	¹⁾		
Weichteiltumoren		0,00	¹⁾		
Neuroblastom	-	-	-	-	-
<i>hämatologische Malignome:</i>					
ALL	0,06	0,06	¹⁾	0,00	0,13
AML	0,15	0,12	0,12	0,00	0,33
MDS	0,00	0,13	¹⁾	0,00	0,38
sonstige Leukämien	0,06	0,06	¹⁾	0,00	0,13
NHL	0,00	0,00	¹⁾	0,00	0,00
Hodgkin-Lymphom	-	-	-	-	-
<i>sonstige Malignome:</i>					
Entitäten siehe oben	0,00	0,09	¹⁾	0,00	0,29
Referenzproben insgesamt	0,17	0,02	0,09	0,00	0,38
<i>solide Malignome:</i>					
Osteosarkom	0,25	0,05	0,14	0,00	0,38
Rhabdomyosarkom	0,20	0,02	0,11	0,00	0,29
<i>hämatologische Malignome:</i>					
NHL	0,17	0,03	0,02	0,00	0,17
Hodgkin-Lymphom	0,29	0,01	¹⁾	0,00	0,29

Instabilitätsquotient Ersttumoren EMAST-Panel:

	Instabilitätsquotient ³⁾ Ersttumor EMAST				
	Median	Mittelwert	s	min. Wert	max. Wert
Proben insgesamt	0,50	0,25	0,29	0,00	0,86
<u>Erstmalignome</u>					
<i>solide Malignome:</i>					
ZNS-Tumoren	0,50	0,25	1)	0,00	0,50
Knochentumoren	-	-	-	-	-
Weichteiltumoren	-	-	-	-	-
Neuroblastom		0,00	1)	0,00	0,00
<i>hämatologische Malignome:</i>					
ALL	0,33	0,25	0,29	0,00	1,00
AML	0,50	0,25	1)	0,00	0,67
sonstige Leukämien	0,80	0,80	1)	0,57	1,00
NHL	0,67	0,50	1)	0,00	1,00
Hodgkin-Lymphom		0/8	4)		
<i>sonstige Malignome:</i>					
Entitäten siehe oben	0,20	0,20	1)	0,17	0,25
<u>Zweitmalignome</u>					
<i>solide Malignome:</i>					
ZNS-Tumoren	0,00	0,00	1)	0,00	0,00
Knochentumoren	-	-	-	-	-
Weichteiltumoren	-	-	-	-	-
Neuroblastom	-	-	-	-	-
<i>hämatologische Malignome:</i>					
ALL	0,57	0,60	1)	0,20	1,00
AML	0,29	0,20	0,22	0,00	0,67
MDS		0,75	4)		
sonstige Leukämien		0,50	4)		
NHL	0,14	0,04	1)	0,00	0,14
Hodgkin-Lymphom	-	-	-	-	-
<i>sonstige Malignome:</i>					
Entitäten siehe oben	0,75	0,38	1)	0,00	4/4
Referenzproben insgesamt	0,40	0,25	0,29	0,00	1,00
<i>solide Malignome:</i>					
Osteosarkom	0,50	0,17	0,29	0,00	0,67
Rhabdomyosarkom	0,33	0,22	0,29	0,00	1,00
<i>hämatologische Malignome:</i>					
NHL	0,67	0,29	0,44	0,00	1,00
Hodgkin-Lymphom	0,38	0,29	1)	0,00	0,75

Instabilitätsquotient Zweittumoren „MSI-Panel“:

	Instabilitätsquotient ³⁾ Zweittumor „MSI-Panel“				
	Median	Mittelwert	s	min. Wert	max. Wert
Proben insgesamt	0,00	0,05	0,12	0,00	0,75
<u>Erstmalignome</u>					
<i>solide Malignome:</i>					
ZNS-Tumoren	0,00	0,00	1)	0,00	0,00
Knochentumoren		0,00	4)		
Weichteiltumoren	0,13	0,15	1)	0,00	0,33
Neuroblastom	0,13	0,13	1)	0,00	0,25
<i>hämatologische Malignome:</i>					
ALL	0,00	0,05	0,13	0,00	0,38
AML	-	-	-	-	-
sonstige Leukämien	-	-	-	-	-
NHL	0,13	0,12	0,14	0,00	0,33
Hodgkin-Lymphom		0,00	4)		
<i>sonstige Malignome:</i>					
Entitäten siehe oben	0,00	0,00	1)	0,00	0,00
<u>Zweitmalignome</u>					
<i>solide Malignome:</i>					
ZNS-Tumoren	0,00	0,07	0,20	0,00	0,75
Knochentumoren	0,00	0,00	1)	0,00	0,00
Weichteiltumoren		0,00	4)		
Neuroblastom		0,00	4)		
<i>hämatologische Malignome:</i>					
ALL	0,00	0,02	0,05	0,00	0,13
AML	0,00	0,05	0,10	0,00	0,33
MDS	0,00	0,06	0,12	0,00	0,38
sonstige Leukämien	0,29	0,21	1)	0,00	0,33
NHL	0,00	0,06	1)	0,00	0,25
Hodgkin-Lymphom	-	-	-	-	-
<i>sonstige Malignome:</i>					
Entitäten siehe oben	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Referenzproben insgesamt					
<i>solide Malignome:</i>					
Osteosarkom					
Rhabdomyosarkom					
<i>hämatologische Malignome:</i>					
NHL					
Hodgkin-Lymphom					

Instabilitätsquotient Zweittumoren „MSI-Panel“:

	Instabilitätsquotient ³⁾ Zweittumor EMAST				
	Median	Mittelwert	s	min. Wert	max. Wert
Proben insgesamt	0,25	0,22	0,33	0,00	1,00
<u>Erstmalignome</u>					
<i>solide Malignome:</i>					
ZNS-Tumoren	0,20	0,05	1)	0,00	0,20
Knochentumoren		0,38	4)		
Weichteiltumoren	1,00	0,71	1)	0,13	1,00
Neuroblastom	0,25	0,33	1)	0,00	1,00
<i>hämatologische Malignome:</i>					
ALL	0,25	0,20	0,14	0,00	0,83
AML	-	-	-	-	-
sonstige Leukämien	-	-	-	-	-
NHL	0,86	0,33	1)	0,00	1,00
Hodgkin-Lymphom		0/7	4)		
<i>sonstige Malignome:</i>					
Entitäten siehe oben		0/8	4)		
<u>Zweitmalignome</u>					
<i>solide Malignome:</i>					
ZNS-Tumoren	0,20	0,08	1)	0,00	0,20
Knochentumoren		5/5	4)		
Weichteiltumoren	-	-	-	-	-
Neuroblastom		0/3	4)		
<i>hämatologische Malignome:</i>					
ALL	0,63	0,43	1)	0,00	1,00
AML	0,25	0,20	0,33	0,00	1,00
MDS	0,44	0,38	0,33	0,13	1,00
sonstige Leukämien	1,00	0,50	1)	0,00	1,00
NHL	0,00	0,00	1)	0,00	0,00
Hodgkin-Lymphom	-	-	-	-	-
<i>sonstige Malignome:</i>					
Entitäten siehe oben	0,25	0,17	0,25	0,00	0,75
Referenzproben insgesamt					
<i>solide Malignome:</i>					
Osteosarkom					
Rhabdomyosarkom					
<i>hämatologische Malignome:</i>					
NHL					
Hodgkin-Lymphom					

