

Aus der Klinik für Urologie und Kinderurologie

Direktor: Prof. Dr. med. R. Hofmann

des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg in  
Zusammenarbeit mit dem Universitätsklinikum Gießen und  
Marburg GmbH, Standort Marburg

**Identifikation frei zirkulierender Tumor-  
DNA durch den Nachweis tumorspezifischer  
Mikrosatelliten-Alterationen im Serum.**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten  
Humanmedizin

dem Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Raphael Götzky  
aus Marburg

Marburg, 2014

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-  
Universität Marburg am 13.03.2014.

Gedruckt mit der Genehmigung des Fachbereichs.

Dekan: Prof. Dr. med. M. Rothmund

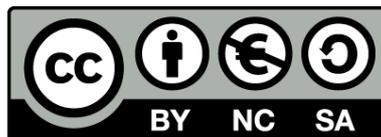
Referent: Prof. Dr. med. R. von Knobloch

1. Korreferent: Prof. Dr. med. M. Wolf

Originaldokument gespeichert auf dem Publikationsserver  
der

Philipps-Universität Marburg

<http://archiv.ub.uni-marburg.de>



Dieses Werk bzw. Inhalt steht unter einer  
Creative Commons  
Namensnennung  
Keine kommerzielle Nutzung  
Weitergabe unter gleichen Bedingungen  
3.0 Deutschland Lizenz.

Die vollständige Lizenz finden Sie unter:

<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/3.0/de/>

**Für meine Tochter, meine Frau und meine Eltern  
in Liebe und Dankbarkeit.**



<b>3. MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>42</b>
<b>3.1. Geräte, Material und Lösungen</b>	<b>42</b>
3.1.1. Geräte	42
3.1.2. Materialien	43
<b>3.2. Tumoren</b>	<b>44</b>
<b>3.3. Probenmaterial</b>	<b>47</b>
<b>3.4. Methoden</b>	<b>47</b>
3.4.1. DNA-Isolierung	47
3.4.1.1. DNA-Extraktion aus Blutlymphozyten mit Phenol/Chloroform Methode (für Mikrosatelliten)	47
3.4.1.2. DNA-Isolierung aus Tumor-Gewebestücken per Phenol/Chloroform-Methode	48
3.4.1.3. DNA-Isolierung aus Blut-Serum mittels QIAamp DNA Blood Midi Kit	49
3.4.1.3.1. Vorbereitung	49
3.4.1.3.2. Ausführung	49
3.4.1.4. DNA-Extraktion aus Urin-Sediment mittels QIAamp DNA Mini Kit	50
3.4.1.4.1. Vorbereitung	50
3.4.1.4.2. Ausführung	50
3.4.2. DNA-Messung per Photometer	51
3.4.3. PCR-Amplifikation	51
3.4.4. Mikrosatellitenanalyse	52
3.4.4.1. Mikrosatellitenanalyse per Polyacrylamid-Gel Elektrophorese	53
3.4.4.1.1. Ausführung	53
3.4.5. Laserdetektion der PCR-Produkte	54
3.4.6. Statistik	55
<b>4. ERGEBNISSE</b>	<b>57</b>
<b>4.1. Inzidenz genetischer Alterationen</b>	<b>57</b>
<b>4.2. Serum-DNA-Alterationen</b>	<b>64</b>
4.2.1. Inzidenz	64
4.2.2. Assoziation mit klinisch-pathologischen Prognoseparametern	65

## Inhaltsverzeichnis

4.2.3. Spezifität	65
<b>4.3. Urin-DNA-Alterationen</b>	<b>68</b>
4.3.1. Inzidenz	69
4.3.2. Assoziation mit klinisch-pathologischen Prognoseparametern	69
<b>5. DISKUSSION</b>	<b>72</b>
<b>5.1. Genetische Charakterisierung des Harnblasen- karzinoms</b>	<b>75</b>
<b>5.2. Serum-DNA-Analyse</b>	<b>78</b>
<b>5.3. Urin-DNA-Analyse</b>	<b>80</b>
<b>5.4. Zukünftige Anwendungen</b>	<b>82</b>
5.4.1. Diagnose	82
5.4.1.1. Genetische Klassifikation	82
5.4.1.2. Serologischer Nachweis	83
5.4.2. Anwendung	83
5.4.3. Andere Methoden	84
<b>6. ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>90</b>
<b>7. ABSTRACT</b>	<b>92</b>
<b>8. LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>94</b>
<b>9. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</b>	<b>131</b>
<b>10. ABBILDUNGEN</b>	<b>132</b>
<b>11. TABELLEN</b>	<b>134</b>
<b>AKADEMISCHE LEHRENDE</b>	<b>135</b>
<b>DANKSAGUNG</b>	<b>137</b>

## 1. Einleitung

### 1.1. Tumorbiologie

#### 1.1.1. Allgemeines

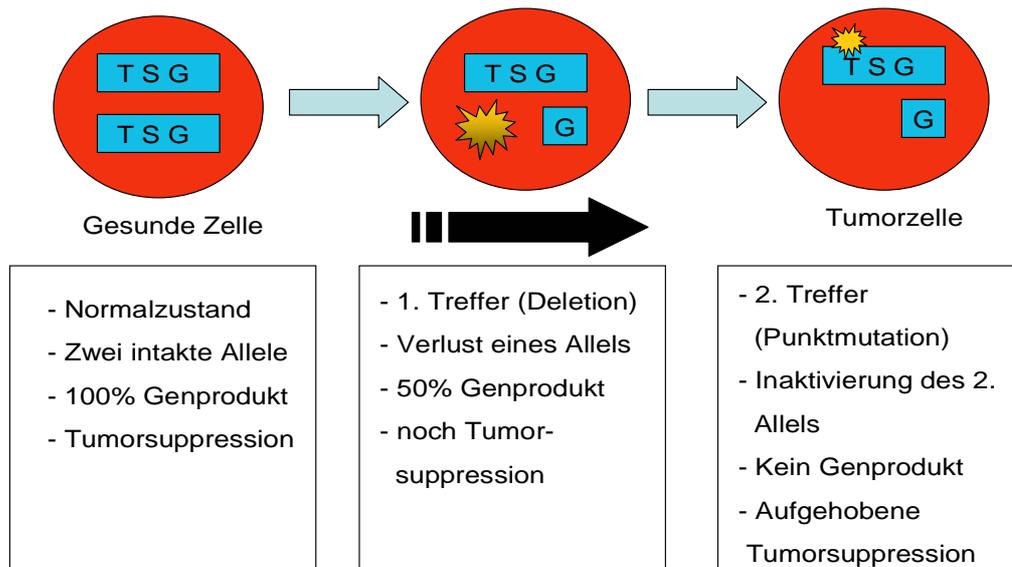
Der Ausdruck Krebs bezeichnet einen malignen Tumor, welcher drei Malignitätskriterien erfüllt. Erstes Kriterium ist ein unkontrolliertes Wachstum, welches in das umgebende Gewebe unabhängig von Organgrenzen infiltrieren kann (zweitens) mit der möglichen Metastasierung (drittens) in andere Organe.

In lebenden Organismen wird die Integrität von Geweben durch ein dynamisches Gleichgewicht von Mitose (Zellteilung) und Apoptose (dem programmierten Zelltod) reguliert. Ein Überwiegen wachstumsfördernder bzw. eine Hemmung wachstumsinhibitorischer Faktoren, die z.B. die Apoptose auslösen, können eine Störung dieses Gleichgewichts auslösen. Der Zellzyklus wird von einer großen Zahl Proteine geregelt, welche über Mitose oder Apoptose entscheiden.

Die Entwicklung eines Tumors ist das Produkt von vielen Einzelereignissen auf molekularer Ebene und wird im Modell der Mehrschrittkarzinogenese beschrieben. Multiple Mutationen führen nach diesem Modell von frühen morphologischen Veränderungen einer Zelle bis hin zum invasiven Tumor. Dabei ist die Reihenfolge der nacheinander auftretenden Mutationen variabel. Die Mutationen führen durch Steigerung der Teilungsrate zu einem ungebremsten und möglicherweise infiltrativem Wachstum und letztendlich zur Abkopplung aus dem Zellverband mit der Metastasierungsfähigkeit in andere Organsysteme (*Kassen & Hofmockel, 2000*).

Man teilt diejenigen Gene, welche für die Entstehung neoplastischen Gewebes verantwortlich sind, in zwei Gruppen ein. Auf der einen Seite sind es Protoonkogene, welche nach einer Mutation, überwiegend eine Vermehrung genetischen Materials (Polysomie, Zugewinn, Duplikation), zu Onkogenen werden. Die andere Gruppe ist die Gruppe der Tumorsuppressorgene (TSG), die durch Verhinderung der Zellteilung und Auslösung der Apoptose regulierend auf den Zellzyklus einwirken. Meist werden die TSG durch einen Verlust genetischen Materials (Monosomien, Deletion) inaktiviert. Beispiele für Onkogene sind ras, bcl-2, erb-B2, src, raf, jun, myc oder fos. Ihre Genprodukte wirken an zellulären Vorgängen der Signalaufnahme und Signaltransduktion mit. Teilweise reichen Punktmutationen eines einzelnen Nukleotids aus, um Onkogene zu aktivieren (z.B.

ras-Familie). Die TSG werden demgegenüber auch rezessive Onkogene genannt, da nur ein gesundes Gen-Allel ausreicht, die Genfunktion aufrecht zu erhalten (*Kassen & Hofmockel, 2000*). Daher müssen beide Allele eines TSG alteriert sein, damit der genetische Defekt bemerkbar wird. Knudson und Strong formulierten 1972 die „2-Treffer-Hypothese“ für die Inaktivierung von TSG anhand des Wilms-Tumors (*Knudson, Jr. & Strong, 1972*). Mittlerweile konnte diese Hypothese auf alle Tumorentitäten übertragen werden (*Fearon & Vogelstein, 1990*) (vergl. Abb. 1). Der „2-Treffer-Hypothese“ nach erlangen betroffene Zellen den für malignes Wachstum notwendigen Wachstumsvorteil nur dann, wenn durch Verlust chromosomaler Abschnitte (Deletion) ein Allel des betroffenen TSG verloren geht und das andere Allel inaktiviert wird (z.B. durch Punktmutation). Das p53 ist wohl das bekannteste TSG. Sein nukleäres Genprodukt, ein Phosphoprotein, verhindert den Übergang von G1- in die S-Phase des Zellzyklus und damit die Zellteilung. In über 50% der menschlichen Tumoren lassen sich Mutationen des p53-TSG identifizieren. Sie spielen in der Kanzerogenese des Harnblasenkarzinoms eine wichtige Rolle (*Sidransky et al., 1991; Dalbagni et al., 1993; Sarkis et al., 1993; Sarkis et al., 1994; Spruck et al., 1994*). Ebenfalls von Bedeutung für die Entwicklung und Fortschreitung des Harnblasenkarzinoms ist das erste identifizierte TSG, das Retinoblastoma-Gen (RB-Gen) (*Ishikawa et al., 1991; Logothetis et al., 1992; Miyamoto et al., 1995; Presti, Jr. et al., 1996; Cordon-Cardo et al., 1997*). Als Folge aller Mutationen von Tumorsuppressorgenen und Protoonkogenen resultiert eine Dysregulation des Zellzyklus.



**Abbildung 01:** Knudson'sche „2-Treffer-Hypothese“ zur Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen (TSG) (*Knudson, Jr. & Strong, 1972*) mit Anleihen aus (*Goessl, 2001*)

Tumorsuppressorgene werden erst durch Verlust oder Mutation beider Allele inaktiviert.

## **1.1.2. Klinik und Genetik des Harnblasenkarzinoms**

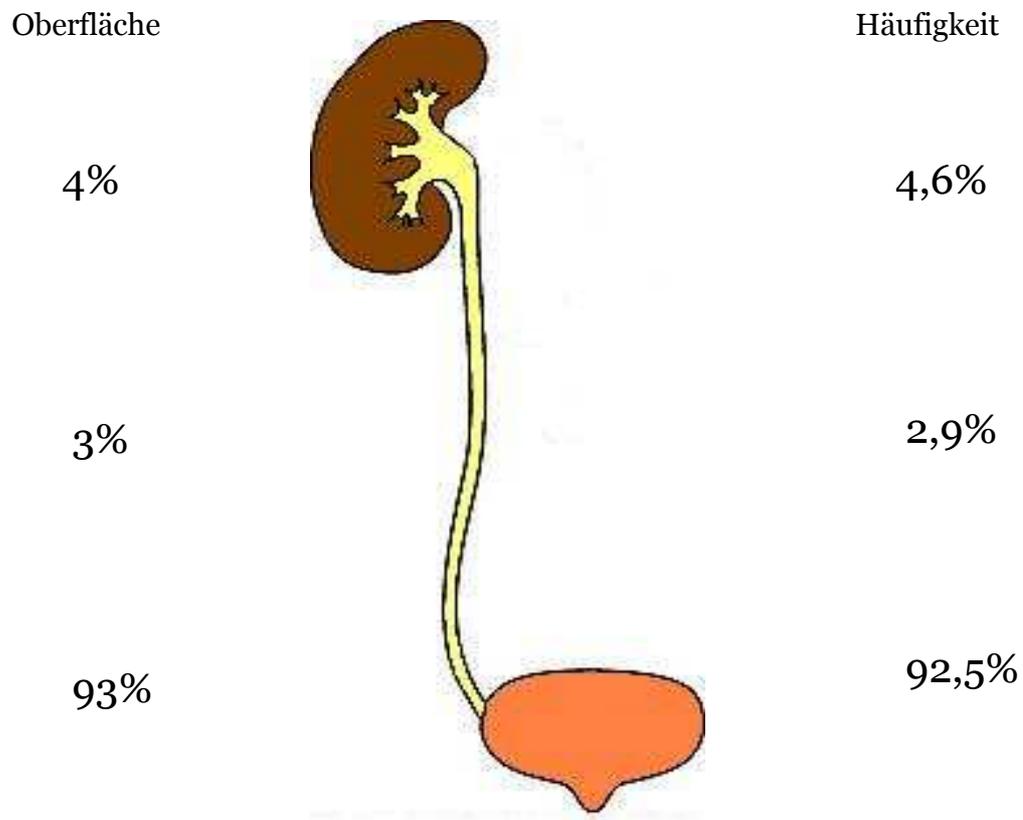
### **1.1.2.1. Epidemiologie**

Das Harnblasenkarzinom stellt 3,4% aller malignen Tumoren dar. Es ist der 4. häufigste Tumor des Mannes (4,6% aller Tumore) und der 12. häufigste bei der Frau (2% aller Tumore). Für das Jahr 2008 heißt das: 11.460 Neuerkrankungen bei Männern und 4.510 bei Frauen. Als Tumorlokalisierung bei allen Krebssterbefällen liegt das Harnblasenkarzinom bei Männern auf Platz 10 und bei Frauen auf Platz 14. Die Inzidenz wird beim Mann mit 30 neuen Fällen pro Jahr pro 100.000 Einwohner, bei der Frau mit 8 angegeben. Das bedeutet, dass pro Jahr in der Bundesrepublik Deutschland gut 16.000 neue Fälle auftreten. Hinzu kommen noch pro Jahr etwa 12.000 neu entdeckte Nachweise eines in situ Tumors oder einer Neubildung unklaren Verhaltens. Das Harnblasenkarzinom ist in industrialisierten Ländern häufiger als in weniger entwickelten Ländern. Jährlich sterben etwa 130.000 Menschen an diesem Tumor.

Männer sind ca. 3 Mal so häufig betroffen wie Frauen. Durch den proportional zu den Männern stärker gestiegenen Zigarettenkonsum bei den Frauen gleichen sich die Zahlen aber immer mehr an. Mit wachsendem Alter vergrößert sich dieser Unterschied. Das mittlere Erkrankungsalter lag laut Robert-Koch-Institut 2008 bei einem Alter von 73 bzw. 74 Jahren bei Männern bzw. Frauen bei der Primärdiagnose eines Harnblasenkarzinoms. 75% aller Patienten haben bei der Erstdiagnose ein oberflächliches Harnblasenkarzinom, 20% ein invasives und 5% ein bereits metastasiertes Karzinom (*Hautmann & Huland, 2001*; Robert Koch Institut 2008). Zwischen den Jahren 1939 und 1971 stieg die Inzidenz um 50% an.

### **1.1.2.2. Ätiologie**

Bei kaum einem anderen urologischen Tumor sind Toxine im Hinblick auf Kanzerogenese so studiert und untersucht worden wie beim Harnblasenkarzinom. Das Zeitintervall zwischen Exposition und Auftreten eines manifesten Karzinoms beträgt im Mittel 24 Jahre. Die Karzinogene wirken auf das gesamte Urothel. Abbildung 02 zeigt eine Korrelation zwischen urothelialer Oberfläche und der Häufigkeit eines Urothelkarzinoms. Die Intensität und die Dauer einer Exposition korrelieren positiv mit dem Erkrankungsrisiko. Einen Überblick über die bekanntesten Blasenkarzinogene gibt Tabelle 01.



**Abbildung 02:** Häufigkeit der Urothelkarzinome in Korrelation zur urothelialen Oberfläche

**Tabelle 01:** Kanzerogene beim Harnblasenkarzinom (*Hautmann & Huland, 2001*)

- Chemische Farbstoffe
- 2-Naphtylamin
- Auramin
- Benzidin
- 4-Amino-biphenyl
- Dichlorobenzidin
- Phenacetin
- Cyclophosphamid
- Chlornaphazin
- Orthotolidin
- Zigarettenkonsum
- Chronische Harnwegsinfekte (Nitrosamine)
- Billharziose ( <i>Schistosoma haematobium</i> )
- Endemische (Balkan-) Nephropathie (Mykotoxine)
- Medikamente
- Chlornaphazin
- Phenacetin
- Cyclophosphamid
- Radiatio

### **Aromatische Amine**

Durch die Hydroxylierung und Glucuronidierung in der Leber können sie über den Urin ausgeschieden werden und werden kanzerogen. Inaktiviert können sie über die N-Acetyltransferase werden. Menschen, die genetisch bedingt schnell acetylieren, haben ein geringeres Krebsrisiko als so genannte Langacetylierer.

## **Rauchen**

Zigarettenraucher haben ein 2:1 bis 6:1 erhöhtes Risiko, an Harnblasenkrebs zu erkranken (Cole 1971; Kunze *et al.*, 1986; Brennan *et al.*, 2000). Nach 40 Jahren Zigarettenkonsum ist das Risiko doppelt so hoch wie bei einer 20-jährigen Raucheranamnese. Die entscheidende Rolle spielt auch hier wohl das 2-Naphthylamin. Bei Männern werden 50-60% der Harnblasentumore auf das Zigarettenrauchen zurückgeführt, bei Frauen etwa 25% (Marcus *et al.*, 2000).

## **Medikamente**

Bei drei Medikamenten konnte eine eindeutige Verbindung zur Entstehung von Harnblasenkrebs belegt werden.

- *Cyclophosphamid*, durch die Einführung der Cystitisprophylaxe mittels Mesna ist das Blasentumorrisiko durch dieses Zytostatikum allerdings heute zu vernachlässigen.
- *Phenacetin*, führt zusätzlich zu einer interstitiellen Nephritis (Analgetika-Nephropathie). Bevorzugt entstehen Urothelkarzinome im oberen Harntrakt. Ein Stickstoffhydroxylmetabolit mit der chemischen Struktur eines aromatischen Amins, ist bei Phenacetin das aktive Karzinogen.
- *Chlornaphazin*, ist ein chemisch dem Beta-Naphtylamin verwandtes Polyzythämie-Therapeutikum und wird seit 1963 nicht mehr verwendet.

## **Chronische Harnwegsinfekte**

Besonders bei Trägern von Dauerkathetern führen sie zur Ausbildung von Plattenepithelkarzinomen der Blase. Damit sind besonders die Patienten gefährdet, die aufgrund einer neurogenen Blasenentleerungsstörung über Jahrzehnte rezidivierende Infekte, Blasensteine und Katheter bedingte, persistierende Schleimhautirritationen aufweisen.

## **Billharziose**

In weiten Teilen Afrikas und den arabischen Ländern ist die Billharziose endemisch. In der akuten Phase der Infektion mit *Schistosoma haematobium* bilden sich in der Blase zunächst noch therapierbare granulomatöse Polypen. Bei einer chronischen Infektion, entwickeln sich ebenfalls Plattenepithelkarzinome. Ätiologisch wird eine infektbedingte Nitrosaminbildung postuliert.

### **Balkannephropathie**

Aus bestimmten Regionen im Balkan wurde ein gehäuftes Auftreten von Urothelkarzinomen in Verbindung mit der Balkannephropathie gebracht. 90% der Tumore treten im oberen Harntrakt auf und 10% bilateral. Ätiologisch scheint ein saprophytisch wachsender Pilz im gelagerten Getreide eine Rolle zu spielen, welcher Nephrotoxine und karzinogene Mycotoxine bildet.

### **Gefährdete Berufsgruppen**

Farbindustrie, Textilfärbung, Lederverarbeitung, gummiverarbeitende Industrie, Aluminiumindustrie, Gasproduktion, Kohleindustrie, Druckindustrie, Laborangestellte, Friseur, Kammerjäger

### **Bestrahlung**

Das relative Risiko eines Zweittumors nach extensiver Strahlentherapie beträgt 1,58.

### **1.1.2.3. Pathogenese**

95% aller Harnblasenkarzinome sind Übergangszellkarzinome (Transitionalkarzinome, TCC) oder synonym „Urothelkarzinome“.

In 3-6% findet man Plattenepithelkarzinome, die auch als Mischform im Endstadium eines TCCs auftreten können. In 0,2-2% gibt es Adenokarzinome der Blase, die v.a. am Blasendom an der Einmündungsstelle des Urachus (Urachuskarzinom) zu finden sind oder aus periurethralen und periprostatistischen Drüsen entstehen (*Jakse et al., 1979; Anderström et al., 1983; Raghavan et al 1995*).

Bei über 75% findet man bei der Erstdiagnose so genannte oberflächliche Harnblasenkarzinome. Mit diesem oberflächlichen Begriff wurden bislang alle urothelialen Tumoren bezeichnet, die kein muskelinvasives Wachstum zeigten. Wegen der Problematik, einen als invasiven Tumor definierten Tumor als oberflächlich zu bezeichnen und zusätzlich aufgrund der genetischen Heterogenität von stromainvasiven urothelialen Tumoren sollte von nichtinvasiven (Ta, Tis) oder invasiven (T1) Tumoren gesprochen werden. Die genaue Charakterisierung sollte über das Wachstumsmuster (papillär) und die Invasionstiefe erfolgen (Tab. 3). Sie können einzeln oder multipel lokalisiert sein.

#### 1.1.2.4. Histologie

Histologisch wird das Harnblasenkarzinom nach der aktuellen Klassifikation der UICC von 2002 eingeteilt.

Das normale Urothel besteht aus 6 - 7 Zellreihen. Zum Nierenbecken hin nimmt die Schichtdicke ab. Dort finden sich nur noch 2 bis 3 Zellreihen. Die lumenwärts gelegenen „Umbrella cells“ (die so genannten Schirm- oder Deckzellen) sind typisch für das Uroepithel. Diese Deckzellen werden selber lumenwärts von einer sialinsäurehaltigen Mukopolysaccharidschicht bedeckt, der Schleimschicht. Die Basalmembran bedeckt das Epithel auf der dem Muskel zugewandten Seite.

So genannte Papillome werden als gutartig eingestuft. Diese seltene Tumorform wird lichtmikroskopisch von normalem Epithel bedeckt und wächst blumenkohlartig in das Blasenlumen. Die Zahl der Zelllagen ist etwas erhöht (G0-Tumoren). Grad-I-Urothelkarzinome weisen ein zellreiches kerndichtes Epithel mit Schichtungsverlust auf. Die Kerne sind dabei relativ gleichförmig und ähneln den Kernen der basalen Zellschicht. Es liegt noch keine Polymorphie vor.

Beim Grad-III-Tumor liegt ein anaplastischer, nicht mehr zu differenzierender Malignitätsgrad vor mit hochgradiger Kernpolymorphie und ohne erkennbare Schichtung des Epithels. Dazwischen sind die Grad-II-Tumoren einzustufen.

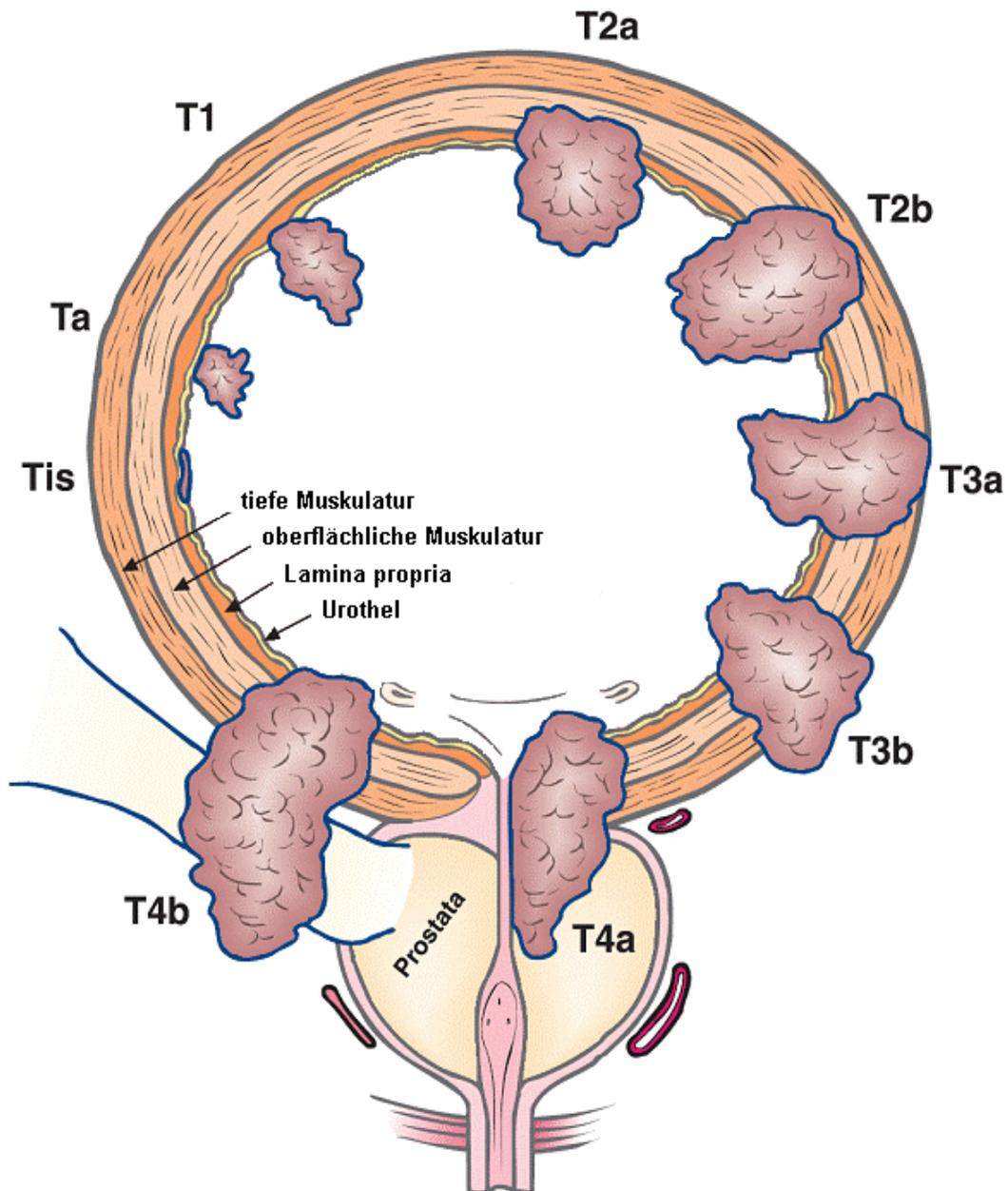
Die WHO hat 2004 die Kriterien für die Kerndifferenzierung geändert. Es wird nunmehr kein G-Stadium mehr angegeben, sondern in low-grade (genetisch stabil) und high-grade (genetisch instabil) Tumore eingeteilt. Dies verdeutlicht die Tatsache, dass innerhalb der unterschiedlichen Stadien Untergruppen mit höherer Malignität und größerer Progressionswahrscheinlichkeit existieren. Hochdifferenzierte papilläre Tumore sind nicht mehr als maligne einzustufen. Sie werden als PUNLMPs bezeichnet: „Papilläre urotheliale Neoplasie mit niedrig malignem Potenzial“. Ein urothelialer Tumor mit geringer Störung in der Schichtung und somit einem ungeordnetem Erscheinungsbild wird als nicht invasives Urothelkarzinom, „low grade“, also niedrig maligne eingestuft. Eine Polymorphie der Zellen und Kerne und damit verbundene Schichtungsstörung eines papillären Tumors, welche durch ihre Größe einem invasiven Tumor entspricht, wird als papilläres Karzinom „high grade“ bezeichnet und ist somit hochmaligne.

Da die in dieser Arbeit verwendeten Tumorproben allesamt vor 2004 histopathologisch beurteilt wurden und eine 1:1 Übertragung in die neue Klassifikation nicht möglich ist, wird in dieser Arbeit die alte Einteilung in G1-G3(G4) Tumore verwendet (*Lindemann-Docter et al., 2008; Knüchel et al., 2009*).

### 1.2.2.5.TNM-Stadien

**Tabelle 02:** TNM-Stadien nach UICC 2002 (Sobin und Wittekind 2002)

<b><u>T- Primärtumor</u></b>	
<b>Tx</b>	Primärtumor kann nicht beurteilt werden
<b>To</b>	Kein Anhalt für Primärtumor
<b>Tis</b>	Carcinoma in situ: „flacher Tumor“
<b>Ta</b>	Nicht invasiver papillärer Tumor
<b>T1</b>	Tumor infiltriert subepitheliales Bindegewebe
<b>T2</b>	Tumor infiltriert Muskulatur
	<b>T2a</b> Tumor infiltriert oberflächliche Muskulatur (innere Hälfte)
	<b>T2b</b> Tumor infiltriert tiefe Muskulatur (äußere Hälfte)
<b>T3</b>	Tumor infiltriert perivesikales Gewebe
	<b>T3a</b> mikroskopisch
	<b>T3b</b> makroskopisch
<b>T4</b>	Tumor infiltriert eines der folgenden Organe: Prostata, Uterus, Vagina, Beckenwand, Bauchwand
	<b>T4a</b> Tumor infiltriert Prostata oder Uterus oder Vagina
	<b>T4b</b> Tumor infiltriert Beckenwand oder Bauchwand
<b><u>N – regionäre Lymphknoten</u></b>	
<b>(iliakale + pelvine unterhalb der Bifurkation der A.iliaca communis)</b>	
<b>Nx</b>	Regionäre LK können nicht beurteilt werden
<b>No</b>	Kein Anhalt für regionäre LK
<b>N1</b>	Metastase in solitären LK ≤ 2 cm in größter Ausdehnung
<b>N2</b>	Metastase in solitären LK > 2 cm, aber ≤ 5 cm in größter Ausdehnung oder multiple LK, keiner mehr als 5 cm
<b>N3</b>	Metastasen in LK > 5 cm in größter Ausdehnung
<b><u>M – Fernmetastasen</u></b>	
<b>Mx</b>	Fernmetastasen können nicht beurteilt werden
<b>Mo</b>	Kein Anhalt für Fernmetastasen
<b>M1</b>	Fernmetastasen



**Abbildung 03:** Klassifikation des Tumorwachstums beim Harnblasenkarzinom

Der Zusatz „m“ sollte bei multiplen Läsionen angegeben werden.

Der Zusatz „P“ macht deutlich, dass das exakte Tumorstadium histologisch durch den Pathologen überprüft worden ist.

Entgegen vielen anderen epithelialen Tumorentitäten gibt es beim Harnblasenkarzinom zwei unkonventionelle Klassifikationen der Einteilung des

nicht muskelinvasiven Primärtumors. Das sind Ta-Tumoren, die von der Kerndifferenzierung alle Charakteristika eines malignen Wachstums aufweisen, jedoch nicht die Lamina propria des Urothels infiltrieren. Dieser Tumortyp geht mit einer guten Prognose einher.

Die andere Tumorentität ist das Carcinoma in situ (CIS). Bei diesem Stadium liegt eine flache intraepitheliale, nicht invasive Läsion mit einem Malignitätsgrad G3 vor, nach der neuen Einteilung wegen der genetischen Instabilität in die Klasse der high grade Tumore einzuteilen. Die Zellen haben eine hohe Kernpolymorphie. Zusätzlich wächst das CIS meist multifokal, befällt teilweise das gesamte Urothel (panurotheliale Erkrankung) und weist eine schlechte Prognose auf (*Weinstein et al.*, 1985; *Tyrkus et al.*, 1992; *Cookson et al.*, 1997; *Thomas et al.* 2012). Das primäre (de novo) CIS tritt ohne begleitenden exophytischen Tumor auf. Diese primäre Form ist mit 1-3% aller Blasentumore sehr selten. Die sekundären CIS können koexistent zu einem exophytischen Tumor, als Residuum nach Resektion eines papillären oder soliden Tumors oder im Sinne eines Tumorrezidivs eigenständig vorliegen. Ein sekundäres CIS wird bei nicht muskelinvasiven Tumoren in 7 – 15% und bei muskelinvasiven Tumoren in 45 – 65% zusätzlich entdeckt. Die Prognose des primären CIS ist deutlich besser. (*Palou et al.*, 2001; *Kaasinen et al.*, 2003; *Jocham & Miller*, 2007).

Morphologische Untersuchungen der gesamten Blase nach Zystektomie (Mappingstudien) haben gezeigt, dass das Harnblasenkarzinom ein multifokal wachsender Tumor ist, der bereits prämaligne Veränderungen, wie Dysplasie, in dem normal erscheinenden Urothel um den Tumor herum aufweist. Durch Durchflußzytometrie oder mittels Oberflächenmarkern konnte in Studien nachgewiesen werden, dass auch histologisch benigne erscheinende Zellen zum Teil bereits maligne transformiert sind.

### **Metastasierung**

Harnblasenkarzinome durchbrechen in ihrem weiteren Verlauf die Blasenwand und metastasieren sowohl lymphogen als auch hämatogen. Bei lymphogener Metastasierung werden die Lymphknoten des kleinen Beckens in der Fossa obturatoria, in der präsakralen und iliakalen Region befallen. Lunge, Knochen und Leber sind die häufigsten Zielorgane bei hämatogener Metastasierung.

Patienten mit nicht invasiven Tumoren (pTa) entwickeln in 0,7% der Fälle Metastasen unabhängig vom Differenzierungsgrad. Ist die Lamina propria

infiltriert, entwickeln sich in 14-23% der Fälle Metastasen. Bei multiplen Tumoren, einem Tumordurchmesser  $> 3$  cm, zunehmender Entdifferenzierung, begleitendem Carcinoma in situ oder einem pT1-Stadium steigt das Rezidivrisiko

### **1.1.2.6. Symptome**

Bei ca. 20% der Harnblasentumoren zeigen sich zunächst keine Symptome und werden lediglich anhand von einer Mikrohämaturie, Makrohämaturie oder Leukozyturie entdeckt. Das häufigste Symptom ist die schmerzlose Makrohämaturie. Allerdings treten schmerzlose Mikro- und Makrohämaturie auch bei anderen Tumoren des Harntraktes auf.

Im Urinsediment dominieren mikroskopisch nicht verformte (epitheliale oder frische) Erythrozyten im Gegensatz zu den dysmorphen Erythrozyten der Glomerulonephritis, die durch die Tubulipassage deformiert sind.

Miktionsbeschwerden können sowohl beim Carcinoma in situ als auch bei ausgedehnteren Blasentumoren auftreten (Dysurie, Nykturie, Urgesymptomatik und Pollakisurie).

Für den über 50-jährigen Mann gilt, dass jede Dysurie, die sich nicht durch die benigne Prostatahyperplasie oder durch einen Harnwegsinfekt erklären lässt, auf ein Carcinoma in situ der Harnblase verdächtig ist.

### **1.1.2.7. Diagnostik**

Die schmerzlose Makro- oder Mikrohämaturie stellt eine absolute Indikation zur Blasenspiegelung dar.

#### **Zystoskopie**

Zunächst sollte durch nicht invasive Verfahren, wie die Sonographie, eine renale Ursache ausgeschlossen werden.

Bei einer Zystoskopie inspiziert man die Blase mit starren geradeaus gerichteten sowie mit abgewinkelten, z.B.  $70^\circ$ , oder flexiblen Fiberglasinstrumenten. Stellt sich die Blasenschleimhaut unauffällig dar, muss man eruieren aus welchem Ostium der blutige Urin in das Blasenlumen strömt. Mit der geradeaus gerichteten Optik lässt sich die prostatistische, bulbäre sowie die distale Harnröhre inspizieren. Durch die

Instillation mit 5-Aminolevulinsäure kann man malignes Gewebe mittels Fluoreszenz markieren, welches sich dann unter blauem Licht rötlich darstellt.

### **Exfoliative Urinzytologie**

Transitionalzellen, wie auch Karzinomzellen, werden in den Urin abgeschilfert und können in einer Urin- oder Blasenspülprobe untersucht werden. Dabei sollte nicht der erste Morgenurin zur Analyse verwendet werden, da durch die lange Einwirkung des Harns die Zellen zerstört sein können.

Die Proben werden sedimentiert oder aber per Mikrofilter abgesaugt. Nach Fixation des Überstandes beurteilt man mittels Phasenkontrastmikroskop das Nativpräparat oder nach Anfärben mit den verschiedenen Färbetechniken, z.B. Papanicolaou, Giemsa, May-Grünwald/Giemsa (Pappenheim) oder nach den gängigen Schnellmethoden das angefärbte Präparat. Unter dem Mikroskop beurteilt man die Zellen nach folgenden Malignitätskriterien:

- Verschiebung der Kernplasmarelation
- Prominenz und Irregularität der Kernmembran
- Chromatinverteilung mit Transparenzverlust des Zellkerns
- Änderung der Chromatinfeinstruktur
- Vermehrung und Entrundung der Kernkörperchen
- Entrundung und Varianz der Zellkerne

Nach Papanicolaou gibt es 5 Graduierungen, von denen 1 und 2 gutartig, 3 atypisch, und 4 und 5 eindeutig als maligne zu bewerten sind. Die Sensitivität der Urinzytologie beträgt bei G1-Tumoren nur 10 – 30%, bei G2-Tumoren 40 – 60% und bei G3-Tumoren inklusive Carcinoma in situ 80 – 90%.