7 Literatur

- [1] Aaltonen, L. A., Peltomaki, P., Leach, F. S., Sistonen, P., Pylkkanen, L., Mecklin, J. P., Jarvinen, H., Powell, S. M., Jen, J., Hamilton, S. R., . (1993)
Clues to the pathogenesis of familial colorectal cancer
Science, **260**, 812-816
- [2] Acharya, S., Wilson, T., Gradia, S., Kane, M. F., Guerrette, S., Marsischky, G. T., Kolodner, R., Fishel, R. (1996)
hMSH2 forms specific mispair-binding complexes with hMSH3 and hMSH6
Proc Natl Acad Sci U S A, **93**, 13629-13634
- [3] Adamson, A. W., Beardsley, D. I., Kim, W. J., Gao, Y., Baskaran, R., Brown, K. D. (2005)
Methylator-induced, mismatch repair-dependent G2 arrest is activated through Chk1 and Chk2
Mol Biol Cell, **16**, 1513-1526
- [4] Aebi, S., Kurdi-Haidar, B., Gordon, R., Cenni, B., Zheng, H., Fink, D., Christen, R. D., Boland, C. R., Koi, M., Fishel, R., Howell, S. B. (1996)
Loss of DNA mismatch repair in acquired resistance to cisplatin
Cancer Res, **56**, 3087-3090
- [5] Ahrendt, S. A., Decker, P. A., Doffek, K., Wang, B., Xu, L., Demeure, M. J., Jen, J., Sidransky, D. (2000)
Microsatellite instability at selected tetranucleotide repeats is associated with p53 mutations in non-small cell lung cancer
Cancer Res, **60**, 2488-2491
- [6] Andrew, S. E., Peters, A. C. (2001)
DNA instability and human disease
Am J Pharmacogenomics, **1**, 21-28
- [7] Baker, S. M., Bronner, C. E., Zhang, L., Plug, A. W., Robatzek, M., Warren, G., Elliott, E. A., Yu, J., Ashley, T., Arnheim, N., Flavell, R. A., Liskay, R. M. (1995)
Male mice defective in the DNA mismatch repair gene PMS2 exhibit abnormal chromosome synapsis in meiosis
Cell, **82**, 309-319
- [8] Behrens, C., Travis, L. B., Wistuba, I. I., Davis, S., Maitra, A., Clarke, E. A., Lynch, C. F., Glimelius, B., Wiklund, T., Tarone, R., Gazdar, A. F. (2000)
Molecular changes in second primary lung and breast cancers after therapy for Hodgkin's disease
Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, **9**, 1027-1035
- [9] Ben-Yehuda, D., Krichevsky, S., Caspi, O., Rund, D., Polliack, A., Abeliovich, D., Zelig, O., Yahalom, V., Paltiel, O., Or, R., Peretz, T., Ben-Neriah, S., Yehuda, O., Rachmilewitz, E. A. (1996)
Microsatellite instability and p53 mutations in therapy-related leukemia suggest mutator phenotype
Blood, **88**, 4296-4303
- [10] Benard, J., Douc-Rasy, S., Ahomadegbe, J. C. (2003)
TP53 family members and human cancers
Hum Mutat, **21**, 182-191

- [11] Berg, K. D., Glaser, C. L., Thompson, R. E., Hamilton, S. R., Griffin, C. A., Eshleman, J. R. (2000)
Detection of microsatellite instability by fluorescence multiplex polymerase chain reaction
J Mol Diagn, **2**, 20-28
- [12] Bertheau, P., Espie, M., Turpin, E., Lehmann, J., Plassa, L. F., Varna, M., Janin, A., de, The H. (2008)
TP53 status and response to chemotherapy in breast cancer
Pathobiology, **75**, 132-139
- [13] Bhatia, S., Ramsay, N. K., Steinbuch, M., Dusenbery, K. E., Shapiro, R. S., Weisdorf, D. J., Robison, L. L., Miller, J. S., Neglia, J. P. (1996)
Malignant neoplasms following bone marrow transplantation
Blood, **87**, 3633-3639
- [14] Bhatia, S., Robison, L. L., Oberlin, O., Greenberg, M., Bunin, G., Fossati-Bellani, F., Meadows, A. T. (1996)
Breast cancer and other second neoplasms after childhood Hodgkin's disease
N Engl J Med, **334**, 745-751
- [15] Bhatia, S., Sklar, C. (2002)
Second cancers in survivors of childhood cancer
Nat Rev Cancer, **2**, 124-132
- [16] Bithell, J. F., Stiller, C. A. (1988)
A new calculation of the carcinogenic risk of obstetric X-raying
Stat Med, **7**, 857-864
- [17] Bocker, T., Barusevicius, A., Snowden, T., Rasio, D., Guerrette, S., Robbins, D., Schmidt, C., Burczak, J., Croce, C. M., Copeland, T., Kovatich, A. J., Fishel, R. (1999)
hMSH5: a human MutS homologue that forms a novel heterodimer with hMSH4 and is expressed during spermatogenesis
Cancer Res, **59**, 816-822
- [18] Boice, J. D., Jr., Land, C. E., Preston, D. L. (1996) 319-254
- [19] Boland, C. R. (2005)
Evolution of the nomenclature for the hereditary colorectal cancer syndromes
Fam Cancer, **4**, 211-218
- [20] Boland, C. R., Thibodeau, S. N., Hamilton, S. R., Sidransky, D., Eshleman, J. R., Burt, R. W., Meltzer, S. J., Rodriguez-Bigas, M. A., Fodde, R., Ranzani, G. N., Srivastava, S. (1998)
A National Cancer Institute Workshop on Microsatellite Instability for cancer detection and familial predisposition: development of international criteria for the determination of microsatellite instability in colorectal cancer
Cancer Res, **58**, 5248-5257
- [21] Boyer, J. C., Risinger, J. I., Farber, R. A. (1998)
Stability of microsatellites in myeloid neoplasias
Cancer Genet Cytogenet, **106**, 54-61

- [22] Breslow, N. E., Takashima, J. R., Whitton, J. A., Moksness, J., D'Angio, G. J., Green, D. M. (1995)
Second malignant neoplasms following treatment for Wilm's tumor: a report from the National Wilms' Tumor Study Group
J Clin Oncol, **13**, 1851-1859
- [23] Broaddus, R. R., Lynch, P. M., Lu, K. H., Luthra, R., Michelson, S. J. (2004)
Unusual tumors associated with the hereditary nonpolyposis colorectal cancer syndrome
Mod Pathol, **17**, 981-989
- [24] Bronner, C. E., Baker, S. M., Morrison, P. T., Warren, G., Smith, L. G., Lescoe, M. K., Kane, M., Earabino, C., Lipford, J., Lindblom, A., . (1994)
Mutation in the DNA mismatch repair gene homologue hMLH1 is associated with hereditary non-polyposis colon cancer
Nature, **368**, 258-261
- [25] Burger, M., Burger, S. J., Denzinger, S., Wild, P. J., Wieland, W. F., Blaszyk, H., Obermann, E. C., Stoehr, R., Hartmann, A. (2006)
Elevated microsatellite instability at selected tetranucleotide repeats does not correlate with clinicopathologic features of bladder cancer
Eur Urol, **50**, 770-775
- [26] Burger, M., Denzinger, S., Hammerschmied, C. G., Tannapfel, A., Obermann, E. C., Wieland, W. F., Hartmann, A., Stoehr, R. (2006)
Elevated microsatellite alterations at selected tetranucleotides (EMAST) and mismatch repair gene expression in prostate cancer
J Mol Med, **84**, 833-841
- [27] Cannavo, E., Marra, G., Sabates-Bellver, J., Menigatti, M., Lipkin, S. M., Fischer, F., Cejka, P., Jiricny, J. (2005)
Expression of the MutL homologue hMLH3 in human cells and its role in DNA mismatch repair
Cancer Res, **65**, 10759-10766
- [28] Carethers, J. M., Hawn, M. T., Chauhan, D. P., Luce, M. C., Marra, G., Koi, M., Boland, C. R. (1996)
Competency in mismatch repair prohibits clonal expansion of cancer cells treated with N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine
J Clin Invest, **98**, 199-206
- [29] Casorelli, I., Offman, J., Mele, L., Pagano, L., Sica, S., D'Errico, M., Giannini, G., Leone, G., Bignami, M., Karran, P. (2003)
Drug treatment in the development of mismatch repair defective acute leukemia and myelodysplastic syndrome
DNA Repair (Amst), **2**, 547-559
- [30] Catto, J. W., Azzouzi, A. R., Amira, N., Rehman, I., Feeley, K. M., Cross, S. S., Fromont, G., Sibony, M., Hamdy, F. C., Cussenot, O., Meuth, M. (2003)
Distinct patterns of microsatellite instability are seen in tumours of the urinary tract
Oncogene, **22**, 8699-8706
- [31] Cawkwell, L., Li, D., Lewis, F. A., Martin, I., Dixon, M. F., Quirke, P. (1995)
Microsatellite instability in colorectal cancer: improved assessment using fluorescent polymerase chain reaction
Gastroenterology, **109**, 465-471