Falsch positive Befunde ergeben sich zumeist bei chronischen Entzündungen, besonders bei Urolithiasis.

### **Bildgebende Verfahren**

Zur Abklärung einer Mikro- oder Makrohämaturie ist eine Kontrastmitteldarstellung der Nieren und ableitenden Harnwege (Urogramm oder Kontrastmittel-CT) obligat. Jedoch stellen sich Blasentumore im Urogramm häufig nur ungenügend dar. Allerdings wird damit eine Blutungsquelle in Harnleitern und in Nierenbecken weitgehend ausgeschlossen. Zusätzlich kann man erkennen, ob es durch den Tumor zu einem Aufstau der Nieren gekommen ist.

Bei gefüllter Blase kann man mit dem perkutanen Ultraschall einen Blasentumor in der Regel diagnostizieren.

Im Computertomogramm kann ein Tumor der Blase zumeist identifiziert werden. Zusätzlich erhält man Informationen über die lokale Tumorausbreitung, insbesondere die Infiltration von Nachbarorganen.

Durch das Computertomogramm und andere bildgebende Verfahren sind die Lymphknoten des Beckens nur unzureichend zu erkennen, da Lymphknotenvergrößerungen erst ab 1 cm Größe erfasst werden und somit Mikrometastasen übersehen werden und nur ausgedehnte Wandüberschreitungen (>pT3b) oder Infiltrationen in Nachbarorgane dargestellt werden können.

Das Kernspintomogramm ist in dieser Hinsicht dem Computertomogramm nur geringfügig überlegen, und zwar im Falle, dass das Kontrastmittel Gadolinium gegeben wird.

Eine präzisere Unterteilung in T1-, T2-, T3a- und T3b-Tumoren ist mittels Ultraschalldiagnostik, Computertomogramm bzw. Urogramm nicht zu erreichen, so dass diese Verfahren bei der Diagnose des Primärtumors eine untergeordnete Rolle spielen.

### **Zystoskopie und transurethrale Resektion (TUR)**

Durch die transurethrale Resektion des Tumors in Narkose erfolgt die endgültige Sicherung der Diagnose. Der Tumor wird fraktioniert entfernt und das Material vom Tumorgrund getrennt eingeschickt, um eine sichere Aussage zur Infiltrationstiefe zu erhalten. Um Präkanzerosen, Dysplasien und Carcinoma in situ zu identifizieren, werden aus dem normal erscheinenden Urothel Biopsien entnommen. Schließlich wird bei dieser Untersuchung die Blase bimanuell untersucht. Eine sichere Beurteilung ist nur in Narkose bei erschlaffter Bauchdecke möglich, um auszuschließen, dass bereits Infiltrationen in die Beckenwand oder Nachbarorgane vorliegen, d.h. die Differenzierung zwischen einem T3- und einem T4-Tumor klar zu stellen.

Ist die Blasenwand sehr hart und fest und gleichzeitig mobil, besteht der dringende Verdacht, dass ein muskelinvasiver Tumor vorliegt.

## **Staging**

Zum Ausschluss eines Organ überschreitenden Wachstums und von Metastasen ist ein CT bei Diagnose eines muskelinvasiven Blasentumors angezeigt. Folgende Staginguntersuchungen sind möglich:

- eine Schnittbildgebung des Beckens zur Lymphknotenbeurteilung in den Iliacalregionen, der Fossa obturatoria, der paraaortalen Region
- eine Sonographie des Oberbauches zur Beurteilung der Leber
- ein Röntgen-Thorax in zwei Ebenen zum Ausschluss von Lungenmetastasen
- ein Knochenszintigramm zum Ausschluss von Knochenmetastasen
- Positronenemissionstomographie (PET)

Ein korrektes Tumorstaging anhand eines CTs oder MRTs ist jedoch nicht möglich. Somit ist eine Schnittbildgebung kein Standardverfahren beim Staging., zur Planung einer Zystektomie allerdings gängige Praxis.

Knochenszintigramm und Röntgen-Thorax haben eine hohe Sensitivität. Bei der Szintigraphie fällt eine Metastase als Mehranreicherung des Isotops an. Die Spezifität ist hierbei allerdings niedrig, da diese Mehranreicherung auch durch Umbauprozesse, chronische Entzündungen, Heilungsprozesse nach Frakturen und ähnlichen Prozessen bedingt sein kann. Deshalb muss eine atypische Mehranreicherung durch gezielte Röntgenuntersuchungen spezifiziert werden. Eine solche Szintigraphie ist jedoch nur beim symptomatischen Patienten (erhöhte alkalische Phosphatase, Schmerzen oder neurologischen Symptomen) indiziert. Ein PET bietet bislang keine Verbesserung in der Diagnostik eines Blasenkarzinoms und sollte deshalb nicht zur Routineuntersuchung, sondern nur im Rahmen von Studien eingesetzt werden.

## **Weitere diagnostische Methoden**

Mittels der Flowzytometrie kann das Epithel der Blasenschleimhaut durch Analyse der DNA klassifiziert werden. Zur Diagnostik und zur Erfassung der Prognose werden Zelloberflächenmarker verwendet. Prognostisch ist zum Beispiel der Verlust der Blutgruppenantigene bedeutsam, die auf gesunden Epithelzellen normalerweise nachzuweisen sind.

Mit monoklonalen Antikörpern kann man tumorassoziierte Antigene auf den Zellen immunhistologisch bzw. immunzytologisch identifizieren. Durch solche Antikörper kann die Sensitivität der Zytologie (Immunzytologie) verbessert werden. Sie

können jedoch kein tumorspezifisches Antigen identifizieren. Tumorassoziierte Antigene werden allerdings quantitativ unterschiedlich bei benignen und malignen Zellen exprimiert. Mit dem Urovision-Test® (eine FISH-Untersuchung) hat sich eine Methode etabliert, bei der der Urin auf zytogenetischer Ebene untersucht wird.

### 1.1.2.8. Therapie

#### **Carcinoma in situ**

Das Carcinoma in situ wird, soweit es sichtbar ist, transurethral entfernt. Im weiteren Verlauf muss man mit einem Tumorprogress bei 75% der Patienten rechnen, bei einer 5-Jahres-Mortalität von 60%.

Durch eine an die transurethrale Resektion anschließende intravesikale Chemo- oder Immunotherapie ist dieser natürliche Verlauf zu beeinflussen. Die besten Ergebnisse lassen sich mit BCG (Bacillus-Calmette-Guerin) erzielen (Tab. 3). BCG sind attenuierte Rinder-Tuberkelbakterien, die nach Instillation in die Blase in der Blasenschleimhaut eine intensive lokale Immunreaktion auslösen. Dabei werden mononukleäre Immunozyten aktiviert und die von ihnen produzierten Zytokine, z.B. Interleukin-2, wirken auf die veränderten Zellen der Blasenschleimhaut ein. Bei ca. 75% der Patienten stellen sich nach 2-3 Zyklen mit BCG langfristige Erfolge ein. Die Langzeittherapie ist heute die Standardtherapie beim Carcinoma in situ, da sie einem oder zwei Zyklen BCG signifikant überlegen ist.

Zur Therapiekontrolle ist die vierteljährliche Urinzytologie ein guter Marker. Sollte es zu einem Rezidiv bzw. zu einem Progress kommen, ist die Zystektomie indiziert.

**Tabelle 03:** Therapieschemata für topische Installationstherapeutika (*Jocham und Miller, 2007*)

Substanz	Dosierung	Induktionstherapie	Langzeittherapie
Doxorubicin	50 mg/Woche	6-8 Wochen	monatlich 6-12 Monate
Mitomycin C	20 mg/Woche	6-8 Wochen	monatlich 6-12 Monate
Epirubicin	50 mg/Woche	6-8 Wochen	monatlich 6-12 Monate
BCG	1-5-mal 10 Keime/Woche	6 Wochen	nach 3 + 6 Monaten, dann halbjährlich bis 3 Jahre je 1 x wöchentlich für 3 Wochen

**Nicht invasive Blasentumoren**

Bei oberflächlichen Harnblasentumoren ist die chirurgische Entfernung des gesamten Tumors mittels einer fraktionierten transurethralen Resektion durch elektrische Schlinge Therapie der Wahl. In derselben Sitzung wird jeweils separat der Tumorrand sowie der Tumorgrund reseziert und zur histologischen Untersuchung geschickt. Erst dadurch kann eine RO-Resektion (tumorfreies Rand- bzw. Grundgewebe) nachgewiesen werden. Im Resektat sollte Detrusormuskulatur enthalten sein. Des Weiteren sollten mindestens 4 randomisierte Biopsien aus der an sich gesund darstellenden Blasenwand und eine Biopsie aus der prostatistischen Harnröhre entnommen werden.

Auf Grund der hohen Rezidivraten und der geringen, aber bedrohlichen Progressrate dieser Rezidive, sollte bei G3-Tumoren und bei Dysplasie- bzw. Carcinoma in situ-Nachweis in den randomisierten Biopsien eine zusätzliche Rezidivprophylaxe durchgeführt werden. Am häufigsten wird wegen seiner geringen Nebenwirkungen Mitomycin C wöchentlich für 8 Wochen und anschließend einmal monatlich in die Blase instilliert. Bei den Immuntherapeutika wird das BCG am häufigsten eingesetzt.

Nicht bewährt zur Rezidivprophylaxe hat sich die Radiatio der Harnblase.

**Invasive nicht metastasierte Blasentumore**

Bei diesem Stadium des Harnblasenkarzinoms ist die radikale Zystektomie als Therapie der Wahl angezeigt. Bei diesem Eingriff wird die Harnblase, beim Mann zusätzlich die Prostata, die Samenblase und eventuell die Urethra, bei der Frau die vordere Vaginalwand, eventuell die Adnexen mit Uterus und ebenfalls eventuell die Urethra mit der Harnblase entfernt.

Die Mortalität dieses großen Eingriffs liegt abhängig von der Erfahrung des Operateurs etwa zwischen 0,7 - 3%. Die perioperative Überlebensrate liegt bei freien regionalen Lymphknoten bei T2-Tumoren ungefähr bei 80%, bei T3a- und b-Tumoren bei 50 - 60%.

Durch eine prä- oder postoperative Radiatio wird die Überlebenschance nicht beeinflusst.

## **Harnableitung**

Heute werden folgende Möglichkeiten der Harnableitung verwendet:

- Ureter-Haut-Fistel
- Harnleiter-Darm-Implantation (HDI)
- Ileum- oder Colon-Conduit
- orthotope Ersatzblasen (Neoblasen)
- dystope Ersatzblasen mit kathereterisierbarem Stoma

## **Metastasierte Harnblasentumore (nach Zystektomie)**

Durch den kombinierten Einsatz von Methotrexat und Cisplatin mit zusätzlicher Gabe von entweder Adriamycin und Vinblastin (MVAC-Schema) oder nur mit Vinblastin (CMV -Schema) konnten die Remissionsraten von 5% auf 50 bis 70% gesteigert werden, wobei davon jeweils die Hälfte als komplette Remission (CR) anzusehen sind. Die Nebenwirkungen sind allerdings noch erheblich, so dass neuere Chemotherapeutika (z.B. Paclitaxel/Carboplatin oder Gemcitabine/Cisplatin) eingesetzt werden, deren Wirksamkeit und Verträglichkeit aber noch nicht endgültig beurteilt werden können. Die Langzeit-Überlebensraten des Gesamtkollektives betragen heute zwischen 15 - 20%.

Die gleichen Kombinationen der oben genannten Chemotherapeutika werden auch zur adjuvanten und neoadjuvanten Therapie verwendet. Aufgrund der erheblichen Toxizität können diese Chemotherapeutika nicht bei jedem Patienten eingesetzt werden.

## **Natürlicher Krankheitsverlauf von Harnblasentumoren**

Bei den nicht invasiven Tumoren entwickeln trotz kompletter transurethraler Resektion 60 - 80% Rezidive, von denen wiederum 80% im ersten postoperativen Jahr entstehen. Jeder fünfte dieser Tumoren weist einen Tumorprogress (mit Muskelinvasion) auf (*Holmäng et al., 1995; van Brussel & Mickisch, 1999*). Weil die 5-Jahres-Überlebens-Rate muskelinvasiver Tumoren nur etwa 60% beträgt, verstirbt die Hälfte dieser Patienten mit Tumorprogress, d.h. 5 bis 10% der Patienten mit anfänglich nicht invasivem Harnblasenkarzinom, innerhalb von 5 Jahren an ihrer Tumorerkrankung.

Die wesentlichen Faktoren, die diesen natürlichen Krankheitsverlauf beeinflussen, sind:

- Tumorgrad
- T-Kategorie
- Multifokalität des Tumors
- Tumormasse

Das bedeutet, dass Patienten mit sehr kleinen unifokalen TaG1 Tumoren nur ein geringes Risiko haben, ein Rezidiv bzw. einen Progress zu entwickeln.

Patienten mit T1G3 Tumoren, die multifokal auftreten und bei denen sich in der umliegenden Schleimhaut bereits Dysplasien oder sogar ein Carcinoma in situ entwickelt haben, sind am meisten gefährdet.

Ohne Therapie überleben Patienten mit muskelinvasiven Tumoren (T2) oder solche mit Infiltration ins perivesikale Fettgewebe (T3) nur in 5 bis 10% länger als 5 Jahre.

#### **1.1.2.9. Genetik des Harnblasenkarzinoms**

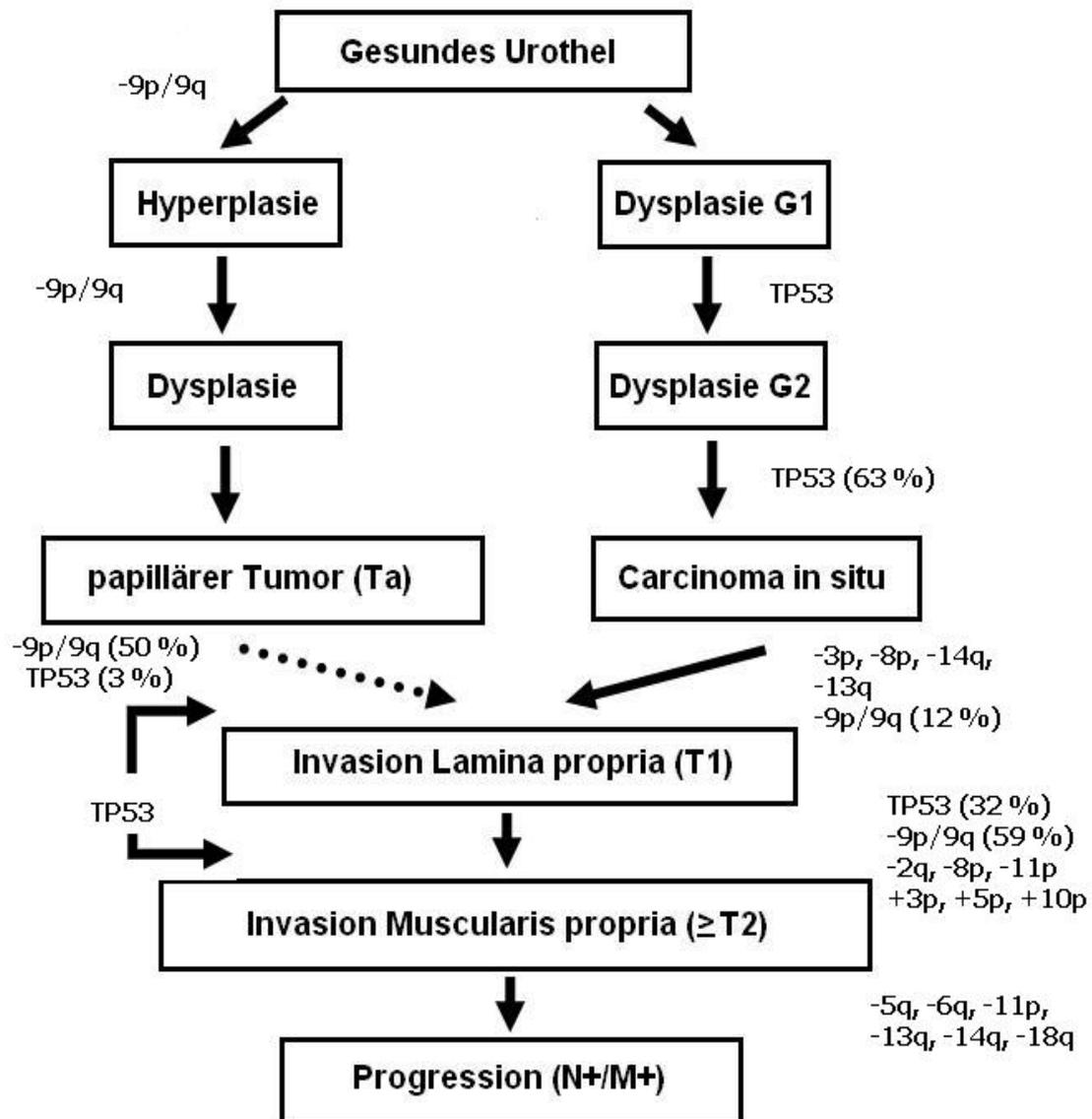
Zum Zeitpunkt der Diagnosestellung wachsen, wie oben beschrieben, 75% der Harnblasenkarzinome oberflächlich und zeigen ein papilläres Wachstumsmuster. Dem gegenüber stehen ca. 20 bis 25% primär solide Tumoren, welche bereits bei Erstdiagnose eine Infiltration der Muscularis propria aufweisen. Weil bei diesen Tumoren meist keine oberflächliche Präkursorläsion vorausgeht, wurden für die Entwicklung des Harnblasenkarzinoms genetisch zwei Entstehungswege postuliert (*Dalbagni et al., 1993; Spruck et al., 1994; Knowles, 1999*) (Abb. 4). Klinisch werden diese beiden Entstehungswege zum einen über die erhabene papilläre Wachstumsform und andererseits über die flache Läsion des Carcinoma in situ differenziert. Das unterschiedliche biologische Verhalten mit unifokalem und multifokalem Wachstum sowie die Rezidivneigung des Harnblasenkarzinoms kann allerdings nicht durch eine reine „Zwei-Säulen“-Karzinogenese ausreichend erklärt werden. Dennoch stellte die Hypothese der zwei Entstehungswege von Harnblasenkarzinomen die Basis für weitere genetische Untersuchungen dar.

Durch die erfolgte komplette Kartierung des Genoms der Blasenmukosa ergaben sich weitere Erkenntnisse. Es konnten bei operierten Patienten mit invasivem Blasenkarzinom genetische Veränderungen an sechs speziellen chromosomalen Orten identifiziert werden. Solche Alterationen fand man in der gesamten Mukosa, nicht nur in den Bereichen mit Tumornachweis, sondern auch in denen mit

gesunder Mukosa. Diese ausgeprägten Veränderungen traten in einer frühen Phase der Karzinogenese auf und werden als Präneoplasie (forerunner genes) bezeichnet. Die genaue Funktion dieser Läsionen bedarf weiterer Forschung (*Dalbagni et al.* 2001).