- [32] Chang, I. Y., Kim, S. H., Cho, H. J., Lee, D. Y., Kim, M. H., Chung, M. H., You, H. J. (2005)
Human AP endonuclease suppresses DNA mismatch repair activity leading to microsatellite instability
Nucleic Acids Res, **33**, 5073-5081
- [33] Chen, P. C., Dudley, S., Hagen, W., Dizon, D., Paxton, L., Reichow, D., Yoon, S. R., Yang, K., Arnheim, N., Liskay, R. M., Lipkin, S. M. (2005)
Contributions by MutL homologues Mlh3 and Pms2 to DNA mismatch repair and tumor suppression in the mouse
Cancer Res, **65**, 8662-8670
- [34] Creutzig, U., Henze, G., Bielack, S., Herold, R., Kaatsch, P., Klussmann, J. H., Graf, N., Reinhard, D., Schrappe, M., Zimmermann, M., Jürgens, H (2003)
Krebserkrankungen bei Kindern: Erfolg durch einheitliche Therapiekonzepte seit 25 Jahren
Dtsch Arztebl, **100**,
<http://www.aerzteblatt.de/v4/archiv/artikel.asp?id=36271>
- [35] Curtis, R. E., Boice, J. D., Jr., Kleinerman, R. A., Flannery, J. T., Fraumeni, J. F., Jr. (1985)
Summary: multiple primary cancers in Connecticut, 1935-82
Natl Cancer Inst Monogr, **68**, 219-242
- [36] Danaee, H., Nelson, H. H., Karagas, M. R., Schned, A. R., Ashok, T. D., Hirao, T., Perry, A. E., Kelsey, K. T. (2002)
Microsatellite instability at tetranucleotide repeats in skin and bladder cancer
Oncogene, **21**, 4894-4899
- [37] Darrington, D. L., Vose, J. M., Anderson, J. R., Bierman, P. J., Bishop, M. R., Chan, W. C., Morris, M. E., Reed, E. C., Sanger, W. G., Tarantolo, S. R., . (1994)
Incidence and characterization of secondary myelodysplastic syndrome and acute myelogenous leukemia following high-dose chemoradiotherapy and autologous stem-cell transplantation for lymphoid malignancies
J Clin Oncol, **12**, 2527-2534
- [38] Das-Gupta, E. P., Seedhouse, C. H., Russell, N. H. (2001)
Microsatellite instability occurs in defined subsets of patients with acute myeloblastic leukaemia
Br J Haematol, **114**, 307-312
- [39] de, Wind N., Dekker, M., Berns, A., Radman, M., te, Riele H. (1995)
Inactivation of the mouse Msh2 gene results in mismatch repair deficiency, methylation tolerance, hyperrecombination, and predisposition to cancer
Cell, **82**, 321-330
- [40] Deeg, H. J., Witherspoon, R. P. (1993)
Risk factors for the development of secondary malignancies after marrow transplantation
Hematol Oncol Clin North Am, **7**, 417-429
- [41] Deutsches Kinderkrebsregister (2006)
Jahresbericht 2005

- [42] Dietmaier, W., Wallinger, S., Bocker, T., Kullmann, F., Fishel, R., Ruschoff, J. (1997)
Diagnostic microsatellite instability: definition and correlation with mismatch repair protein expression
Cancer Res, **57**, 4749-4756
- [43] Dong, C., Hemminki, K. (2001)
Second primary neoplasms in 633,964 cancer patients in Sweden, 1958-1996
Int J Cancer, **93**, 155-161
- [44] Dores, G. M., Curtis, R. E., Toro, J. R., Devesa, S. S., Fraumeni, J. F., Jr. (2008)
Incidence of cutaneous sebaceous carcinoma and risk of associated neoplasms : insight into Muir-Torre syndrome
Cancer,
- [45] Drummond, J. T., Li, G. M., Longley, M. J., Modrich, P. (1995)
Isolation of an hMSH2-p160 heterodimer that restores DNA mismatch repair to tumor cells
Science, **268**, 1909-1912
- [46] Duckett, D. R., Drummond, J. T., Murchie, A. I., Reardon, J. T., Sancar, A., Lilley, D. M., Modrich, P. (1996)
Human MutS α recognizes damaged DNA base pairs containing O6-methylguanine, O4-methylthymine, or the cisplatin-d(GpG) adduct
Proc Natl Acad Sci U S A, **93**, 6443-6447
- [47] Dzantiev, L., Constantin, N., Genschel, J., Iyer, R. R., Burgers, P. M., Modrich, P. (2004)
A defined human system that supports bidirectional mismatch-provoked excision
Mol Cell, **15**, 31-41
- [48] Edmonds, L. D., James, L. M. (1990)
Temporal trends in the prevalence of congenital malformations at birth based on the birth defects monitoring program, United States, 1979-1987
MMWR CDC Surveill Summ, **39**, 19-23
- [49] Faulkner, R. D., Seedhouse, C. H., Das-Gupta, E. P., Russell, N. H. (2004)
BAT-25 and BAT-26, two mononucleotide microsatellites, are not sensitive markers of microsatellite instability in acute myeloid leukaemia
Br J Haematol, **124**, 160-165
- [50] Feig, S. A. (2001)
Second malignant neoplasms after successful treatment of childhood cancers
Blood Cells Mol Dis, **27**, 662-666
- [51] Felix, C. A., Kappel, C. C., Mitsudomi, T., Nau, M. M., Tsokos, M., Crouch, G. D., Nisen, P. D., Winick, N. J., Helman, L. J. (1992)
Frequency and diversity of p53 mutations in childhood rhabdomyosarcoma
Cancer Res, **52**, 2243-2247
- [52] Ferris, I., Tortajada, Berbel, Tornero O., Ortega Garcia, J. A., Claudio-Morales, L., Garcia, I., Castell, Marti, Perales, V, Miranda, Casas L. (2005)
[Risk factors for pediatric malignant bone tumors]
An Pediatr (Barc), **63**, 537-547

- [53] Fink, D., Nebel, S., Aebi, S., Zheng, H., Cenni, B., Nehme, A., Christen, R. D., Howell, S. B. (1996)
The role of DNA mismatch repair in platinum drug resistance
Cancer Res, **56**, 4881-4886
- [54] Fishel, R., Lescoe, M. K., Rao, M. R., Copeland, N. G., Jenkins, N. A., Garber, J., Kane, M., Kolodner, R. (1993)
The human mutator gene homolog MSH2 and its association with hereditary nonpolyposis colon cancer
Cell, **75**, 1027-1038
- [55] Frechet, M., Warrick, E., Vioux, C., Chevallier, O., Spatz, A., Benhamou, S., Sarasin, A., Bernerd, F., Magnaldo, T. (2008)
Overexpression of matrix metalloproteinase 1 in dermal fibroblasts from DNA repair-deficient/cancer-prone xeroderma pigmentosum group C patients
Oncogene, **27**, 5223-5232
- [56] Gadner H, Gaedicke G Niemeyer C Ritter J (2006)
pädiatrische Hämatologie und Onkologie 421-435
- [57] Gafanovich, A., Ramu, N., Krichevsky, S., Pe'er, J., Amir, G., Ben-Yehuda, D. (1999)
Microsatellite instability and p53 mutations in pediatric secondary malignant neoplasms
Cancer, **85**, 504-510
- [58] Garwicz, S., Anderson, H., Olsen, J. H., Dollner, H., Hertz, H., Jonmundsson, G., Langmark, F., Lanning, M., Moller, T., Sankila, R., Tulinius, H. (2000)
Second malignant neoplasms after cancer in childhood and adolescence: a population-based case-control study in the 5 Nordic countries. The Nordic Society for Pediatric Hematology and Oncology. The Association of the Nordic Cancer Registries
Int J Cancer, **88**, 672-678
- [59] Genschel, J., Modrich, P. (2003)
Mechanism of 5'-directed excision in human mismatch repair
Mol Cell, **12**, 1077-1086
- [60] Greene, M. H., Harris, E. L., Gershenson, D. M., Malkasian, G. D., Jr., Melton, L. J., III, Dembo, A. J., Bennett, J. M., Moloney, W. C., Boice, J. D., Jr. (1986)
Melphalan may be a more potent leukemogen than cyclophosphamide
Ann Intern Med, **105**, 360-367
- [61] Gu, L., Cline-Brown, B., Zhang, F., Qiu, L., Li, G. M. (2002)
Mismatch repair deficiency in hematological malignancies with microsatellite instability
Oncogene, **21**, 5758-5764
- [62] Hancock, S. L., Tucker, M. A., Hoppe, R. T. (1993)
Breast cancer after treatment of Hodgkin's disease
J Natl Cancer Inst, **85**, 25-31
- [63] Harfe, B. D., Jinks-Robertson, S. (2000)
DNA mismatch repair and genetic instability
Annu Rev Genet, **34**, 359-399

- [64] Hawkins, M. M., Stevens, M. C. (1996)
The long-term survivors
Br Med Bull, **52**, 898-923
- [65] Hawkins, M. M., Wilson, L. M., Burton, H. S., Potok, M. H., Winter, D. L., Marsden, H. B., Stovall, M. A. (1996)
Radiotherapy, alkylating agents, and risk of bone cancer after childhood cancer
J Natl Cancer Inst, **88**, 270-278
- [66] Hawn, M. T., Umar, A., Carethers, J. M., Marra, G., Kunkel, T. A., Boland, C. R., Koi, M. (1995)
Evidence for a connection between the mismatch repair system and the G2 cell cycle checkpoint
Cancer Res, **55**, 3721-3725
- [67] Hickson, I. D. (2003)
RecQ helicases: caretakers of the genome
Nat Rev Cancer, **3**, 169-178
- [68] Hollstein, M., Shomer, B., Greenblatt, M., Soussi, T., Hovig, E., Montesano, R., Harris, C. C. (1996)
Somatic point mutations in the p53 gene of human tumors and cell lines: updated compilation
Nucleic Acids Res, **24**, 141-146
- [69] Hollstein, M., Sidransky, D., Vogelstein, B., Harris, C. C. (1991)
p53 mutations in human cancers
Science, **253**, 49-53
- [70] Horiike, S., Misawa, S., Kaneko, H., Sasai, Y., Kobayashi, M., Fujii, H., Tanaka, S., Yagita, M., Abe, T., Kashima, K., Taniwaki, M. (1999)
Distinct genetic involvement of the TP53 gene in therapy-related leukemia and myelodysplasia with chromosomal losses of Nos 5 and/or 7 and its possible relationship to replication error phenotype
Leukemia, **13**, 1235-1242
- [71] Ionov, Y., Peinado, M. A., Malkhosyan, S., Shibata, D., Perucho, M. (1993)
Ubiquitous somatic mutations in simple repeated sequences reveal a new mechanism for colonic carcinogenesis
Nature, **363**, 558-561
- [72] Jacobelli, S., Soufir, N., Lacapere, J. J., Regnier, S., Bourillon, A., Grandchamp, B., Hetet, G., Pham, D., Palangie, A., Avril, M. F., Dupin, N., Sarasin, A., Gorin, I. (2008)
Xeroderma pigmentosum group C in a French Caucasian patient with multiple melanoma and unusual long-term survival
Br J Dermatol, **159**, 968-973
- [73] Jascur, T., Boland, C. R. (2006)
Structure and function of the components of the human DNA mismatch repair system
Int J Cancer, **119**, 2030-2035
- [74] Jass, J. R. (2006)
Hereditary Non-Polyposis Colorectal Cancer: the rise and fall of a confusing term
World J Gastroenterol, **12**, 4943-4950

- [75] Jass, J. R., Smyrk, T. C., Stewart, S. M., Lane, M. R., Lanspa, S. J., Lynch, H. T. (1994)
Pathology of hereditary non-polyposis colorectal cancer
Anticancer Res, **14**, 1631-1634
- [76] Jenkinson, H. C., Hawkins, M. M., Stiller, C. A., Winter, D. L., Marsden, H. B., Stevens, M. C. (2004)
Long-term population-based risks of second malignant neoplasms after childhood cancer in Britain
Br J Cancer, **91**, 1905-1910
- [77] Jiricny, J. (2006)
The multifaceted mismatch-repair system
Nat Rev Mol Cell Biol, **7**, 335-346
- [78] Jun, S. H., Kim, T. G., Ban, C. (2006)
DNA mismatch repair system. Classical and fresh roles
FEBS J, **273**, 1609-1619
- [79] Kaatsch, P. (8 A.D.)
Jahresbericht 2005
Kinderkrebsstiftung,
<http://www.kinderkrebsregister.de/>
- [80] Kappelhoff, P. (2007)
T-Test
Empirische Wirtschafts- und Sozialforschung,
<http://www.wiwi.uni-wuppertal.de/kappelhoff/papers/t-test.pdf>
- [81] Karran, P. (2001)
Mechanisms of tolerance to DNA damaging therapeutic drugs
Carcinogenesis, **22**, 1931-1937
- [82] Kaste, S. C., Hudson, M. M., Jones, D. J., Fryrear, R., Greenwald, C. A., Fleming, I. D., Pratt, C. B. (1998)
Breast masses in women treated for childhood cancer: incidence and screening guidelines
Cancer, **82**, 784-792
- [83] Kinderkrebsstiftung (2008)
Krebs bei Kindern und Jugendlichen
Kinderkrebsstiftung,
<http://www.kinderkrebsstiftung.de/krebs-bei-kindern/>
- [84] Klein, G., Michaelis, J., Spix, C., Wibbing, R., Eggers, G., Ritter, J., Kaatsch, P. (2003)
Second malignant neoplasms after treatment of childhood cancer
Eur J Cancer, **39**, 808-817
- [85] Kloor, M., Schwitalle, Y., von Knebel, Doeberitz M., Wentzensen, N. (2006)
Tetranucleotide repeats in coding regions: no evidence for involvement in EMAS
J Mol Med, **84**, 329-333
- [86] Kolodner, R. (1996)
Biochemistry and genetics of eukaryotic mismatch repair
Genes Dev, **10**, 1433-1442