Im folgenden Abschnitt wird nun die seit längerem bekannte Entstehung beschrieben.

An der Karzinogenese des Harnblasenkarzinoms sind mehrere Onkogene beteiligt, welche in der Regel durch Amplifikation genetischer Sequenzen aktiviert werden. Die Onkogene der ras-Familie entfalten ihre Wirkung allerdings über ein mutiertes Proteinprodukt. Sie kodieren für 21kDa-Proteine mit GTPase-aktivität. Diese sind essentiell für die intrazelluläre Signaltransduktion. Eine singuläre Aminosäuresubstitution aktiviert sie. Zugrunde liegen Missense-Mutationen auf der Ebene der Nukleinsäuren. Reddy et al. identifizierten in der Harnblasenkrebszelllinie T24 die erste Mutation der ras-Onkogen-Familie 1982 als Punktmutation im Codon 12 des H-ras Gens (Reddy et al., 1982). H-ras Mutationen werden für das Transitionalzellkarzinom (TCC) der Harnblase in 6 - 84% beschrieben (*Knowles & Williamson, 1993; Malone et al., 1985; Fitzgerald et al., 1995; Przybojewska et al., 2000*). Es ist jedoch noch unklar, ob sie bei der Entstehung des Harnblasenkarzinoms eine tragende Rolle spielen. Eine Alteration im Codon 12 des H-ras Gens ist im Gegensatz zu K-RAS Mutationen oder N-RAS Mutationen beim Urothelkarzinom relativ prominent. (*Cordon-Cardo et al., 2000*). Beim transgenen Mausmodell konnte eine Korrelation zwischen dem Vorliegen einer H-RAS Mutation und dem histopathologischen Stadium sowie der Tumordifferenzierung festgestellt werden. Dies gelang bei menschlichen Harnblasentumoren bislang jedoch nicht (*Knowles & Williamson, 1993; Cordon-Cardo et al., 2000*). Das Gen ERBB2 (17q21), das einen transmembranen Rezeptor mit Homologität zum EGF-Rezeptor codiert, ist in einigen Harnblasenkarzinomen nachgewiesen worden. Vornehmlich sind lokal fortgeschrittene Tumoren mit schlechtem Kerndifferenzierungsgrad diejenigen, die ERBB2 exprimieren (*Hofstädter et al., 1986; Coombs et al., 1991; Moriyama et al., 1991; Sauter et al., 1993; Underwood et al., 1995; Wagner et al., 1995; Mellon et al., 1996*).



**Abbildung 04:** Modell zur Entstehung und Progression von Transitionalzellkarzinomen der Harnblase (Dalbagni et al., 1993; Spruck et al., 1994; Knowles, 1999)

Dieses Modell basiert auf histopathologischen Beobachtungen und molekulargenetischen Ergebnissen.

In einem Teil der Harnblasenkarzinome wird das Protoonkogen CCND1 (11q13) exprimiert. Das Genprodukt ist Zyklin D1, das am Fortschreiten des Zellzyklus über den Rb-Weg beteiligt ist (Proctor et al., 1991; Bringiuer et al., 1996; Oya et al.,

1998). Die Funktion von CCND1 kann jedoch nicht als signifikanter Prognosefaktor bewertet werden (*Mhaweck-Fauceslia et al.*, 2006). Neben den beschriebenen Onkogenen wurden in CGH Studien mehrere amplifizierte tumorassoziierte Chromosomenloci identifiziert, die gegebenenfalls Onkogene beherbergen. Dies sind die Regionen 1q22-24, 3p24-25, 3q, 5p, 6p22, 8q21-22, 10p12-14, 11q13, 12q15-21, 13q31-33, sowie Xp11-12 und Xq21-22 (*Kallioniemi et al.*, 1995; *Richter et al.*, 1997; *Hovey et al.*, 1998). Eine weitere chromosomale Region, welche amplifiziert in zytogenetischen und CGH Untersuchungen nachgewiesen wurde, ist 20q. In vitro wiesen Urothelzellen mit dieser Amplifikation eine Immortalität auf (*Reznikoff et al.*, 1996). Als ein potentielles Kandidatengen für diese Region kommt STK15/BTAK in Frage, welches in einigen anderen Tumorentitäten (Prostata-, Zervix-, Ovarial- und Mammakarzinom) amplifiziert nachgewiesen wurde.

Tumorsuppressorgene (TSG) entfalten ihre Wirkung auf die Entstehung von Neoplasien über eine Inaktivierung (siehe 1.2.1). Der intakte Wildtyp wirkt hemmend auf den Zellzyklus ein. An der Kanzerogenese des TCC der Harnblase sind mehrere TSGs beteiligt. Große Bedeutung haben dabei das p53, das Rb, INK4A/ARF, PTEN und das DCC. Zusätzlich sind ebenfalls zahlreiche deletierte tumorassoziierte chromosomale Regionen bekannt, welche überzufällig häufig bei Harnblasenkarzinomen vorgefunden werden und potentiell TSG beinhalten.

Beim Harnblasenkarzinom ist häufig eine Mutation in einem oder beiden p53 Allelen kombiniert mit einer Deletion oder LOH („Loss of heterozygosity“) des kurzen Arms des Chromosoms 17 (17p13-1). Bei vielen Karzinomarten befinden sich die Missense-Mutationen in den Exonen 4-8, der Region der DNA-Bindungsdomäne. Das Gen TP53 besteht aus 11 Exons und 10 Introns. Es reguliert den Zellzyklus. Bei DNA-Schäden inhibiert p53 in diesem Fall die Zellzyklusprogression von der G1 zur S-Phase durch eine transkriptionelle Aktivierung von p21<sup>WAF1/CIP1</sup> (6p21). Ebenfalls spielt p53 bei der Apoptose eine Rolle. Die o.g. Mutationen führen zu einer Akkumulation des Proteins im Nukleus. Dies geschieht aufgrund einer Phosphorylierung nach der DNA-Schädigung und somit zum Verlust der Aktivität als Tumorsuppressor (*Mitra et al.* 2007). Während der Mitose kontrolliert p53 durch seine Interaktion am Spindelkontrollpunkt den Übergang der Metaphase zur Anaphase und damit die korrekte Kontraktion der Mikrotubuli. Dies stört die Verteilung der Chromosomen auf die Tochterzelle (*Slaton et al.* 2001). Ein fortgeschrittenes Tumorstadium und schlechte Kerndifferenzierung korreliert mit diesen Veränderungen (*Sidransky et al.*, 1991;

*Habuchi et al., Fujimoto et al., 1992; 1993b; Spruck et al., 1993; Sarkis et al., 1994, Dalbagni et al., 1993; Esrig et al., 1994; Dalbagni et al., 2001; Mitra et al., 2007*). Das Retinoblastoma-Tumorsuppressorgen (Rb-Gen) ist auf dem langen Arm von Chromosom 13 (13q14) lokalisiert. Eine Alteration ist ebenfalls mit einer schlechten Prognose des Harnblasenkarzinoms assoziiert (*Ishikawa et al., 1991; Cairns et al., 1991; Cordon-Cardo et al., 1992; Logothetis et al., 1992; Lipponen & Luikkonen, 1995; Cordon-Cardo et al., 1997*). Das Proteinprodukt (pRb) ist ein nukleäres Phosphoprotein und greift in vielen Pathways urothelialer Karzinogenese ein. Es wirkt regulatorisch am G1-S Kontrollpunkt des Zellzyklus. In der dephosphorylierten (aktiven) Form wird der Transkriptionsfaktor E2F gebunden. In der phosphorylierten (inaktiven) Form wird E2F nicht mehr inhibiert und es werden vor allem Gene transkribiert, die für die DNA Synthese an der S-Phase essentiell (z.B. Thymidylate Synthetase, TS) (*DeGregori et al., 1995*) und für die Phosphorylierung von Rb Enzymen des Cyclin-abhängigen Kinase Komplexes (CDK; cyclin-dependent kinase) verantwortlich sind (z.B. Cyclin D1/CDK4/6 und Cyclin E/CDK2). Eine aktivierende Kinase und eine Cyclin Komponente bilden einen solchen Komplex. CDK-Inhibitoren (CDKIs) regulieren die Rb Phosphorylierung negativ. Bei Urothelkarzinomen mit einer Rb Überexpression ist häufig das Rb Gen inaktiviert (*Chatterjee et al., 2004*). Eine Amplifikation und Überexpression von CDK4 konnte vor allem bei hochgradigen Urothelkarzinomen nachgewiesen werden (*Simon et al., 2002; Aaboe et al., 2005*). Eine Überexpression von Cyclin D1 kann in 20-80% der Harnblasentumore nachgewiesen werden und dient als Prognosefaktor für die Invasivität des Tumors (*Reznikoff et al., 2000; Takagi et al., 2000*). In über 50% der Harnblasenkarzinome kommen Deletionen von Chromosom 9 vor. Die Alterationen konzentrieren sich bei Chromosom 9p um den Locus des TG INK4A/ARF und INK4B (p15) auf 9p21 (*Spruck et al., 1994; Devlin et al., 1994; Williamson et al., 1995b*). Von dieser komplexen chromosomalen Region werden drei Proteine codiert, die den Zellzyklus hemmen (p16, p14ARF, p15) (*Nobori et al., 1994; Cairns et al., 1995*). Dabei war INK4a-Gen das erste Kandidatengen, das für diese Region identifiziert wurde. Der humane Locus dieses Gens ist CDKN2A. Da Mutationsanalysen keine Mutationshäufung nachweisen konnten, geht man für diesen Locus von einer homozygoten Deletion als Mechanismus der Inaktivierung aus (*Spruck et al., 1994; Nobori et al., 1994; Cairns et al., 1995; Orlow et al., 1995; Williamson et al., 1995a; Balazs et al., 1997*). In diesem Locus auf Chromosom 9p21 ist der CDKI p16 kodiert, welcher im Rb-Pathway mit involviert ist (*Serrano et al., 1993*). Dieser Locus ist einer von

mehreren, der bei UroVysion® mittels FISH an zytologischen Urinproben untersucht wird. Ein positives Resultat (hetero- oder homozygote Deletion des 9p21 Locus) nach erfolgter intravesikaler Instillationstherapie zeigt ein 4-fach erhöhtes Rezidivrisiko (*Halling et al., 2002*). Auch in CDKN2A ist das ARF (p19) Gen beinhaltet, welches p14 codiert. Die Funktion von p19<sup>ARF</sup>/p14<sup>ARF</sup> im Zellzyklus wurde von Stott 1998 erkannt (*Stott et al., 1998*). Ein Verlust von ARF hat durch die entfallende Zellzyklus-inhibierende Funktion eine erhöhte Zellproliferationsrate zur Folge (*Korgaonkar et al., 2002*). In der Regel werden durch eine homozygote Deletionen alle drei TSG dieser Region auf einmal inaktiviert. Dies wird als sehr effektiver Mechanismus zur Tumorentstehung angesehen. P21, p16 und auch p27 gehören zu den CDK-Inhibitoren (CDKIs), die die CDK-Komplexaktivität regulieren und somit notwendig sind für die Zellzyklus-Suppression. Das Gen p21<sup>WAF/CIP1</sup> kodiert dabei das p21, welches wie oben beschrieben in Wechselwirkung mit p53 steht. p27 wiederum bindet an die Komplexe aus Cyclin D1/CDK4/6 und an Cyclin E/CDK2. Dadurch wird die Progression von G1- zur S-Phase inhibiert. Ein Verlust der p27-Expression geht mit einer Progression der Krebserkrankung vieler Tumore einher (*Mitra et al., 2007*). Ein weiteres Kandidaten-TSG auf Chromosom 9q32-33 konnte identifiziert werden, welches als DBC1 (Deleted in Bladder Cancer 1) bezeichnet wird. Ein positionales Klonieren gelang, nachdem die Region zunächst per Mikrosatellitenkartierung eingegrenzt werden konnte (*Habuchi et al., 1997; Habuchi et al., 1998; Nishiyama et al., 1999*). Die Promoterhypermethylierung ist als Mechanismus der Inaktivierung dieses Kandidatengens erkannt worden (*Habuchi et al., 1998; Habuchi et al., 2001*). In fast 60% aller Harnblasenkarzinome kommen Alterationen des Chromosoms 9 stadien-unabhängig vor, weshalb eine Deletion an 9p/9q als frühes Ereignis bei der Entstehung dieser Tumorentität gewertet wird. Ein LOH an DBC1 scheint mit einer potentiellen späteren Metastasierung bei nicht invasiven papillären Tumoren assoziiert zu sein (*van Oers et al., 2006; Lopez-Beltran et al. 2008*).

Es konnte auch gezeigt werden, dass das TSG PTEN auf Chromosom 10q23 in der Progression des Harnblasenkarzinoms eine Rolle spielt (*Cappellen et al., 1997; Cairns et al., 1998; Kagan et al., 1998; Aveyard et al., 1999*). In ungefähr 30% der muskelinvasiven Tumoren wird LOH von 10q23 gefunden. Der Inaktivierung des Gens liegt auch hier in der Mehrzahl der Fälle eine homozygote Deletion zugrunde, weshalb die wahre Inzidenz an Alterationen, wie sie durch konventionelle LOH-Analysen herausgearbeitet wird, möglicherweise unterrepräsentiert wird.

Um auf den Armen der Chromosomen größere Deletionen zu untersuchen, hat sich als sinnvolle Möglichkeit die Mikrosatellitenanalyse bzw. LOH-Analyse erwiesen (*Knowles et al.*, 1994). Beim Blasenkarzinom sind verschiedene Chromosomenarme häufig von Deletionen betroffen. Das Verfahren der komparativen Hybridisierung (CGH), das auf zytogenetischer Ebene rechnerassistiert alle Chromosomen des Genoms gleichzeitig analysiert, bestätigte die durch Mikrosatellitenanalyse (MSA) gewonnenen Daten und konnte zusätzliche tumorassoziierte chromosomale Regionen identifizieren. Dies sind neben anderen Regionen die Chromosomenarme 3p, 4p, 8p, 11p und 18q, welche mögliche Tumorgene beherbergen. Ebenfalls gestattet die CGH ohne größeren Aufwand die Untersuchung von in Paraffin eingebetteten, archivierten Tumormaterials. Unabhängig vom Tumorstadium ist die Region 4p16.3 in etwa 22% aller Harnblasenkarzinome deletiert. Der Locus befindet sich in enger Nachbarschaft zum Huntingtongen (*Elder et al.*, 1994; *Polascik et al.*, 1995). Fortgeschrittene, schlecht differenzierte Harnblasenkarzinome sind oft von 8p-LOH betroffen. Die per MSA-Kartierung eingegrenzten Loci (8p22-23) stimmen mit denen des Karzinoms der Prostata und der kolorektalen Karzinome überein (*Knowles et al.*, 1993; *Takle & Knowles*, 1996a; *Crundwell et al.*, 1996; *Chughtai et al.*, 1999; *Muscheck et al.*, 2000). Da in über 50% der Harnblasenkarzinome Chromosom-8p-LOH vorkommt und diese Alteration progressassoziiert ist, ist sie für weitere Untersuchungen zur Kanzerogenese dieses Tumors von großem Interesse. Bei bis zu 48, 40 und 10-40% der Harnblasentumoren wird LOH an den Chromosomen 3p, 11p und 14q gefunden (*Fearon et al.*, 1985; *Tsai et al.*, 1990; *Presti et al.*, 1991; *Shaw & Knowles*, 1995; *Chang et al.*, 1995; *Li et al.*, 1996). Die Arbeitsgruppe um Tzai konnte Verluste an 3p, 11p und 14q mit 16,9%, 31,0% bzw. 40,8% nachweisen (*Tzai et al.* 2003). Der Verlust von Chromosom 18q ist beim Harnblasentumor mit der Progression assoziiert (*Brewster et al.*, 1994). Da der Chromosomenarm 18q das DCC (Deleted in Colon Cancer), ein für kolorektale Karzinome wichtiges TSG, beherbergt, ist dieser von Interesse.

Auf Chromosom 20q13 ist das Gen Aurora A lokalisiert. Es ist auch unter den Bezeichnungen Aurora-2, BTAK und STK15 bekannt. Dies ist eine Serin-Threonin-Kinase, welche in Prozesse der Zytokinese und Zellteilung durch die Regulation der chromosomalen Regulation involviert ist. Diese Region ist bei vielen Organen/Geweben häufig von Aberrationen betroffen (*Bolanos-Garcia*, 2005). Das Aurora-A-Protein beeinflusst durch Wechselwirkungen mit den Mitose-Kontrollpunkt-Proteinen die Zellteilung. Im Rahmen der G1-Phase wird dieses

Protein degradiert bzw. inaktiviert. Wird diese Kinase überexprimiert, kommt es zu genetischer Instabilität und somit zur Tumorgenese (*Ke et al., 2003*). Eine Resistenz gegen die Taxol induzierte Apoptose wird durch eine Überexpression der Aurora-A-Kinase ausgelöst (*Bolanos-Garcia, 2005*). Zusätzlich ist Aurora A im p53-Pathway eine Schlüsselkomponente. Durch die Überexpression kommt es zur p53 Degradierung und somit eine Onkogentransformation erleichtert wird (*Katayama et al., 2004*). In kanzerösen Läsionen der Harnblase finden sich erhöhte Aurora-A-Expressionswerte. Es konnte eine Korrelation zwischen einer niedriggradigen Aurora-A-Amplifikation bei histologisch benigne wirkendem Urothel bei Harnblasenkrebspatienten und einem verminderten rezidivfreien und tumorspezifischen Überleben nachgewiesen werden (*Denzinger et al., 2007*).

Bislang wurden basierend auf molekulargenetischen Untersuchungen zwei Entstehungswege einer Progression des Urothelkarzinoms der Blase postuliert. Einer davon mündet in der Entstehung solider Tumoren. Diese Entwicklung ist mit dem Carcinoma in situ assoziiert. Das normale Urothel transformiert sich initial in Atypien/Dysplasien. Die nächste Veränderung führt zu in situ Karzinomen und letztlich zu invasiven Tumoren der Blase. Der Funktionsverlust von p53 ist hierbei die häufigste genetische Alteration. Der andere Weg führt über die oberflächlichen papillären, primär nicht invasiv wachsenden Tumore. Auch hier entstehen initial Atypien/Dysplasien des Urothels. Diese gehen in papilläre low-grade Karzinome über und münden schließlich in invasiven Karzinomen. Hier ist ein LOH an Chromosom 9 die häufigste Alteration. Diese beiden Wege existieren jedoch nicht streng nebeneinander, sondern können miteinander interagieren und sich überlappen. LOH an 9p/q waren häufig bei oberflächlichen high-grade Tumoren sowie bei invasiven Urothelkarzinomen zu beobachten. Dieser Sachverhalt ist mit beiden beschriebenen Entwicklungswegen nicht in Deckung zu bringen. Ein LOH an 9p/q kann beide Entstehungswege somit nicht erklären (*Mhaweck-Fauceslia et al. 2006*). Ein weiterer modifizierter Weg bezieht FGFR3 Mutationen mit ein. Eine Mutationsaktivierung von FGFR3 ist bei Patienten mit low-grade Tumoren bzw. Patienten mit niedrigem Tumorstadium und auch einer guten Prognose nachgewiesen worden (*Babaian et al. 2011; Martino et al. 2012*). Tumore mit p53 Mutation sind eher invasivere und aggressivere Tumore mit schlechter Prognose. In 80% aller Harnblasentumore können diese beiden Mutationen gefunden werden (*van Rhin et al. 2004*). Alle genetischen Veränderungen können nicht durch diese beiden Möglichkeiten abgebildet werden.