- [87] Komuro, H., Hayashi, Y., Kawamura, M., Hayashi, K., Kaneko, Y., Kamoshita, S., Hanada, R., Yamamoto, K., Hongo, T., Yamada, M., . (1993)
Mutations of the p53 gene are involved in Ewing's sarcomas but not in neuroblastomas
Cancer Res, **53**, 5284-5288
- [88] Kops, G. J., Weaver, B. A., Cleveland, D. W. (2005)
On the road to cancer: aneuploidy and the mitotic checkpoint
Nat Rev Cancer, **5**, 773-785
- [89] Kunkel, T. A. (1993)
Nucleotide repeats. Slippery DNA and diseases
Nature, **365**, 207-208
- [90] Kunkel, T. A. (2004)
DNA replication fidelity
J Biol Chem, **279**, 16895-16898
- [91] Kunkel, T. A., Erie, D. A. (2005)
DNA mismatch repair
Annu Rev Biochem, **74**, 681-710
- [92] Kunz, C., Schar, P. (2004)
Meiotic recombination: sealing the partnership at the junction
Curr Biol, **14**, R962-R964
- [93] Lahue, R. S., Au, K. G., Modrich, P. (1989)
DNA mismatch correction in a defined system
Science, **245**, 160-164
- [94] Land, C. E., Saku, T., Hayashi, Y., Takahara, O., Matsuura, H., Tokuoka, S., Tokunaga, M., Mabuchi, K. (1996)
Incidence of salivary gland tumors among atomic bomb survivors, 1950-1987. Evaluation of radiation-related risk
Radiat Res, **146**, 28-36
- [95] Lavin, M. F. (2008)
Ataxia-telangiectasia: from a rare disorder to a paradigm for cell signalling and cancer
Nat Rev Mol Cell Biol, **9**, 759-769
- [96] Leach, F. S., Nicolaides, N. C., Papadopoulos, N., Liu, B., Jen, J., Parsons, R., Peltomaki, P., Sistonen, P., Aaltonen, L. A., Nystrom-Lahti, M., . (1993)
Mutations of a mutS homolog in hereditary nonpolyposis colorectal cancer
Cell, **75**, 1215-1225
- [97] Levitt, N. C., Hickson, I. D. (2002)
Caretaker tumour suppressor genes that defend genome integrity
Trends Mol Med, **8**, 179-186
- [98] Li, G. M., Modrich, P. (1995)
Restoration of mismatch repair to nuclear extracts of H6 colorectal tumor cells by a heterodimer of human MutL homologs
Proc Natl Acad Sci U S A, **92**, 1950-1954

- [99] Limacher, J. M., Frebourg, T., Natarajan-Ame, S., Bergerat, J. P. (2001)
Two metachronous tumors in the radiotherapy fields of a patient with Li-Fraumeni syndrome
Int J Cancer, **96**, 238-242
- [100] Loning, L., Zimmermann, M., Reiter, A., Kaatsch, P., Henze, G., Riehm, H., Schrappe, M. (2000)
Secondary neoplasms subsequent to Berlin-Frankfurt-Munster therapy of acute lymphoblastic leukemia in childhood: significantly lower risk without cranial radiotherapy
Blood, **95**, 2770-2775
- [101] Lothe, R. A., Peltomaki, P., Meling, G. I., Aaltonen, L. A., Nystrom-Lahti, M., Pylkkanen, L., Heimdal, K., Andersen, T. I., Moller, P., Rognum, T. O., . (1993)
Genomic instability in colorectal cancer: relationship to clinicopathological variables and family history
Cancer Res, **53**, 5849-5852
- [102] Loukola, A., Eklin, K., Laiho, P., Salovaara, R., Kristo, P., Jarvinen, H., Mecklin, J. P., Launonen, V., Aaltonen, L. A. (2001)
Microsatellite marker analysis in screening for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (HNPCC)
Cancer Res, **61**, 4545-4549
- [103] Lynch, H. T., Lanspa, S., Smyrk, T., Boman, B., Watson, P., Lynch, J. (1991)
Hereditary nonpolyposis colorectal cancer (Lynch syndromes I & II). Genetics, pathology, natural history, and cancer control, Part I
Cancer Genet Cytogenet, **53**, 143-160
- [104] Masciari, S., Van den Abbeele, A. D., Diller, L. R., Rastarhuyeva, I., Yap, J., Schneider, K., Digianni, L., Li, F. P., Fraumeni, J. F., Jr., Syngal, S., Garber, J. E. (2008)
F18-fluorodeoxyglucose-positron emission tomography/computed tomography screening in Li-Fraumeni syndrome
JAMA, **299**, 1315-1319
- [105] Mecklin, J. P., Jarvinen, H. J. (1986)
Clinical features of colorectal carcinoma in cancer family syndrome
Dis Colon Rectum, **29**, 160-164
- [106] Mecklin, J. P., Jarvinen, H. J., Peltokallio, P. (1986)
Cancer family syndrome. Genetic analysis of 22 Finnish kindreds
Gastroenterology, **90**, 328-333
- [107] Mecklin, J. P., Sipponen, P., Jarvinen, H. J. (1986)
Histopathology of colorectal carcinomas and adenomas in cancer family syndrome
Dis Colon Rectum, **29**, 849-853
- [108] Meinert, R., Kaletsch, U., Kaatsch, P., Schuz, J., Michaelis, J. (1999)
Associations between childhood cancer and ionizing radiation: results of a population-based case-control study in Germany
Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, **8**, 793-799

- [109] Metayer, C., Lynch, C. F., Clarke, E. A., Glimelius, B., Storm, H., Pukkala, E., Joensuu, T., van Leeuwen, F. E., van't Veer, M. B., Curtis, R. E., Holowaty, E. J., Andersson, M., Wiklund, T., Gospodarowicz, M., Travis, L. B. (2000)
Second cancers among long-term survivors of Hodgkin's disease diagnosed in childhood and adolescence
J Clin Oncol, **18**, 2435-2443
- [110] Modrich, P., Lahue, R. (1996)
Mismatch repair in replication fidelity, genetic recombination, and cancer biology
Annu Rev Biochem, **65**, 101-133
- [111] Mohaghegh, P., Hickson, I. D. (2002)
Premature aging in RecQ helicase-deficient human syndromes
Int J Biochem Cell Biol, **34**, 1496-1501
- [112] Morin PJ, Trent JM, Collins FS, Vogelstein B (2005)
*Cancer Genetics***16**.
- [113] Narod, S. A., Stiller, C., Lenoir, G. M. (1991)
An estimate of the heritable fraction of childhood cancer
Br J Cancer, **63**, 993-999
- [114] Neglia, J. P., Friedman, D. L., Yasui, Y., Mertens, A. C., Hammond, S., Stovall, M., Donaldson, S. S., Meadows, A. T., Robison, L. L. (2001)
Second malignant neoplasms in five-year survivors of childhood cancer: childhood cancer survivor study
J Natl Cancer Inst, **93**, 618-629
- [115] Neglia, J. P., Meadows, A. T., Robison, L. L., Kim, T. H., Newton, W. A., Ruymann, F. B., Sather, H. N., Hammond, G. D. (1991)
Second neoplasms after acute lymphoblastic leukemia in childhood
N Engl J Med, **325**, 1330-1336
- [116] Neugut, A. I., Meadows A.T., Robinson E. (1999)
Multiple Primary Cancers 19993-10
- [117] Olipitz, W., Hopfinger, G., Aguiar, R. C., Gunsilius, E., Girschikofsky, M., Bodner, C., Hiden, K., Linkesch, W., Hoefler, G., Sill, H. (2002)
Defective DNA-mismatch repair: a potential mediator of leukemogenic susceptibility in therapy-related myelodysplasia and leukemia
Genes Chromosomes Cancer, **34**, 243-248
- [118] Olipitz, W., Tilz, G. P., Beham-Schmid, C., Eibinger, C., Kerzina, P., Sill, H. (2001)
Microsatellite analysis in acute myeloid leukaemia evolving from myelodysplastic syndrome
Br J Haematol, **112**, 248-249
- [119] Ozlu, T., Bulbul, Y. (2005)
Smoking and lung cancer
Tuberk Toraks, **53**, 200-209
- [120] Palombo, F., Gallinari, P., Iaccarino, I., Lettieri, T., Hughes, M., D'Arrigo, A., Truong, O., Hsuan, J. J., Jiricny, J. (1995)
GTBP, a 160-kilodalton protein essential for mismatch-binding activity in human cells
Science, **268**, 1912-1914