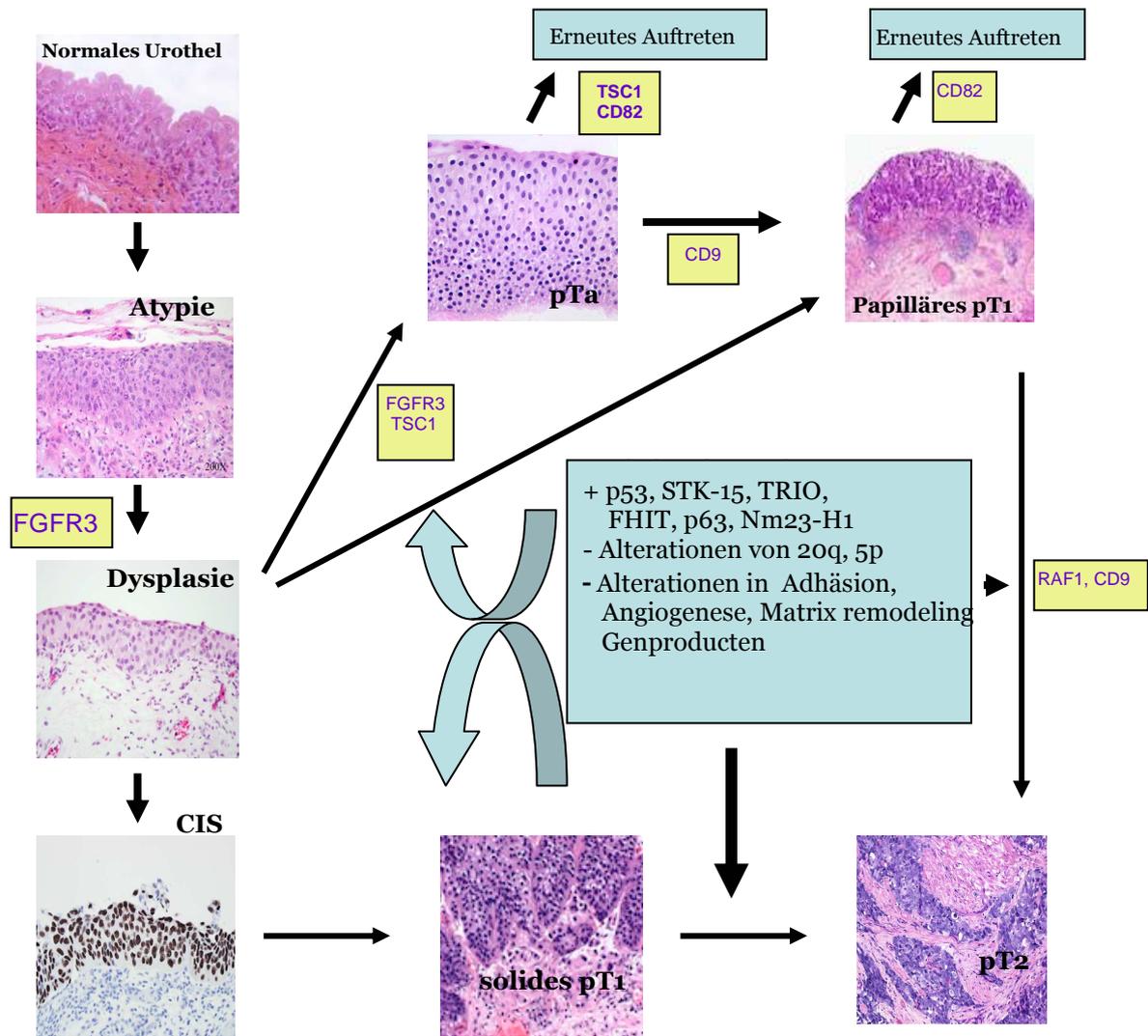
Die initiale Veränderung von normalem Urothel über eine Atypie zu einer Dysplasie scheint abhängig von FGFR3 zu sein. Anschließend gibt es drei verschiedene Wege:

1.) Ausgehend von einer Dysplasie entwickelt sich über einen oberflächlichen papillären pTa Tumor ein pT1 Tumor bis hin zu einem muskelinvasiv wachsenden pT2 Tumor.

2.) Ausgehend von einer Dysplasie entwickelt sich ein Carcinoma in situ und über einen minimal invasiven Tumor letztlich ein muskelinvasiver Tumor.

3.) Ausgehend von einer Dysplasie entwickelt sich ein papillärer pT1 Tumor und mündet im muskelinvasiven Tumor. (*Mhaweck-Fauceslia et al. 2006*).

Auch bei diesem Modell werden nicht alle möglichen Variationen berücksichtigt.



**Abbildung 05:** Möglicher Weg der Karzinogenese des Urothelkarzinoms der Harnblase (Mhawech-Faucezia et al. 2006)

## 1.2. Molekulargenetische Analyse

### 1.2.1. Mikrosatellitenanalyse (MSA)

Durch die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) wurden die molekularen Nachweismethoden revolutioniert. Der Chemiker Kary Mullis erhielt für diese 1983 entwickelte Technik 1993 den Nobelpreis für Chemie (*Mullis et al.* 1983). Über eine bestimmte Abfolge temperaturabhängiger enzymatischer Vorgänge kann man nun verschieden lange DNA-Sequenzen beliebig oft vervielfältigen. Die MSA basiert auf der PCR. Man kann Mikrosatelliten-DNA per PCR amplifizieren und danach gelelektrophoretisch auftrennen. Mikrosatelliten stellen sich als nicht-codierende chromosomale Loci dar, welche eine charakteristische repetitive Sequenzabfolge aufweisen, die sich als Di-, Tri- oder Tetranukeotidrepeats darstellen (z.B. CA-Repeat, ATA-Repeat bzw. GATA-Repeat). Die Anzahl der Wiederholungen dieser charakteristischen Sequenzabfolgen ist sehr variabel. Die Repeats sind somit polymorph. Dies bedeutet, dass ein Mikrosatellitenlocus heterozygot ist, wenn ein Unterschied zwischen den paternen und maternen Repeats besteht. Demgegenüber spricht man von einem homozygoten Locus des untersuchten Mikrosatelliten, wenn die Anzahl der Wiederholungen auf beiden Allelen gleich ist. Daraus leitet sich der Begriff „Loss of Heterozygosity“ (LOH) ab. Damit wird zum Beispiel der Verlust eines Allels durch Deletion des untersuchten heterozygoten chromosomalen Abschnitts beschrieben. Eine Analyse des Locus ist nur bei heterozygoten („informativen“) Fällen möglich. Dabei beträgt die Heterozygotierate der Mikrosatelliten ungefähr 70 - 90% aller untersuchten Individuen. Die Zuordnung der Allele ist bei dieser Methode möglich. Heterozygote Fälle stellen sich nach gelelektrophoretischer Trennung durch die PCR-amplifizierten Mikrosatelliten als charakteristische Doppelbanden dar. Zur Sequenzierung stehen Lasergeräte zur Verfügung, die die fluoreszierenden PCR-Produkte sowohl qualitativ als auch quantitativ abbilden können (vgl. Abb. 10).

Durch die MSA können im Bereich der onkologischen Molekulargenetik sowohl Verluste genetischen Materials, im Sinne von Deletion oder LOH, als auch das Hinzukommen genetischen Materials, z.B. Duplikationen, Amplifikationen oder Trisomien, und des weiteren ebenfalls Längeninstabilitäten eines Mikrosatelliten, so genannte „microsatelliteinstability“, nachgewiesen werden. In den heterozygoten Fällen gelingt der Nachweis von Veränderungen jedoch nur dann, wenn eine unveränderte, gesunde „Normal-DNA“ vorliegt und parallel untersucht wird. Diese

gewinnt man meistens aus Lymphozyten einer Vollblutprobe. Abweichungen im DNA-Gehalt der jeweiligen Allele zueinander im Vergleich zur Normal-DNA bezeichnet man als allelische Imbalanz (AI). Knowles et al. führten mit jeweils nur zwei Mikrosatelliten pro Chromosomenarm eine Allelotypisierung des Harnblasenkarzinoms durch (Knowles et al., 1994). Die Mikrosatelliten liegen auf den Chromosomen verteilt vor, so dass man sich diese Tatsache zur „Kartierung“ („mapping“) zunutze machen kann, wenn für das untersuchte Chromosom mehrere Mikrosatellitenmarker verwendet werden (Cairns et al., 1993; Bohlander et al., 1994; Cairns et al., 1995; Habuchi et al., 1995; Wilhelm et al., 1995; Takle & Knowles, 1996a; Chudek et al., 1997; Habuchi et al., 1997; Nishiyama et al., 1999; Ohgaki et al., 1999; Simoneau et al., 1999). Diese Kartierungsversuche mittels der Mikrosatelliten sind die nötigen ersten Schritte zur Klonierung neuer Tumorgene. So konnte beim Harnblasenkarzinom auf Chromosomenarm 9q eine Region soweit eingegrenzt werden, dass es gelang, ein potentiell Tumorsuppressorgen zu identifizieren (Latif et al., 1993; Habuchi et al., 1998).

Die MSA kann auch zum Nachweis von DNA-Alterationen in Körperflüssigkeiten genutzt werden. Dies ist möglich, weil nur geringe Mengen der zu amplifizierenden DNA notwendig sind (Coulet et al., 2000). So gelang es, Alterationen im Serum beim Nierenzellkarzinom nachzuweisen (von Knobloch et al., 2002). Auch konnte mit einer hohen Sensitivität und Spezifität bei betroffenen Patienten mit einem Harnblasenkarzinom der Tumornachweis anhand des Urins geführt werden (Mao et al., 1996; Steiner et al., 1997; Mourah et al., 1998). Die erzielten Ergebnisse waren stadienunabhängig (von Knobloch et al., 2004). Andere Arbeitsgruppen konnten diese guten Ergebnisse nicht reproduzieren. Eine geringe Anzahl an Mikro-satellitenmarkern und die geringe Patientenzahl kann dafür ausschlaggebend sein. Zusätzlich waren diese Ergebnisse nicht stadienunabhängig (Szarvas et al., 2007). Auch der serologische Tumornachweis ist bei verschiedensten Tumorentitäten möglich (Chen et al., 1996; Nawroz et al., 1996; Hibi et al., 1998; Sozzi et al., 1999; Shaw et al., 2000). Goessel gelang unter Einsatz von nur 4 Mikrosatellitenmarkern erstmals bei einem Nierenzellkarzinom als erstem urologischem Tumor der Nachweis von Alterationen der Tumor-DNA im Plasma (Goessl et al., 1998). In Abhängigkeit von der Zahl der eingesetzten Mikrosatelliten erreicht man Sensitivitätswerte von ~ 70% bei 100% Spezifität. Diese Arbeiten zeichnen sich jedoch durch sehr geringe Populationen an Tumorpatienten aus und zusätzlich wurden nur wenige gesunde Probanden, meist nicht mehr als 10, zur Beurteilung der Spezifität getestet. Außerdem muss man bei

geringen DNA-Konzentrationen (<100 ng/ml) mit falsch-positiven PCR-Artefakten rechnen (Coulet *et al.*, 2000).

### 1.2.2. DNA-Sequenzierung

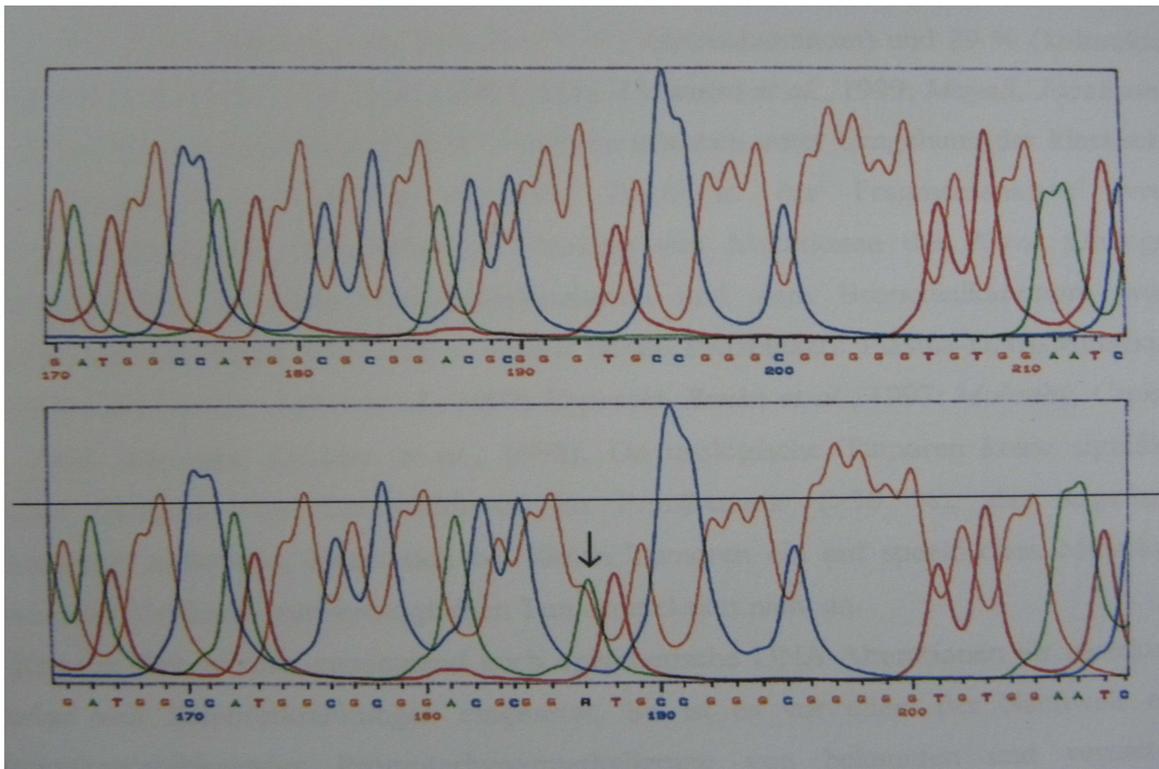
Zur Sequenzierung des Genoms schlüsselt man die molekulare Struktur der DNA-Stränge auf. Dabei identifiziert man die Reihenfolge der vier DNA-Basen Adenosin (A), Cytidin (C), Guanosin (G) und Thymin (T). Weil die DNA eine Doppelstrang-Helix mit zwei komplementären DNA-Strängen aufweist, können beide DNA-Sequenzen sequenziert werden. Komplementäre Basenpaare bilden A-T und C-G. Sequenziert werden die PCR-Produkte nach gelelektrophoretischer Auftrennung durch rechnerassistierte Automaten, indem diese die Fluoreszenzmarkierung erkennen. Beispielfhaft wird in Abbildung 06 eine aufgeschlüsselte DNA-Sequenz des p53 Tumorsuppressorgens mit einer Punktmutation einer Base dargestellt. Dies führt zu einem verändertem Genprodukt, wenn im Rahmen der Knudson'schen Zwei-Treffer-Theorie das andere Allel des Gens durch eine Deletion inaktiviert worden sein sollte (Abb. 1).

Im ras Onkogen gelang 1982 erstmals der Nachweis einer Punktmutation in einer Blasenkarzinomzelllinie (Tabin *et al.*, 1982). Neun Jahre später konnte Sidransky *et al.* eine Assoziation von p53-Mutationen mit invasiven Blasenkarzinomen nachweisen. Bei 1-7% der am Blasenkarzinom erkrankten Patienten konnten in dieser Studie die gleiche p53-Mutation nachgewiesen werden (Sidransky *et al.*, 1991). Mitra *et al.* konnten 2007 die Funktion von p53 in Verbindung mit dem Retinoblastoma Gen nachweisen (Mitra *et al.*, 2007).

Erstmals gelang die Identifikation tumorspezifischer DNA-Alterationen im Urin und somit in einer Körperflüssigkeit. Durch die Gensequenzierung konnte zum Beispiel das für Nierenzellkarzinome spezifische VHL Gen sowie ein auf 3p lokalisiertes Tumorgen identifiziert werden (Latif *et al.*, 1993; Hanke *et al.*, 2001). Sorensen *et al.* konnten 1994 erstmals mutierte Sequenzen des K-ras Onkogens im Plasma von 3 an einem Pankreaskarzinom erkrankten Patienten nachweisen (Sorensen *et al.*, 1994). Mutationen von p53 konnten im Plasma von Patienten mit kleinzelligen Bronchialkarzinomen, Mammakarzinomen und kolorektalen Karzinomen nachgewiesen werden. Jedoch fanden sich nur sehr geringe Detektionsraten von 5% beim Mammakarzinom und 29% bei den kolorektalen Karzinomen (Mayall *et al.*, 1998; Silva *et al.*, 1999; Gonzalez *et al.*, 2000). In der Fragmentanalyse können mutationsspezifische PCR-Verfahren ohne die klassische

Sequenzierung mutierte DNA nachweisen (vgl. Mikrosatellitenanalyse). Aufgrund des häufigen Vorliegens von Mutationen des K-ras Onkogens (Codons 12-13) bei gastrointestinalen Tumoren und dem Bronchialkarzinom konnte anhand dieser Methode ein hoher Prozentsatz an Plasma-DNA-Mutationen nachgewiesen werden (*Mulchay et al., 1996; Anker et al., 1997; Kopreski et al., 1997; Mulcahy et al., 1998*). Urologische Tumore weisen keine signifikant erhöhte Inzidenz von Genmutationen im Primärtumor auf (>30%). Aufgrund des Fehlens dieses „Clusterings“ bietet sich ein auf spezifischen Mutationen basierendes Verfahren zur serologischen Tumordetektion nicht an.

Auch epigenetische DNA-Alterationen können als molekulare Marker von Tumorerkrankungen verwendet werden. Als genetischer Marker dient der Nachweis einer expressionsinhibierenden Promoterhypermethylierung von bereits identifizierten und vermuteten (englisch: „putative“) Tumorsuppressorgenen (*Herman et al., 1995; Merlo et al., 1995; Herman et al., 1996; Herman et al., 1996; Esteller et al., 1999; Esteller et al., 2000; Verkaik et al., 2000; Brabender et al., 2001; Cui et al., 2001; Dong et al., 2001; Habuchi et al., 2001; Kito et al., 2001; Lin et al., 2001; Rosas et al., 2001*). Die Promoterhypermethylierung von CpG Inseln ist mit der Entstehung und auch der Prognose des Harnblasenkarzinoms assoziiert. Marker einer solchen Methylierung könnten zukünftig als nicht invasive Diagnostik eine Zytologie und eine invasive Zystoskopie ergänzen (*Kim et al., 2008; Kim et al., 2008*).



**Abbildung 06:** Sequenzierungsergebnis des Exons 7 des Tumorsuppressorgens p53 mit einer Punktmutation (Basenaustausch von Guanodin gegen Adenin $\downarrow$ ). Die Sequenzierung wurde mit dem Lasersequenzierungsgerät ALFexpress der Firma Amersham-Pharmacia Biotech durchgeführt (Beispiel aus der Produktinformation des Herstellers).

## 1.3. Tumormarker

### 1.3.1. Konventionelle Tumormarker

Für das muskelinvasive Harnblasenkarzinom stehen nach einer erfolgten chirurgischen Intervention keine zuverlässigen serologischen Tumormarker zu Verfügung, welche idealerweise eine okkulte Mikrometastasierung detektieren könnten, bevor über bildgebende Verfahren eine Filialisierung manifest wird. Eine Metastasendiagnose lässt sich in der Nachsorge mittels bildgebender Verfahren ausschließlich bei makroskopischer Metastasierung mit hoher Zellzahl nachweisen. Bei Patienten mit einem oberflächlichen Urothelkarzinom nach stattgehabter organerhaltender transurethraler Resektion ist es möglich, ein Rezidiv anhand einer Urinzytologie mit hoher Sicherheit zu identifizieren. Die Sensitivität dieser Methode variiert allerdings abhängig vom Tumordifferenzierungsgrad (17 bis 96%). Bei G1 Tumoren beträgt sie nur 17 bis 38% (*Wiener et al.*, 1998), bei G2 Tumoren 75-80% und bei G3 Tumoren 85-95%. Cis wird mit 95% Sensivität mittels Zytologie erkannt. Die Spezifität ist insgesamt hoch. (*Rübben et al.*, 1979; *Koss et al.*, 1985; *Murphy et al.*, 1990; *Wiener et al.*, 1993; *Gregoire et al.*, 1997; *Murphy et al.*, 1997; *Glas et al.*, 2003).

Ein Tumormarker für die jeweilige Krebserkrankung ist ideal, wenn er neben einer hohen Sensitivität ebenfalls eine hohe Spezifität aufweist. Da die meisten zur Verfügung stehenden serologischen Tumormarker in der Spezifität Einschränkungen aufweisen, sind sie in der Primärdiagnostik bei Risikopopulationen als Screeningdiagnostik nicht einsetzbar (*Klavins*, 1983a; *Klavins*, 1983b; *Bates*, 1991). Das prostataspezifische Antigen (PSA) stellt bei urologischen Tumoren darin eine Ausnahme dar (*Oesterling*, 1991a; *Oesterling*, 1991b; *Labrie et al.*, 1999). Prostatakarzinome können aufgrund des PSA-Screenings in frühen, organbegrenzten Stadien diagnostiziert werden und entweder einer abwartenden Therapie (active surveillance) bzw. einer kurativen Therapie zugeführt werden. Bei vielen anderen Tumorentitäten können unterschiedliche konventionelle serologische Marker in der Früh- und Nachsorgediagnostik angewendet werden. Sie bestehen meist aus löslichen Glykoproteinen (*von Kleist*, 1980; *Bates*, 1991; *Lamerz et al.*, 1993; *Ferrigno et al.*, 1994; *Rassekh et al.*, 1994; *Bosl & Chaganti*, 1994; *Taylor & Schwartz*, 1994; *Grem*, 1997). Für das Harnblasenkarzinom stehen derzeit keine zuverlässigen serologischen Marker zur Verfügung. Die Erschließung neuer Methoden zur nicht-invasiven und von morphologischen Kriterien

unabhängigen Frühdiagnostik der Tumoren des Harntraktes ist somit von großer klinischer Bedeutung. Marker der Frühdiagnostik könnten auch verlässlich bei diesen Tumoren in der Verlaufskontrolle zur Beurteilung des Therapieerfolges eingesetzt werden.

### **1.3.2. Molekulare Tumormarker**

#### **1.3.2.1. mRNA-basierter Nachweis zirkulierender Tumorzellen**

Smith gelang es 1991 erstmals beim malignen Melanom zirkulierende Tumorzellen im Blut nachzuweisen (*Smith et al.*, 1991). In den folgenden Jahren gelang dies auch bei den meisten anderen Tumoren (*Smith et al.*, 1991; *Brossart et al.*, 1994; *Castaldo et al.*, 1997; *Castaldo et al.*, 1997; *Peck et al.*, 1998; *Bostick et al.*, 1998; *Wyld et al.*, 1998). Bei den Tumoren des urologischen Fachbereichs ist das Prostatakarzinom am intensivsten untersucht worden (*Moreno et al.*, 1992; *Olsson et al.*, 1997; *Ennis et al.*, 1997). Bereits 1992 konnten zirkulierende Tumorzellen nachgewiesen werden (*Moreno et al.*, 1992). In Abhängigkeit vom Tumorstadium konnten Detektionsraten von bis zu 90% erzielt werden. Für das Harnblasenkarzinom liegen ebenfalls Ergebnisse vor (*Fujii et al.*, 1999; *Retz et al.*, 2001). Beim Urothelkarzinom der Harnblase ist in diesem Zusammenhang die Expressierung von Cytokeratinen der epithelialen Zellen von entscheidender Bedeutung. Ashida gelang bei einer Gruppe von 20 Nierenzellkarzinomen mit bestätigter VHL-Gen-Mutation der Nachweis zirkulierender Tumorzellen (*Ashida et al.*, 2000). Diese zirkulierenden Tumorzellen wurden mittels der Reversen Transkriptase PCR (RT-PCR) bei der Analyse von mRNA nachgewiesen. Als Transcript wird beim Harnblasenkarzinom Cytokeratin-20, beim Prostatakarzinom die PSA- oder PSMA-(prostataspezifische Membranantigen) und beim Nierenzellkarzinom die VHL-Mutation genutzt. Jedoch resultieren häufig falsch-positive Ergebnisse, da trotz hoher Sensitivität der „charakteristischen“ mRNA die Nachweisverfahren weder organ- noch tumorspezifisch sind. Somit konnte diese Methode nicht als Standarddiagnostikum bei den oben genannten urologischen Tumoren etabliert werden. Eine weitere Strategie ist der submikroskopische Nachweis von positiven chirurgischen Absetzungsrändern (d.h.: Tumorzellnachweis an der Schnittkante) zur Beurteilung eines Lokalrezidivrisikos, zur Beurteilung einer lymphogenen Metastasierung in entnommenen Lymphknoten

oder im Knochenmark zur Risikoabschätzung einer hämatogenen Metastasierung (*Theodorescu et al.*, 1999; *Retz et al.*, 2001; *Straub et al.*, 2001).

Aus dem Urin können in größerer Anzahl abgeschilferte Zellen in der zytologischen Aufarbeitung nachgewiesen werden. Die Sensitivität kann hier signifikant erhöht werden durch den mRNA basierten Nachweis, weil Tumor- zu Normalzelle im Verhältnis 1 :  $10 \times 10^6$  stehen müssen. Für Karzinome des Übergangsepithels des Harntraktes sind zahlreiche Studien über den Nachweis von Tumorzellen anhand von Telomerase und Cytokeratin-20 (CK-20) erschienen (*Müller et al.*, 1998; *Buchumensky et al.*, 1998; *Klein et al.*, 1998; *Rotem et al.*, 2000; *Bialkowska-Hobrzanska et al.*, 2000; *Cassel et al.*, 2001). Der RNA-basierte Telomerasenachweis ist der früheren Bestimmung der Telomeraseaktivität mittels TRAP-Test (telomeric repeat amplification protocol) überlegen (*Linn et al.*, 1997; *Müller et al.*, 1998). Allerdings geht die Spezifität aufgrund hoher falsch-positiver Ergebnisse bei dem Telomerase- und CK-20-abhängigen Tumorzellnachweis zurück (*Bialkowska-Hobrzanska et al.*, 2000; *Cassel et al.*, 2001).

### **1.3.2.2. DNA-basierter Nachweis zellgebundener Tumor-DNA**

Zellgebundene DNA wird im Blut oder anderen Körpersekreten durch den Nachweis genetischer Alterationen am Tumorgewebe identifiziert. Durch solche Verfahren konnten genetische Klassifikationen aufgestellt werden, da die Zusammenhänge der malignen Tumorentstehung dargelegt wurden (*Knudson, Jr. & Strong*, 1972; *Fearon & Vogelstein*, 1990; *Sidransky et al.*, 1992; *Dalbagni et al.*, 1993; *Dalbagni et al.*, 1993; *Spruck et al.*, 1994; *Sandberg & Berger*, 1994; *Bugert & Kovacs*, 1996; *Steiner & Sidransky*, 1996; *Kovacs et al.*, 1997; *Störkel et al.*, 1997; *Birch et al.*, 1998). 1991 identifizierten Sidransky et al. in einer der Pionierarbeiten zum molekularen Nachweis von Tumor-DNA in Körpersekreten die p53-Genmutationen im Urin von Blasenkarzinompatienten (*Sidransky et al.*, 1991). Durch die auf DNA-Alterationen basierende Methode der MSA konnte der Nachweis eines Harnblasentumors im Urin weiter verfeinert werden (*Mao et al.*, 1996; *Linn et al.*, 1997; *Steiner et al.*, 1997; *Mourah et al.*, 1998; *Baron et al.*, 2000; *Christensen et al.*, 2000; *Schneider et al.*, 2000). Eisenberger et al. gelang ebenfalls die Diagnose eines Nierenzellkarzinoms im Urin mittels der MSA (*Eisenberger et al.*, 1999).

Auch in anderen Körpersekreten können abgeschilferte Zellen durch die Identifikation tumorspezifischer Alterationen nachgewiesen werden. Zur Diagnose

kolorektaler Karzinome kann Stuhl (*Ratto et al.*, 1996; *Nollau et al.*, 1996; *Ahlquist et al.*, 2000), Duodenalsaft zur Diagnose von Pankreaskarzinomen (*Tada et al.*, 1993), Peritoneallavage zur Diagnose von Ovarialkarzinomen (*Hickey et al.*, 1999), Sputum zur Diagnose von Tumoren des Mund- und Rachenraumes sowie Bronchialkarzinomen (*Takeda et al.*, 1993; *Boyle et al.*, 1994; *Miozzo et al.*, 1996; *Fliss et al.*, 2000) und Liquor zur Diagnose neurologischer Tumoren eingesetzt werden. Dabei können DNA-Alterationen in Körpersekreten bereits Jahre vor einem Auftreten morphologisch fassbarer Tumorerkrankungen bzw. in frühen klinischen Stadien nachgewiesen werden (*Mao et al.*, 1994; *Wakabayashi et al.*, 1996; *Steiner et al.*, 1997; *Eisenberger et al.*, 1999; *Palmisano et al.*, 2000; *Kersting et al.*, 2000). Im Screening von Risikopopulationen haben die methodisch sehr aufwendigen DNA gestützten Analyseverfahren ein Potential zur Früherkennung der jeweiligen Tumorerkrankung.

### **1.3.2.3. DNA-basierter Nachweis zellfreier Tumor-DNA in Serum und Plasma**

Die DNA zirkuliert in fragmentierter Form frei im Blut und liegt nicht nur als chromosomale DNA des Zellkerns vor. Für den Nachweis dieser frei zirkulierender Serum- oder Plasma-DNA mit tumorspezifischen Alterationen (sozusagen Tumormarker) existieren heutzutage molekulare Detektionstechniken. Mandel und Metais wiesen erstmals 1948 freie Nukleinsäuren im Plasma nach (*Mandel & Metais*, 1948). Leon et al. identifizierten rund 30 Jahre später erhöhte Serum-DNA-Konzentrationen onkologischer Patienten. Nach erfolgter Therapie konnten sie einen Rückgang der DNA-Konzentrationen nachweisen (*Leon et al.*, 1977). Allerdings wurden auch bei benignen Grunderkrankungen erhöhte DNA-Konzentrationen gefunden (*Tan et al.*, 1966; *Koffler et al.*, 1973; *Leon et al.*, 1977). Als ein Herkunftsort dieser freien „normalen“ DNA konnten die Lymphozyten identifiziert werden (*Anker et al.*, 1975; *Jachertz et al.*, 1979). 1989 gelang es der Arbeitsgruppe von Stroun, tumorspezifische Charakteristika in Plasma-DNA von Tumorpatienten nachzuweisen (*Stroun et al.*, 1989). Diese Ergebnisse konnten 5 Jahre später von den Arbeitsgruppen um Sorenson bzw. Vasioukhin bestätigt werden (*Sorenson et al.*, 1994; *Vasioukhin et al.*, 1994). Der entscheidende Durchbruch zur Detektion tumorspezifischer Serum- und Plasma-DNA-Alterationen gelang erst mit Hilfe der MSA 1996 den Arbeitsgruppen von Chen et al. (kleinzelliges Bronchialkarzinom) und Nawroz et al. (Tumoren des Kopf-Hals-

Bereiches) (*Chen et al., 1996; Nawroz et al., 1996; Boland, 1996*). Als erster urologischer Tumor konnte die Berliner Arbeitsgruppe um Goessl beim „hellzelligem“ Nierenzellkarzinom tumorspezifische Plasma-DNA-Alterationen mit nur 4 Mikrosatellitenmarkern des Chromosoms 3p bei 40 Patienten nachweisen (*Goessl et al., 1998; Goessl, 2000*). Die Arbeitsgruppe um Sidransky bestätigte im darauf folgenden Jahr diese Ergebnisse. Zusätzlich gelang auch der Nachweis, mit den gleichen Mikrosatellitenmarkern tumorspezifische Alterationen auch im Urin der Patienten nachzuweisen (*Eisenberger et al., 1999*). Goessl et al. konnten ebenfalls durch den Nachweis einer GSTP1-Promoterhypermethylierung beim Prostatakarzinom einen Tumornachweis nicht nur im Plasma, sondern auch im Ejakulat und Exprimaturin der Tumorpatienten stellen. Die Sensitivität lag bei 70% (*Goessl et al., 2000; Goessl et al., 2001*). Cairns et al. konnten mit dieser Methode einen Tumornachweis bei 27% der Urinproben von 22 Prostatakarzinompatienten erzielen (*Cairns et al., 2001*).

Der Nachweis von DNA-Alterationen im Plasma ist ein sehr sensitives Verfahren. Man benötigt lediglich Konzentrationen von 10 bis 30 ng/ml bei gesunden Probanden bzw. 180 bis 400 ng/ml bei Karzinompatienten an frei zirkulierender DNA, was allerdings die Möglichkeit von PCR-Artefakten steigert (*Steinmann, 1975; Leon et al., 1975; Leon et al., 1977; Shapiro et al., 1983*). Mit der MSA können Alterationen im Serum bis zu einem Verhältnis von 0,5% Tumor- zu Normal-DNA nachgewiesen werden (*Coulet et al., 2000*). Die Freisetzung normaler DNA beim Gerinnungsprozess erklärt die höheren Konzentrationen im Serum (*Jen et al., 2000*). Eine Assoziation zwischen dem serologischen Nachweis tumorspezifischer DNA-Alterationen und dem Tumorstadium ist in den meisten Studien nicht beschrieben worden (*Goessl et al., 1998; Sozzi et al., 1999; Silva et al., 1999*). Ein klinischer Vorteil dieser Tatsache ist der Nachweis auch früher klinischer Stadien oder sogar klinisch inapparenter Tumore. Allerdings gestattet diese Methode keine Aussage über die Prognose. Jedoch bestehen Möglichkeiten, den Krankheitsverlauf zu beurteilen oder die Frühdiagnose von Rezidiven zu stellen, bevor sie in bildgebenden Verfahren beschrieben werden können (*Mulcahy et al., 1998; Sozzi et al., 2001*).

#### **1.3.2.4. Zirkulierende Tumor-RNA und virale DNA**

Es gelang zudem der tumorspezifische Nachweis von freier RNA im Serum bei onkologischen Patienten (*Kopreski et al., 1997; Chen et al., 2000*). Auch der

Nachweis freier Virus-DNA bei virusassoziierten Tumorleiden konnte als Marker detektiert werden (*Lo et al.*, 1999; *Shotelersuk et al.*, 2000; *Capone et al.*, 2000; *Pornthanaksem et al.*, 2001).

## 2. Zielsetzung und Fragestellung

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, beim Transitionalzellkarzinom der Harnblase durch molekulare Analysen progressionsassoziierte Marker zu identifizieren und einen DNA basierten Nachweis tumorspezifischer Alterationen in Serum und Urin zur Anwendung als serologische und uringestützte Tumordiagnostik zu führen. Dazu wurden durch Anwendung der Mikrosatellitenanalyse und der unterstützenden Anwendung zytogenetische Methoden untersucht:

- Anwendung der Mikrosatellitenanalyse zur Allelotypisierung des Marburger Krankengutes an Harnblasenkarzinompatienten.
- Können progressionsassoziierte chromosomale Regionen identifiziert werden?
- Anwendung der Mikrosatellitenanalyse zur Detektion von Serum-DNA- und Urin-DNA-Alterationen.
- Wie hoch ist die Sensitivität der Methode für die Serum- und Urin-Diagnose beim Harnblasenkarzinom?
- Sind die identifizierten Serum-DNA- und Urin-DNA-Alterationen tumorspezifisch?
- Korreliert der Nachweis von Serum-DNA- oder Urin-DNA-Alterationen mit Tumorstadium und Kerndifferenzierung des Primärtumors?
- Identifikation von Mikrosatellitenmarkern mit höchster Sensitivität für die Serum- und Urin-Diagnose.
- Vergleich der Ergebnisse der verwendeten 10 Marker mit den Ergebnissen der Vorarbeiten von von Knobloch mit 17 Markern (*von Knobloch et al., 2002*).