- [121] Papadopoulos, N., Nicolaides, N. C., Wei, Y. F., Ruben, S. M., Carter, K. C., Rosen, C. A., Haseltine, W. A., Fleischmann, R. D., Fraser, C. M., Adams, M. D., . (1994)
Mutation of a mutL homolog in hereditary colon cancer
Science, **263**, 1625-1629
- [122] Papouli, E., Cejka, P., Jiricny, J. (2004)
Dependence of the cytotoxicity of DNA-damaging agents on the mismatch repair status of human cells
Cancer Res, **64**, 3391-3394
- [123] Passarge, E., Wirth, J. (2004)
Genomik208-208
- [124] Passarge, E., Wirth, J. (2004)
Molekulare Grundlagen70-74
- [125] Peltomaki, P., Aaltonen, L. A., Sistonen, P., Pylkkanen, L., Mecklin, J. P., Jarvinen, H., Green, J. S., Jass, J. R., Weber, J. L., Leach, F. S., . (1993)
Genetic mapping of a locus predisposing to human colorectal cancer
Science, **260**, 810-812
- [126] Perentesis, J. P. (2001)
Genetic predisposition and treatment-related leukemia
Med Pediatr Oncol, **36**, 541-548
- [127] Perucho, M. (1999)
Correspondence re: C.R. Boland et al., A National Cancer Institute workshop on microsatellite instability for cancer detection and familial predisposition: development of international criteria for the determination of microsatellite instability in colorectal cancer. *Cancer Res.*, 58: 5248-5257, 1998
Cancer Res, **59**, 249-256
- [128] Piard, F., Martin, L., Chapusot, C., Ponnelle, T., Faivre, J. (2002)
[Genetic pathways in colorectal cancer: interest for the pathologist]
Ann Pathol, **22**, 277-288
- [129] Preston, D. L., Kusumi, S., Tomonaga, M., Izumi, S., Ron, E., Kuramoto, A., Kamada, N., Dohy, H., Matsuo, T., Matsui, T., . (1994)
Cancer incidence in atomic bomb survivors. Part III. Leukemia, lymphoma and multiple myeloma, 1950-1987
Radiat Res, **137**, S68-S97
- [130] Prolla, T. A., Baker, S. M., Harris, A. C., Tsao, J. L., Yao, X., Bronner, C. E., Zheng, B., Gordon, M., Reneker, J., Arnheim, N., Shibata, D., Bradley, A., Liskay, R. M. (1998)
Tumour susceptibility and spontaneous mutation in mice deficient in Mlh1, Pms1 and Pms2 DNA mismatch repair
Nat Genet, **18**, 276-279
- [131] Pyatt, R., Chadwick, R. B., Johnson, C. K., Adebamowo, C., de la, Chapelle A., Prior, T. W. (1999)
Polymorphic variation at the BAT-25 and BAT-26 loci in individuals of African origin. Implications for microsatellite instability testing
Am J Pathol, **155**, 349-353

- [132] Radman, M., Matic, I., Halliday, J. A., Taddei, F. (1995)
Editing DNA replication and recombination by mismatch repair: from bacterial genetics to mechanisms of predisposition to cancer in humans
Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, **347**, 97-103
- [133] Raschle, M., Marra, G., Nystrom-Lahti, M., Schar, P., Jiricny, J. (1999)
Identification of hMutLbeta, a heterodimer of hMLH1 and hPMS1
J Biol Chem, **274**, 32368-32375
- [134] Ries L (2008)
SEER Stat Fact Sheets
SEER Cancer Statistics Review,
- [135] Rimsza, L. M., Kopecky, K. J., Ruschulte, J., Chen, I. M., Slovak, M. L., Karanes, C., Godwin, J., List, A., Willman, C. L. (2000)
Microsatellite instability is not a defining genetic feature of acute myeloid leukemogenesis in adults: results of a retrospective study of 132 patients and review of the literature
Leukemia, **14**, 1044-1051
- [136] Robert, C., Dubertret, L. (1995)
[Cancers of the skin, relations to ultraviolet rays]
Presse Med, **24**, 1610-1616
- [137] Robert, C., Dubertret, L. (1995)
[Cancers of the skin, relations to ultraviolet rays]
Presse Med, **24**, 1610-1616
- [138] Robison, L. L. (1992)
Down syndrome and leukemia
Leukemia, **6 Suppl 1**, 5-7
- [139] Robison, L. L., Mertens, A. (1993)
Second tumors after treatment of childhood malignancies
Hematol Oncol Clin North Am, **7**, 401-415
- [140] Ron, E., Modan, B., Preston, D., Alfandary, E., Stovall, M., Boice, J. D., Jr. (1991)
Radiation-induced skin carcinomas of the head and neck
Radiat Res, **125**, 318-325
- [141] Ross, J. A., Spector, L. G., Robison, L. L., Olshan, A. F. (2005)
Epidemiology of leukemia in children with Down syndrome
Pediatr Blood Cancer, **44**, 8-12
- [142] Royds, J. A., Iacopetta, B. (2006)
p53 and disease: when the guardian angel fails
Cell Death Differ, **13**, 1017-1026
- [143] Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B., Erlich, H. A. (1988)
Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase
Science, **239**, 487-491

- [144] Samowitz, W. S., Slattery, M. L., Kerber, R. A. (1995)
Microsatellite instability in human colonic cancer is not a useful clinical indicator of familial colorectal cancer
Gastroenterology, **109**, 1765-1771
- [145] Samowitz, W. S., Slattery, M. L., Potter, J. D., Leppert, M. F. (1999)
BAT-26 and BAT-40 instability in colorectal adenomas and carcinomas and germline polymorphisms
Am J Pathol, **154**, 1637-1641
- [146] Sankila, R., Garwicz, S., Olsen, J. H., Dollner, H., Hertz, H., Kreuger, A., Langmark, F., Lanning, M., Moller, T., Tulinus, H. (1996)
Risk of subsequent malignant neoplasms among 1,641 Hodgkin's disease patients diagnosed in childhood and adolescence: a population-based cohort study in the five Nordic countries. Association of the Nordic Cancer Registries and the Nordic Society of Pediatric Hematology and Oncology
J Clin Oncol, **14**, 1442-1446
- [147] Sankila, R., Pukkala, E., Teppo, L. (1995)
Risk of subsequent malignant neoplasms among 470,000 cancer patients in Finland, 1953-1991
Int J Cancer, **60**, 464-470
- [148] Santarosa, M., Ashworth, A. (2004)
Haploinsufficiency for tumour suppressor genes: when you don't need to go all the way
Biochim Biophys Acta, **1654**, 105-122
- [149] Schellong, G., Riepenhausen, M., Creutzig, U., Ritter, J., Harbott, J., Mann, G., Gadner, H. (1997)
Low risk of secondary leukemias after chemotherapy without mechlorethamine in childhood Hodgkin's disease. German-Austrian Pediatric Hodgkin's Disease Group
J Clin Oncol, **15**, 2247-2253
- [150] Schmahl, D. (1991)
[Etiology of bronchial cancer: smoking, passive smoking, environment and occupation]
Pneumologie, **45**, 134-136
- [151] Sheikhha, M. H., Tobal, K., Liu Yin, J. A. (2002)
High level of microsatellite instability but not hypermethylation of mismatch repair genes in therapy-related and secondary acute myeloid leukaemia and myelodysplastic syndrome
Br J Haematol, **117**, 359-365
- [152] Shimodaira, H., Yoshioka-Yamashita, A., Kolodner, R. D., Wang, J. Y. (2003)
Interaction of mismatch repair protein PMS2 and the p53-related transcription factor p73 in apoptosis response to cisplatin
Proc Natl Acad Sci U S A, **100**, 2420-2425
- [153] Singer, G., Kallinowski, T., Hartmann, A., Dietmaier, W., Wild, P. J., Schraml, P., Sauter, G., Mihatsch, M. J., Moch, H. (2004)
Different types of microsatellite instability in ovarian carcinoma
Int J Cancer, **92**:112, 643-646

- [154] Sinicrope, F. A., Rego, R. L., Halling, K. C., Foster, N., Sargent, D. J., La, Plant B., French, A. J., Laurie, J. A., Goldberg, R. M., Thibodeau, S. N., Witzig, T. E. (2006) Prognostic impact of microsatellite instability and DNA ploidy in human colon carcinoma patients
Gastroenterology, **131**, 729-737
- [155] Sitzmann, F. C. (2002)
Pädiatrie, **2**, 515-517
- [156] Sitzmann, FC (2002)
Pädiatrie, **2**, 693-694
- [157] Sklar, C., Whitton, J., Mertens, A., Stovall, M., Green, D., Marina, N., Greffe, B., Wolden, S., Robison, L. (2000)
Abnormalities of the thyroid in survivors of Hodgkin's disease: data from the Childhood Cancer Survivor Study
J Clin Endocrinol Metab, **85**, 3227-3232
- [158] Slebos, R. J., Oh, D. S., Umbach, D. M., Taylor, J. A. (2002)
Mutations in tetranucleotide repeats following DNA damage depend on repeat sequence and carcinogenic agent
Cancer Res, **62**, 6052-6060
- [159] Socie, G., Curtis, R. E., Deeg, H. J., Sobocinski, K. A., Filipovich, A. H., Travis, L. B., Sullivan, K. M., Rowlings, P. A., Kingma, D. W., Banks, P. M., Travis, W. D., Witherspoon, R. P., Sanders, J., Jaffe, E. S., Horowitz, M. M. (2000)
New malignant diseases after allogeneic marrow transplantation for childhood acute leukemia
J Clin Oncol, **18**, 348-357
- [160] Sood, A. K., Holmes, R., Hendrix, M. J., Buller, R. E. (2001)
Application of the National Cancer Institute international criteria for determination of microsatellite instability in ovarian cancer
Cancer Res, **61**, 4371-4374
- [161] statistisches Bundesamt Deutschland (2008)
Kosten nach Krankheitsklassen und Geschlecht in EUR je Einwohner
DeStatis,
- [162] STEWART, A., WEBB, J., HEWITT, D. (1958)
A survey of childhood malignancies
Br Med J, **1**, 1495-1508
- [163] Stojic, L., Brun, R., Jiricny, J. (2004)
Mismatch repair and DNA damage signalling
DNA Repair (Amst), **3**, 1091-1101
- [164] Strong, L. C., Stine, M., Norsted, T. L. (1987)
Cancer in survivors of childhood soft tissue sarcoma and their relatives
J Natl Cancer Inst, **79**, 1213-1220
- [165] Suraweera, N., Duval, A., Reperant, M., Vaury, C., Furlan, D., Leroy, K., Seruca, R., Iacopetta, B., Hamelin, R. (2002)
Evaluation of tumor microsatellite instability using five quasimonomorphic mononucleotide repeats and pentaplex PCR
Gastroenterology, **123**, 1804-1811

- [166] Swann, P. F., Waters, T. R., Moulton, D. C., Xu, Y. Z., Zheng, Q., Edwards, M., Mace, R. (1996)
Role of postreplicative DNA mismatch repair in the cytotoxic action of thioguanine
Science, **273**, 1109-1111
- [167] Swift, M., Morrell, D., Massey, R. B., Chase, C. L. (1991)
Incidence of cancer in 161 families affected by ataxia-telangiectasia
N Engl J Med, **325**, 1831-1836
- [168] Tang, R., Changchien, C. R., Wu, M. C., Fan, C. W., Liu, K. W., Chen, J. S., Chien, H. T., Hsieh, L. L. (2004)
Colorectal cancer without high microsatellite instability and chromosomal instability--an alternative genetic pathway to human colorectal cancer
Carcinogenesis, **25**, 841-846
- [169] Teruya-Feldstein, J., Greene, J., Cohen, L., Popplewell, L., Ellis, N. A., Offit, K. (2002)
Analysis of mismatch repair defects in the familial occurrence of lymphoma and colorectal cancer
Leuk Lymphoma, **43**, 1619-1626
- [170] Thibodeau, S. N., Bren, G., Schaid, D. (1993)
Microsatellite instability in cancer of the proximal colon
Science, **260**, 816-819
- [171] Thibodeau, S. N., French, A. J., Cunningham, J. M., Tester, D., Burgart, L. J., Roche, P. C., McDonnell, S. K., Schaid, D. J., Vockley, C. W., Michels, V. V., Farr, G. H., Jr., O'Connell, M. J. (1998)
Microsatellite instability in colorectal cancer: different mutator phenotypes and the principal involvement of hMLH1
Cancer Res, **58**, 1713-1718
- [172] Thompson, D. E., Mabuchi, K., Ron, E., Soda, M., Tokunaga, M., Ochikubo, S., Sugimoto, S., Ikeda, T., Terasaki, M., Izumi, S., . (1994)
Cancer incidence in atomic bomb survivors. Part II: Solid tumors, 1958-1987
Radiat Res, **137**, S17-S67
- [173] Travis, L. B., Curtis, R. E., Boice, J. D., Jr. (1996)
Late effects of treatment for childhood Hodgkin's disease
N Engl J Med, **335**, 352-353
- [174] Tucker, M. A., D'Angio, G. J., Boice, J. D., Jr., Strong, L. C., Li, F. P., Stovall, M., Stone, B. J., Green, D. M., Lombardi, F., Newton, W., . (1987)
Bone sarcomas linked to radiotherapy and chemotherapy in children
N Engl J Med, **317**, 588-593
- [175] Tucker, M. A., Meadows, A. T., Boice, J. D., Jr., Stovall, M., Oberlin, O., Stone, B. J., Birch, J., Voute, P. A., Hoover, R. N., Fraumeni, J. F., Jr. (1987)
Leukemia after therapy with alkylating agents for childhood cancer
J Natl Cancer Inst, **78**, 459-464