### 3. Material und Methoden

#### 3.1. Geräte, Material und Lösungen

##### 3.1.1. Geräte

- Probengewinnung:           - Mikrozentrifuge:   - Biofuge tresco, *Fa. Heraeus Instruments/Osterode/Deutschland*
- Minifuge T, *Fa. Heraeus Instruments/Osterode/Deutschland*
- DNA-Extraktion:           - Mikrozentrifuge: s.o.
- Vortexer, *Fa. Merck Eurolab/Darmstadt/Deutschland*
- DNA-Messung:              - UV-Photometer: GeneRay, *Fa. Biometra / Göttingen/Deutschland*
- PCR-Amplifikation:       - PTC 100 Thermocycler, *Fa. MJ Research, Watertown, Massachusetts, USA*
- Mikrosatelliten-Analyse:  - ALFexpress II®, *Fa. Amersham Pharmacia Biosciences/ Freiburg/Deutschland*
- Fragment-Manager-Software: FM 1.2, *Fa. Amersham Pharmacia Biosciences/Freiburg/Deutschland*
- *ReproSet, Fa. Amersham Pharmacia Biosciences/ Pharmacia Biosciences/Freiburg/Deutschland*
- Sonstiges:                 - EDTA-Vollblut Monovetten
- Serum Monovetten
- Greiner-Röhrchen (50ml / klein / groß)
- Pasteurpipette /Pipetten
- Petrischale
- 15 ml Zentrifugenröhrchen
- 2 ml Collection Tube
- Küvette
- Mikrotiter-PCR-Platte: 96 V-MT-Platte mit Deckel

### 3.1.2. Material

#### a) verwendete Kits

- DNA-Extraktion:
- QIAamp DNA Blood Midi Kit, *Fa. Qiagen/Hilden/Deutschland*
  - QIAamp DNA Body Fluid Spin Mini Kit, *Fa. Qiagen/Hilden/Deutschland*

#### b) Chemikalien

- Lysis-Puffer *Fa. Riedel de Haen/Seelze/Deutschland*
- TE-9-Puffer (0,5 mM Tris-Cl, pH 9; 0,1 mM EDTA)
- SDS 10% (Natriumdodysulfut), *Fa. Gibco/Glasgow/Schottland*
- Proteinkinase K (10 mg/ml), *Fa. Sigma-Aldrich/Deisenhofen/Deutschland*
- Phenol, *Fa. Roth/Karlsruhe/Deutschland*
- Chloroform, *Fa. Riedel de Haen/Seelze/Deutschland*
- ETOH (100%), *Fa. Riedel de Haen/Seelze/Deutschland*
- TE-1-Puffer (10mM Tris, pH 7,5; 1 mM EDTA)
- SDS 2%, *Fa. Gibco/Glasgow/Schottland*
- AW 1-Puffer, *Fa. Qiagen/Hilden/Deutschland*
- AW 2-Puffer, *Fa. Qiagen/Hilden/Deutschland*
- Ethanol (96-100%), *Fa. Riedel de Haen/Seelze/Deutschland*
- Qiagen Protease, *Fa. Qiagen/Hilden/Deutschland*
- AL-Puffer, *Fa. Qiagen/Hilden/Deutschland*
- DNA Carrier (5,6 µl/2ml; Salmon Testes sonicated DNA, *Fa. Amersham Pharmacia Biosciences/Freiburg/Deutschland*)
- AE-Puffer, *Fa. Qiagen/Hilden/Deutschland*
- Qiagen Protease Stock Lösung, *Fa. Qiagen/Hilden/Deutschland*
- Protease Lösungsmittel (Nuklease freies Wasser versetzt mit 0,04% sodium acid), *Fa. Qiagen/Hilden/Deutschland*
- Tris-Cl, *Fa. Roth/Karlsruhe/Deutschland*
- EDTA
- Sodium Acid
- KCl, *Fa. Roth/Karlsruh/Deutschland*

- MgCl<sub>2</sub>, Fa. Roth/Karlsruhe/Deutschland
- Forward-Primer
- Reverse-Primer
- dNTPs , Fa. Amersham Pharmacia Biosciences/Freiburg/Deutschland
- Taq DNA Polymerase, Fa. Invitrogen Corporation/Karlsruhe/Deutschland
- Stop-Lösung (50 mM EDTA; 5 mg/ml Dextran Blau 2000 in 100% deionisiertem Formamid)
- Dextran Blau 2000
- Formamid 100%
- Bindeselekt: plus One, Fa. Amersham Pharmacia/Biosciences /Freiburg/Deutschland
- TBE-Puffer (5xTBE) (30,75g Tris; 128,4g Borsäure; 9,3g EDTA, pH 8,3; 27ml 25% HCl)
- Tris
- Borsäure, Fa. Fisher Scientific/Dreieich/Deutschland
- Polyacrylamid-Gel

### **3.2. Tumoren**

Für diese Arbeit wurden bei insgesamt 267 Patienten zwischen 2001 und 2003 in der Urologischen Klinik des Klinikums der Philipps-Universität Marburg im Rahmen der operativen Sanierung ihres Harnblasentumors prospektiv Blut, Urin und eine intraoperativ entnommene repräsentative Tumorprobe asserviert. Durch multiple Ausschlusskriterien wurden letztlich 117 Tumorproben, 112 Serumproben und 75 Urin-Sediment-Proben zur Auswertung eingebracht. Zu diesen Ausschlusskriterien gehörten zum Beispiel die Ablehnung der Patientin/des Patienten, das histologische Ergebnis ohne Tumornachweis oder vor allem nicht verwertbare Testergebnisse. So konnten Tumore von insgesamt 117 Patienten genetisch charakterisiert werden. Davon waren 96 Patienten/männlich und 21 Patientinnen/weiblich. Das Alter bei Operation lag im Median bei 69 Jahren (45 bis 93 Jahre). Die histopathologische Einteilung erfolgte am Hauptpräparat nach der TNM-Klassifikation der UICC von 2002 durch das Pathologische Institut der Philipps-Universität Marburg (*Sobin & Wittekind, 2002*). 2004 wurde für die Beurteilung der Kerndifferenzierung eine neue Einteilung gewählt. Man unterscheidet nicht mehr zwischen G1-G3(4) Tumore, sondern teilt in low-grade und high-grade Tumore ein (*Lindemann-Docter et al., 2008; Knüchel et al., 2009*).

Da die histopathologische Auswertung der in dieser Arbeit verwendeten Tumorproben alle vor 2004 erfolgt sind und die G-Stadien nicht 1:1 in die neue Einteilung übertragen werden können, wird in dieser Arbeit weiter die alte Klassifikation verwendet. Die Stadieneinteilung der 117 Tumoren ist in der Tabelle 04 und in den Abbildungen 07 und 08 (siehe unten) dargestellt.

**Tabelle 04:** Einteilung der Harnblasenkarzinome anhand der TNM-Klassifikation der UICC (*Sobin, Wittekind, 2002*)

Stadium	G1	G2	G3(+G4)	-	Gesamt
pTa	18	22	0	0	40
pTis	0	0	0	1	1
pT1	3	17	8	0	28
pT2	0	8	14	0	22
pT3	0	2	15	0	17
pT4	1	1	6	0	8
Adenokarzinom	0	0	0	1	1
Gesamt	22	50	43	2	-

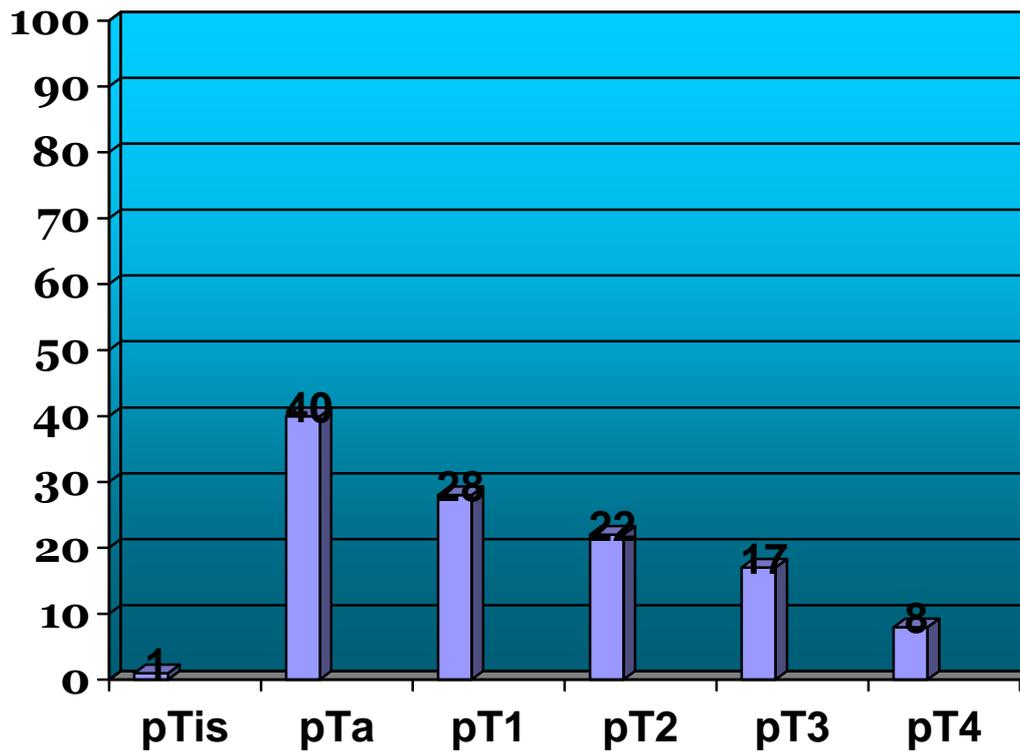


Abbildung 07: Graphische Darstellung der Verteilung der TNM-Einteilung

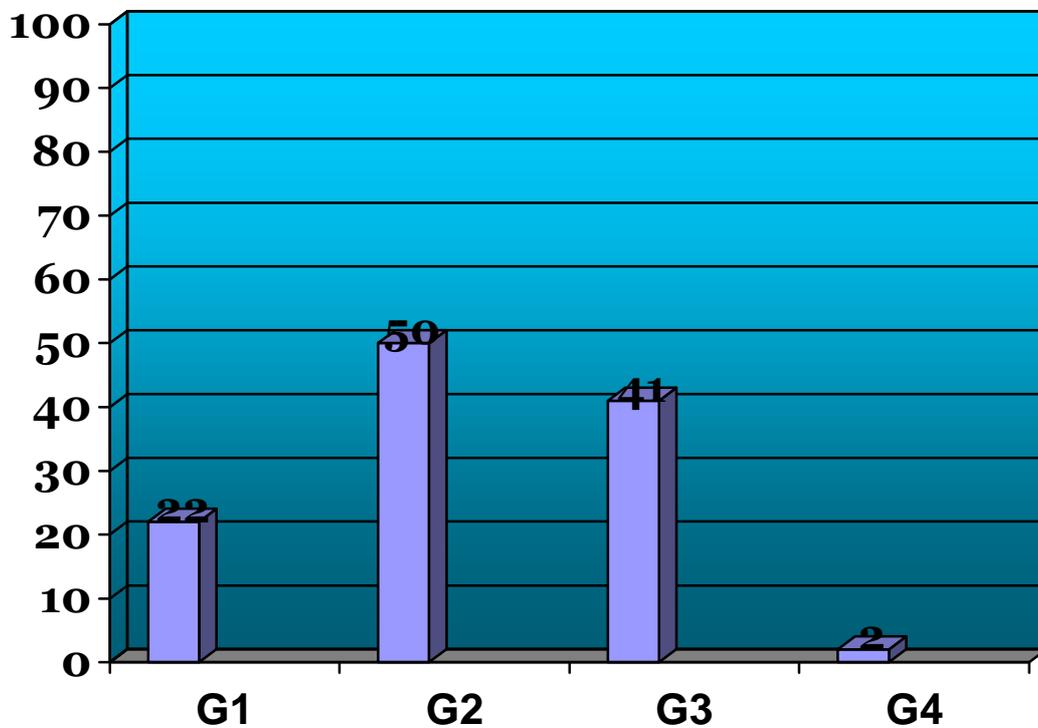


Abbildung 08: Graphische Darstellung der Verteilung der Kerndifferenzierung

### **3.3. Probenmaterial**

Von den Patienten wurden 10 ml EDTA-Vollblut und 10 ml Serum-Monovetten abgenommen und bei -80°C gelagert. Das Serum war zuvor nach Zentrifugation der Serum-Monovetten bei 4000 Umdrehungen pro Minute (Upm) für 10 Minuten (Min) und anschließendem Abseren (2-4 ml) gewonnen worden.

Intraoperativ wurde ein Stück Tumorgewebe nach transurethraler Resektion (TUR) oder Zystektomie asserviert und ebenfalls in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert.

Präoperativ wurde Spontanurin gewonnen und in gleicher Weise wie die übrigen oben genannten Proben gelagert.

### **3.4. Methoden**

#### **3.4.1. DNA-Isolierung**

##### **3.4.1.1. DNA-Extraktion aus Blutlymphozyten mit Phenol/Chloroform Methode (für Mikrosatelliten)**

Zunächst überführt man das aufgetaute 10 ml EDTA-Blut in ein 50 ml Greiner-Röhrchen und füllt mit 30 ml Lysis-Puffer auf. Dieses Gemisch lagert man 15 Min auf Eis und mischt es einige Male. Als nächstes wird für 10 Min bei 3000 Upm und einer Temperatur von 4°C zentrifugiert.

Den dabei anfallenden Überstand gießt man vorsichtig in eine Abfallflasche und spült bei Bedarf noch einmal nach. Anschließend lässt man das Ganze auf ein Papierhandtuch abtropfen, bevor man das Pellet durch schlagen in die Handfläche lockert.

Nun fügt man weitere 10 ml Lysis-Puffer kalt dazu und resuspendiert das Pellet sorgfältig. Danach lagert man das Greiner-Röhrchen weitere 10 Min auf Eis und zentrifugiert wieder 10 Min bei 3000 Upm und einer Temperatur von 4°C.

Der entstandene Überstand wird wieder verworfen und das Pellet gut geschüttelt (in die flache Hand schlagen). Es sollte jetzt nur noch Leukozyten enthalten.

Ist es noch blutig, muss man noch einmal in oben beschriebener Art und Weise mit Lysis-Puffer waschen.

Ab dem folgenden Schritt ist das Verfahren für die DNA-Isolierung aus den Tumor-Gewebe-Stücken mit dem nun beschriebenen identisch.

Zu dem Pellet mit den Leukozyten gibt man nun 5-6 ml TE9-Puffer, 0,5 ml SDS 10% und 50 µl Proteinase K (10 mg/ml) (eingefroren 50 mg/dl) und lässt alles für 2 Tage (d) in 55°C warmen Wasserbad inkubieren bis das Pellet sich ganz gelöst hat. Unter einem Abzug fügt man jetzt 5 ml Phenol hinzu und mischt 5 Min sanft. Anschließend wird 3 Min bei 4000 Upm zur Phasentrennung zentrifugiert. Den Überstand überführt man in ein kleines Greiner-Röhrchen und gibt 3 ml Phenol und 2 ml Chloroform hinzu. Das Ganze mischt man 5 Min sanft und zentrifugiert wieder 3 Minuten lang bei 4000 Upm.

Der Überstand wird in ein frisches kleines Greiner-Röhrchen überführt und als nächstes werden 5 ml Chloroform hinzugefügt. Das Gemisch mischt man erneut sanft und zentrifugiert nun bei 4000 Upm für 3 Min.

Den gewonnenen Überstand überführt man diesmal in ein großes Greiner-Röhrchen und gibt 40 ml 100% ETOH hinzu. Die ausgefällte DNA nimmt man mit einer Pasteurpipette auf und wäscht sie in 500 µl 70% ETOH.

Danach zentrifugiert man 5 Min bei 13.000 Upm. Das ETOH wird anschließend abgossen und das Pellet 30 Min luftgetrocknet, bevor man es in 200-300 µl TE1-Puffer aufnimmt und bei +4°C lagert.

#### **3.4.1.2. DNA-Isolierung aus Tumor-Gewebestücken per Phenol/Chloroform-Methode**

Ein 5-10 mm Durchmesser großes Tumor-Gewebe-Stück wird in einer Petrischale in TE9-Puffer (0,5 mM Tris-Cl, pH 9; 0,1 mM EDTA) aufgeweicht. Anschließend werden die Tumorzellen vorsichtig aus dem Stromabindgewebe herausgeschabt und gepresst. Das Stroma wird danach verworfen.

Als nächstes werden die Tumorzellen in 5 ml TE9-Puffer resuspendiert und in 2% Natriumdodecylsulfat (SDS) mit 0,5 mg/dl Proteinase-K für 3 Stunden (h) bis zu 3 d (je nach Gewebe-Stück-Größe) bei 56°C inkubiert.

Die DNA wird jetzt mit der Phenol-Chloroform-Methode wie oben beschrieben extrahiert und bei +4°C gelagert.

### **3.4.1.3. DNA-Isolierung aus Blut-Serum mittels QIAamp DNA Blood Midi Kit**

#### **3.4.1.3.1. Vorbereitung**

Ein Wasserbad muss auf 70°C vorgeheizt und der AL-Puffer bei 70°C gelöst werden, falls er ausgefallen ist.

Für die Qiagen Protease Stock-Lösung werden 5,5 ml destilliertes Wasser in die Qiagen Protease Stock-Lösung gegeben.

Die beiden AW1-/AW2-Puffer werden mit 125 ml Ethanol (96-100%) aufgefüllt.

#### **3.4.1.3.2. Ausführung**

Die Serumprobe (2-4 ml) soll schonend auftauen. 200 µl Qiagen Protease werden in ein 15 ml Zentrifugenröhrchen pipettiert und anschließend fügt man die Serumprobe hinzu und mischt kurz. Als nächstes fügt man 2,4 ml AL-Puffer mit dem DNA-Carrier (5,6 µl/2 ml Serum) hinzu und mischt gründlich durch 3-maliges jeweils 5 Sekunden (Sek) dauerndes Vortexen. Man muss darauf achten, die Qiagen Protease nicht direkt zum AL-Puffer zu zugeben.

Nun inkubiert man das Gemisch für 10 Min im 70°C warmen Wasserbad. Danach fügt man 2 ml Ethanol (96-100%) zur Probe dazu und mischt durch noch einmaliges vortexen. Die Hälfte der Lösung (3,3 ml) wird vorsichtig auf die QIAamp Midi Säule gegeben, die auf einem 15 ml Zentrifugenröhrchen platziert ist, ohne den Rand der Säule zu benetzen. Nachdem man die Kappe geschlossen hat, wird für 3 Min bei 3000 Upm bei Raumtemperatur zentrifugiert.

Als nächsten Schritt entfernt man das Filtrat und platziert die Midi-Säule zurück auf ein 15 ml Zentrifugenröhrchen. Dann wird die restliche Lösung auf die Säule gegeben und erneut für 3 Min bei Raumtemperatur bei 3000 Upm zentrifugiert.

Das Filtrat wird wiederum verworfen und die Säule zurück auf ein 15 ml Zentrifugenröhrchen platziert. Nachdem man 2 ml AW1-Puffer sorgfältig, ohne Randberührung, auf die Säule pipettiert hat, wird für 1 Min wieder bei Raumtemperatur bei 4000 Upm zentrifugiert.

Anschließend pipettiert man 2 ml AW2-Puffer vorsichtig, ohne den Rand der Säule zu berühren, auf die Säule. Danach wird bei Raumtemperatur für 15 Min bei 4000 Upm zentrifugiert. Um das restliche Ethanol aus der Probe zu bekommen, inkubiert man nun für 10 Min bei 70°C.

Danach wird die Säule auf ein sauberes 15 ml Zentrifugationsröhrchen gebracht und das Filtrat entfernt. Im folgenden Schritt gibt man 300 µl AE-Puffer direkt auf die Membransäule und inkubiert sie bei Raumtemperatur (15-25°C) für 5 Min und zentrifugiert für 5 Min bei 4000 Upm ebenfalls bei Raumtemperatur. Um die Probe zu konzentrieren, gibt man das Filtrat diesmal auf die Säule, inkubiert nochmals für 5 Min und zentrifugiert weitere 5 Min bei 4000 Upm und Raumtemperatur. Abschließend aliquotiert man das Filtrat und lagert es bei -20°C.

### **3.4.1.4. DNA-Extraktion aus Urin-Sediment mittels QIAamp DNA Mini Kit**

#### **3.4.1. 4.1. Vorbereitung**

Der präoperativ gewonnene Spontanurin wird für 10 Min bei 3000 Upm zentrifugiert und 200 µl Sediment-Material zur Extraktion verwendet. Dann muss man ein Wasserbad auf 70°C vorheizen.