- [176] Umar, A., Boland, C. R., Terdiman, J. P., Syngal, S., de la, Chapelle A., Ruschoff, J., Fishel, R., Lindor, N. M., Burgart, L. J., Hamelin, R., Hamilton, S. R., Hiatt, R. A., Jass, J., Lindblom, A., Lynch, H. T., Peltomaki, P., Ramsey, S. D., Rodriguez-Bigas, M. A., Vasen, H. F., Hawk, E. T., Barrett, J. C., Freedman, A. N., Srivastava, S. (2004)
Revised Bethesda Guidelines for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (Lynch syndrome) and microsatellite instability
J Natl Cancer Inst, **96**, 261-268
- [177] Vasen, H. F., Mecklin, J. P., Khan, P. M., Lynch, H. T. (1991)
The International Collaborative Group on Hereditary Non-Polyposis Colorectal Cancer (ICG-HNPCC)
Dis Colon Rectum, **34**, 424-425
- [178] Vasen, H. F., Watson, P., Mecklin, J. P., Lynch, H. T. (1999)
New clinical criteria for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (HNPCC, Lynch syndrome) proposed by the International Collaborative group on HNPCC
Gastroenterology, **116**, 1453-1456
- [179] Vogelstein, B., Kinzler, K. W. (2004)
Cancer genes and the pathways they control
Nat Med, **10**, 789-799
- [180] Wang, Y. & Qin J. (2003)
MSH2 and ATR form a signaling module and regulate two branches of the damage response to DNA methylation.
Proc Natl Acad Sci USA, **100**, 15387-15392
- [181] Waters, T. R., Swann, P. F. (1997)
Cytotoxic mechanism of 6-thioguanine: hMutSalpha, the human mismatch binding heterodimer, binds to DNA containing S6-methylthioguanine
Biochemistry, **36**, 2501-2506
- [182] Watson, P., Lynch, H. T. (1993)
Extracolonic cancer in hereditary nonpolyposis colorectal cancer
Cancer, **71**, 677-685
- [183] Westra, J. L., Plukker, J. T., Buys, C. H., Hofstra, R. M. (2004)
Genetic alterations in locally advanced stage II/III colon cancer: a search for prognostic markers
Clin Colorectal Cancer, **4**, 252-259
- [184] Wolden, S. L., Lamborn, K. R., Cleary, S. F., Tate, D. J., Donaldson, S. S. (1998)
Second cancers following pediatric Hodgkin's disease
J Clin Oncol, **16**, 536-544
- [185] Wolkenstein, P., Decq, P. (1998)
[Neurofibromatosis]
Neurochirurgie, **44**, 267-272
- [186] Wong, F. L., Boice, J. D., Jr., Abramson, D. H., Tarone, R. E., Kleinerman, R. A., Stovall, M., Goldman, M. B., Seddon, J. M., Tarbell, N., Fraumeni, J. F., Jr., Li, F. P. (1997)
Cancer incidence after retinoblastoma. Radiation dose and sarcoma risk
JAMA, **278**, 1262-1267

- [187] Xu, L., Chow, J., Bonacum, J., Eisenberger, C., Ahrendt, S. A., Spafford, M., Wu, L., Lee, S. M., Piantadosi, S., Tockman, M. S., Sidransky, D., Jen, J. (2001)
Microsatellite instability at AAAG repeat sequences in respiratory tract cancers
Int J Cancer, **91**, 200-204
- [188] Xu, Y. (2008)
Induction of genetic instability by gain-of-function p53 cancer mutants
Oncogene, **27**, 3501-3507
- [189] Yu, V. (2000)
Caretaker Brca1: keeping the genome in the straight and narrow
Breast Cancer Res, **2**, 82-85
- [190] Zang, E. A., Wynder, E. L. (1996)
Differences in lung cancer risk between men and women: examination of the evidence
J Natl Cancer Inst, **88**, 183-192
- [191] Zhou, X. P., Hoang, J. M., Li, Y. J., Seruca, R., Carneiro, F., Sobrinho-Simoes, M., Lothe, R. A., Gleeson, C. M., Russell, S. E., Muzeau, F., Flejou, J. F., Hoang-Xuan, K., Lidereau, R., Thomas, G., Hamelin, R. (1998)
Determination of the replication error phenotype in human tumors without the requirement for matching normal DNA by analysis of mononucleotide repeat microsatellites
Genes Chromosomes Cancer, **21**, 101-107

Danksagung

Mein erster Dank gilt Herrn Professor Kandolf für die Übernahme der Erstkorrektur sowie die Betreuung im Promotionsverfahren. Ich erlebte ihn stets freundlich und zuvorkommend; unkompliziert ermöglichte er durch sein Zeugnis meinen Aufenthalt in Dublin während des Praktischen Jahres. Das ist Betreuung von Doktoranden auch außerhalb der Promotion und gewiss keine Selbstverständlichkeit.

Besonders danken möchte ich allen MTAs und fortgeschritteneren Doktoranden in den Labors der molekularen Pathologie Tübingen, die in beinahe familiärer Atmosphäre ihr Wissen und ihre fertigen Pufferlösungen nicht für sich behielten, sondern in kollegialer Art und Weise teilten und mich an ihren Erfahrungen und ihrem Know-how teilhaben ließen. Durch sie waren die Tätigkeiten im Labor nicht nur Arbeit. In diesem Zusammenhang möchte ich auch Herrn PD Bock danken, der, obwohl ich nicht „sein“ Doktorand war, stets ein offenes Ohr hatte und ein Wort der Ermutigung fand, wo dies nötig war.

Mein größter Dank aber gilt Herrn Dr. Ebinger, der mich während der gesamten Promotionsarbeit betreute und nicht nur das Thema, zahlreiche Literatur und etablierte Verfahren zur Verfügung stellte. Es war gut, einen „erfahrenen Kliniker“ an der Seite zu haben, der auch abseits der Medizin in allen Fragen des Lebens zur Verfügung stand. Ein besonderes Privileg, dass wir, im Glauben an Gott verbunden, die Möglichkeit besitzen, miteinander zu beten. Viele Schwierigkeiten des Laboralltags relativierten sich angesichts dieser göttlichen Perspektive. Vielen Dank.

Ein großer Dank an alle Ärztinnen und Ärzte, die mit großem Entgegenkommen Proben von Sekundärmalignomen mit den zugehörigen Daten aus ganz Deutschland zugesandt haben. Ohne sie wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen. Aus demselben Grund bedanke ich mich bei Herrn Professor Kaatsch aus dem Kinderkrebsregister in Mainz und der Gesellschaft für pädiatrische Onkologie und Hämatologie.

Ein herzlicher Dank an meine Ehefrau Judith, die stets an mich glaubte, mich mit getrockneten Mangos versorgte und mir den Rücken frei hielt.

Lebenslauf

23.04.1982	Kay-Karsten Kober, geboren in Stuttgart als drittes von drei Kindern der Eheleute Hartmut Kober und Irmgard Kober, geb. Bültge
1988-1992	Friedrich-Silcher Grundschule Fellbach
1992-2001	Friedrich-Schiller-Gymnasium Fellbach Abschluss mit Abitur
2001 – 2002	Zivildienst im Pflegedienst am Universitätsklinikum Tübingen
Oktober 2002	Immatrikulation im Studienfach der Humanmedizin an der Eberhard-Karls-Universität Tübingen
August 2004	Ärztliche Vorprüfung
2007 – 2008	Praktisches Jahr am Klinikum Stuttgart und am AMNCH Tallaght Hospital, Dublin/ Irland
15.05.2009	Abschluss des Studiums mit Staatsexamen