Zur Qiagen Protease Stock Lösung (24 mg) fügt man 1,2 ml Protease Lösungsmittel (Nuklease freies Wasser versetzt mit 0,04% sodium acid) hinzu. Der AL-Puffer muss vor Gebrauch gründlich geschüttelt werden. Zu dem AW1-Puffer (19 ml) fügt man 25 ml Ethanol (96-100%) hinzu. 30 ml Ethanol müssen zum AW2-Puffer (13 ml) vor Benutzung hinzu gegeben werden.

#### **3. 4.1.4.2. Ausführung**

Als erstes werden 20 µl Qiagen Protease Stock Lösung in ein 1,5 ml Mikrozentrifugenröhrchen pipettiert. Anschließend fügt man 200 µl der Sedimentprobe und 200 µl AL-Puffer hinzu und vortext die Probe sofort danach für 15 Sek. Man muss darauf achten, dass man die Qiagen Protease nicht direkt mit dem AL-Puffer in Berührung kommt.

Als nächstes inkubiert man die Probe für 10 Min bei 56°C, wonach man vorsichtig eventuelle Tropfen vom Deckel durch vorsichtiges zentrifugieren entfernt.

Jetzt fügt man 200 µl Ethanol (96-100%) zur Probe dazu und mischt erneut durch 15 Sek vortexen und zentrifugiert nochmals vorsichtig, um die Tropfen an der Innenseite des Deckels zu entfernen.

Danach pipettiert man die Mischung vorsichtig auf die QIAamp spin Säule, die in einem 2 ml Collection Tube gesetzt wurde, ohne den Rand zu berühren und

zentrifugiert bei 8000 Upm für 1 Min bei Raumtemperatur. Nach der Zentrifugation setzt man die Säule in ein frisches 2 ml Collection Tube und verwirft das Filtrat enthaltene Tube.

Im nächsten Schritt fügt man 500 µl AW1-Puffer hinzu, ohne den Rand zu berühren, schließt den Deckel und zentrifugiert für 1 Min bei 8000 Upm bei Raumtemperatur. Wiederum wird die Säule in ein neues 2 ml Collection Tube gesetzt und man verwirft den gebrauchten Tube mit dem Filtrat.

Im Folgenden gibt man jetzt 500 µl AW2-Puffer hinzu, wieder ohne den Rand zu berühren. Anschließend zentrifugiert man bei Raumtemperatur für 3 Min bei vollem Speed (14.000 Upm).

Um die DNA-Konzentration zu erhöhen, gibt man die Probe nochmals auf die Säule und zentrifugiert bei maximaler Umdrehung für 1 Minute.

Jetzt wird die Säule in ein 1,5 ml Mikrozentrifugenröhrchen gegeben und 200 µl AE-Puffer werden hinzugefügt und 1 Min bei Raumtemperatur inkubiert, bevor man noch einmal bei Raumtemperatur für 1 Min bei 8000 Upm zentrifugiert.

### **3.4.2. DNA-Messung per Photometer**

Zur Messung muss die Probe mit Aqua dest. verdünnt werden: bei den Serum-Proben im Verhältnis 1:5 bis 1:10 und bei Lymphozyten- bzw. Tumor-Proben im Verhältnis 1:100. Nachdem man den Nullwert bestimmt hat, setzt man die Küvette mit der Probe in das Gerät und misst die Ratio der DNA, welche den Reinheitsgrad der DNA angibt (sollte zwischen 1,8-2,0 liegen).

### **3.4.3. PCR-Amplifikation**

50-100 ng DNA (5 µl), welche in den obigen Arbeitsschritten gewonnen wurde, werden in 10 µl PCR-Reaktion in Mikrotiter-PCR-Platten gegeben. Jetzt werden nacheinander 50 mM KCl; 10 mM Tris-Cl, pH 8,3; 2,0 mM MgCl<sub>2</sub>; 10 pMol „Forward-Primer“ (Cy-5-fluoreszenzmarkiert); 10 pMol „Reverse-Primer“; 200 µMol dNTPs each und als letztes 0,5 U Taq-DNA-Polymerase zusammen pipettiert und 5 µl von diesem Mix auf die Mikrotiter-PCR-Platten zur DNA hinzu gegeben. Zum Schutz vor Austrocknung gibt man noch einen Tropfen Öl vorsichtig auf die Platte. Jetzt wird im PTC 100 Thermocycler die PCR über mehrere Schritte ablaufen (Tab. 5).

**Tabelle 05:** Ablauf der PCR via PTC 100 Thermocycler

	Temperatur	Dauer
<b>Denaturierung:</b>	<b>94°C</b>	<b>2 Min</b>
<b>28 Zyklen je</b>	<b>95°C</b>	<b>40 Sek</b>
	<b>55°C</b>	<b>30 Sek</b>
	<b>72°C</b>	<b>40 Sek</b>
<b>Abschluß</b>	<b>72°C</b>	<b>10 Min</b>

Als nächstes gibt man 30 µl Stop-Lösung (50 mM EDTA; 5 mg/ml DextranBlau 2000 in 100% deionisiertem Formamid).

#### 3.4.4. Mikrosatellitenanalyse

Zur Identifikation der Tumor-, Serum- und Urinsediment-DNA-Alterationen wurden bei 117 Harnblasenkarzinomen insgesamt 10 hochpolymorphe Marker der chromosomalen Regionen 5q, 8p, 9p, 9q, 13q, 14q, 17q und 20q (D5S1720, D8S261, D8S560, D9S171, D9S925, D9S15, D13S153, D14S750, D17S1306 und D20S486) verwendet. Die Primer-Sequenzen der Mikrosatellitenmarker wurden aus der Genom-Datenbank unter <http://lpg.nci.nih.gov/html-chlc/ChlcMarkers.html> oder [http://carbon.wi.mit.edu:8000/cgi-bin/contig/sts\\_info?](http://carbon.wi.mit.edu:8000/cgi-bin/contig/sts_info?) übernommen. Die Sequenzen dieser Mikrosatellitenmarker sind mit anderen Charakteristika in Tabelle 06 dargestellt. Bei der Primer-Wahl wurde auf einen möglichst hohen Anteil an Tri- und Tetranukleotid-Repeats geachtet, weil in der Analyse durch den größeren Abstand beider Allele erfahrungsgemäß die saubersten Ergebnisse resultieren. Bei den Vorarbeiten zu dieser Promotionsarbeit von den Arbeitsgruppen um von Knobloch aus den Jahren 2001, 2002 und 2004 wurde jeweils die Anzahl der Marker mit dem Ziel reduziert, diejenigen Marker mit den besten Sensitivitäten bei hoher Spezifität zu identifizieren. Von initial 54 Markern wurde auf 17 Marker reduziert. Gleichzeitig erhöhte sich jeweils die Anzahl der untersuchten Patienten. Die Marker mit der höchsten Sensitivität der chromosomalen Regionen wurden auch von anderen Arbeitsgruppen bestätigt. So zeigten die Regionen 8p, 9p und 9q bei Chan und seiner Arbeitsgruppe 2009 Sensitivitäten dieser Regionen zwischen 46-67%. Die in dieser Arbeit eingesetzten Marker zeigten sich in diesen Arbeiten als

am besten geeignet, so dass zur Reduktion des Umfangs der Untersuchungen und auch zur Drosselung der Kosten mit o.g. 10 Markern gearbeitet wurde (von Knobloch et al., 2001; von Knobloch 2002; von Knobloch et al., 2004, Chan et al., 2009).

**Tabelle 06:** Mikrosatellitenmarker für die Tumor-, Serum- und Urinsanalyse der Harnblasenkarzinome

Chromosom	Markername	Nukleotid Repeat <sup>1</sup>	Produktgröße <sup>2</sup>	Sequenzen <sup>3</sup> (5' - 3')
5q	D5S1720	GATA	220	F: CCTCCTGACAGCAGATATGA R: CTGAGGTCTCTCCTGGGTGT
8p	D8S261	CA	143	F: TGCCACTGTCTTGAAAATCC R: TATGGCCCAGCAATGTGTAT
	D8S560	CA	143	F: GGCATTTTCAGAGGACC, R: TGCAAAGATGGGCTCAG
9p	D9S171	CA	158	F: AGCTAAGTGAACCTCATCTCTGTCT R: ACCCTAGCACTGATGGTATAGTCT
	D9S925	GATA	167	F: TGTGAGCCAAGGCCTTATAG R: GTCTGGGTTCTCAAAGAAA
9q	D9S15	CA	197	F: TAAAGATTGGGAGTCAAGTA R: TTCACITGATGGTGGTAATC
13q	D13S153	CA	221	F: AGCATTGTTTCATGTTGGTG R: CAGCAGTGAAGGTCTAAGCC
14q	D14S750	GGAA	164	F: ATTCTTCTCCAAGAATGCC R: CAAGTCTCAAGAGGTAGAAGTGC
17q	D17S1306	GGAA	179	F: TTATGCACAAGGAGTTGCA R: ATGGTTGTATCTTACTCCTCTCC
20q	D20S486	GGAA	243	F: GAAGGGCTTTAATGTTTCAGTG R: AGAAGCCTTGGAGAACGATT

<sup>1</sup>: F = Forward primer-, R = Reverse primer-Sequenz

<sup>2</sup>: Produktgröße in Basenpaaren (bp)

<sup>3</sup>: A = Adenosin, C = Cytidin, G = Guanosin, T = Thymin

### 3.4.4.1. Mikrosatellitenanalyse per Polyacrylamid-Gel Elektrophorese

#### 3.4.4.1.1. Ausführung

Das Polyacrylamid-Gel wird unmittelbar vor Gebrauch endgefertigt. Dazu mischt man die beiden Flaschen (Repro Gel „Long Read-Gel“ oder Repro-Gel „High Resolution-Gel“). Eine Luftblasenbildung ist dringend zu vermeiden. Es ist unbedingt darauf zu achten, Handschuhe und eine Schutzbrille zu tragen. Jeglicher Hautkontakt mit der Lösung ist dringend zu vermeiden.

Das Gel wird langsam und gleichmäßig zwischen den beiden Platten verteilt.

Um das Gel zu polymerisieren, lässt man es 10 Min unter UV-Licht bei Raumtemperatur stehen. Als nächstes füllt man die obere und untere Kammer mit

5x TBE-Puffer und befüllt die Kammern mit dem vorgeheizten Probenmaterial und kontrolliert die Rahmenparameter: 1500 V; 60 mA, 30 W (bei High-Resolution-Gel) bzw. 25 W (bei Long-Read-Gel). Die Laufzeit beträgt für das High-Resolution-Gel 450 Min und für das Long-Read-Gel 700 Min. Die Fragmentanalyse erfolgt in einem automatischen Laser-Sequenzierungsgerät (ALFexpressII®, Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg, Abb. 09). Die erhaltenen Rohdaten wurden unter zu Hilfenahme der Software „Fragment Manager“ (FM 1.2, Pharmacia Biotech) ausgewertet.

Die Prinzipien der Laserdetektion von fluoreszenzmarkierten PCR-Produkten sind in Abbildung 10 schematisch dargestellt.



**Abbildung 09:** Lasersequenzierer ALFexpressII® (Amersham-Pharmacia-Biotech, Freiburg) für die Fluoreszenz-Mikrosatellitenanalyse.

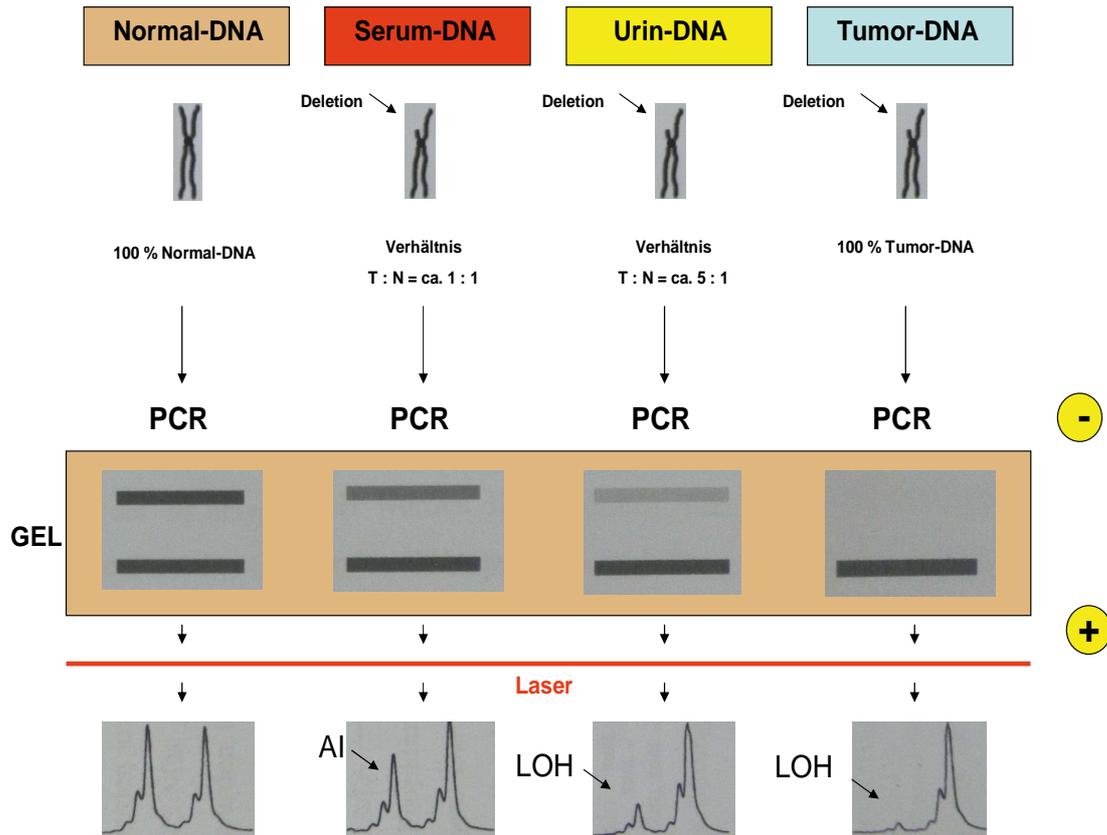
### 3.4.5. Laserdetektion der PCR-Produkte

Zur Abbildung wurde bei der Mikrosatellitenanalyse die Technik der Fluoreszenzmarkierung der PCR-Produkte mit dem blauen Fluoreszenzfarbstoff Cy5 benutzt. Bei diesem hoch sensitiven Verfahren kann man die Verwendung von radioaktiven Markern vermeiden. Nach elektrophoretischer Auftrennung können

die Produkte durch die Laserdetektion nicht nur autoradiographisch auf Filmen wiedergegeben, sondern auch quantitativ gemessen werden und somit ist diese Methode der radioaktiven Technik besonders im Bereich der Sensitivität überlegen. Die Gruppe aus Heidelberg um Prof. G. Kovacs hat die Eignung des Verfahrens für die Mikrosatellitenanalyse in mehreren Publikationen belegt (*Chudek et al.*, 1997; *Palmedo et al.*, 1997; *Bugert et al.*, 1998).

### **3.4.6. Statistik**

Um Assoziationen genetischer Alterationen mit klinisch-pathologischen Prognoseparametern zu identifizieren und Assoziationen zwischen Serum- und Urin-DNA-Alterationen mit klinisch-pathologischen Prognoseparametern nachzuweisen, wurden der t-Test und der nicht parametrische Mann-Whitney-Test verwendet. Ein p-Wert von  $\leq 0,05$  wurde als signifikant gewertet. Für die statistische Berechnung wurde SPSS® 11.5 für Windows® eingesetzt.



**Abbildung 10** Mikrosatellitenanalyse mit Laserdetektion fluoreszierender PCR-Produkte

Die Normal-, Serum-, Urin- und Tumor-DNA wird mit einem Mikrosatellitenmarker des kurzen Chromosomenarmes untersucht. Anschließend werden die PCR-Produkte mittels Gelelektrophorese aufgetrennt. In der Normal-DNA zeigen sich beim heterozygoten Fall zwei gleich starke Allel-Peaks. Durch Deletion fehlt das eine Allel des untersuchten Chromosoms in der Tumor-DNA (LOH). In Serum- und Urin-DNA liegt die Tumor-DNA nicht in der reinen Form vor, sondern vermischt sich mit der Normal-DNA. Dies ist an der Abschwächung des Allelverlustes im Vergleich zur Tumor-DNA zu erkennen, bei der Serum-DNA im Sinne einer allelischen Imbalanz (AI) (von Knobloch *et al.*, 2001).

## 4. Ergebnisse

Im Rahmen dieser Arbeit wurden von 117 Patienten jeweils repräsentative Tumorproben, 112 Serumproben und 75 Urin-Sediment-Proben zur Analyse verwendet. Die Untersuchungsgruppe bestand zu 82% aus männlichen und zu 18% aus weiblichen Patienten im Alter zwischen 45 und 93 Jahren. Der Altersmedian betrug 69 Jahre (Mittelwert 69,8 Jahre).

### 4.1. Inzidenz genetischer Alterationen

Analysiert wurde die Inzidenz von Alterationen mit 10 Mikrosatellitenmarkern der chromosomalen Regionen 5q, 8p, 9p, 9q, 13q, 14q 17q und 20q (n = 117).

Es wurde für die 8 chromosomalen Regionen in 30,9% bis 51,5% bei oberflächlichen sowie nicht muskelinvasiven Tumoren (pTa/pT1) und in 42,6 bis 63,8% bei muskelinvasiven Tumoren (pT2-pT4) Alterationen identifiziert. Die drei Regionen mit den häufigsten Alterationen waren bei pTa/pT1 Tumoren die Regionen 9p und 9q mit 45,6 bis 51,5% (9p mit zwei verschiedenen Markern vertreten) und bei den muskelinvasiven Tumoren die Regionen 9p und 14q (59,6 bis 63,8 %). Die höchste Inzidenz von LOH („loss of heterozygosity“) wurde für die Regionen 9q und 9p mit den beiden Markern D9S15 und D9S925 in 26,5% gemessen. 9p (D9S171) LOH kam in 24,8% der Fälle vor. Ein Tumor zeigte das histopathologische Bild eines Carcinomas in situ. 5 der 10 Marker identifizierten Alterationen (8p (zwei Marker), 13q, 14q und 20q) bei dieser Tumorentität. Des Weiteren waren im Kollektiv ein Adenokarzinom (identifizierte Alterationen bei den Regionen 8p, 14q und 20q) und ein neuroendokriner Tumor der Blase (identifizierte Alterationen der Regionen 5q, 9p, 9q und 13q) vertreten. LOH um den Genlocus von p53 (auf 17q) zeigte sich in lediglich 4,3 %, eine Allelic Imbalance jedoch in 29,9%. Bei den muskelinvasiven Tumoren (pT2 – pT4) zeigten sich bei 42,6% ein 17q-Verlust, bei den pTa/pT1-Tumoren bei 21 von 68 Tumoren (30,9%). Abbildung 11 sowie Tabelle 07 geben die Ergebnisse graphisch bzw. einzeln wieder.

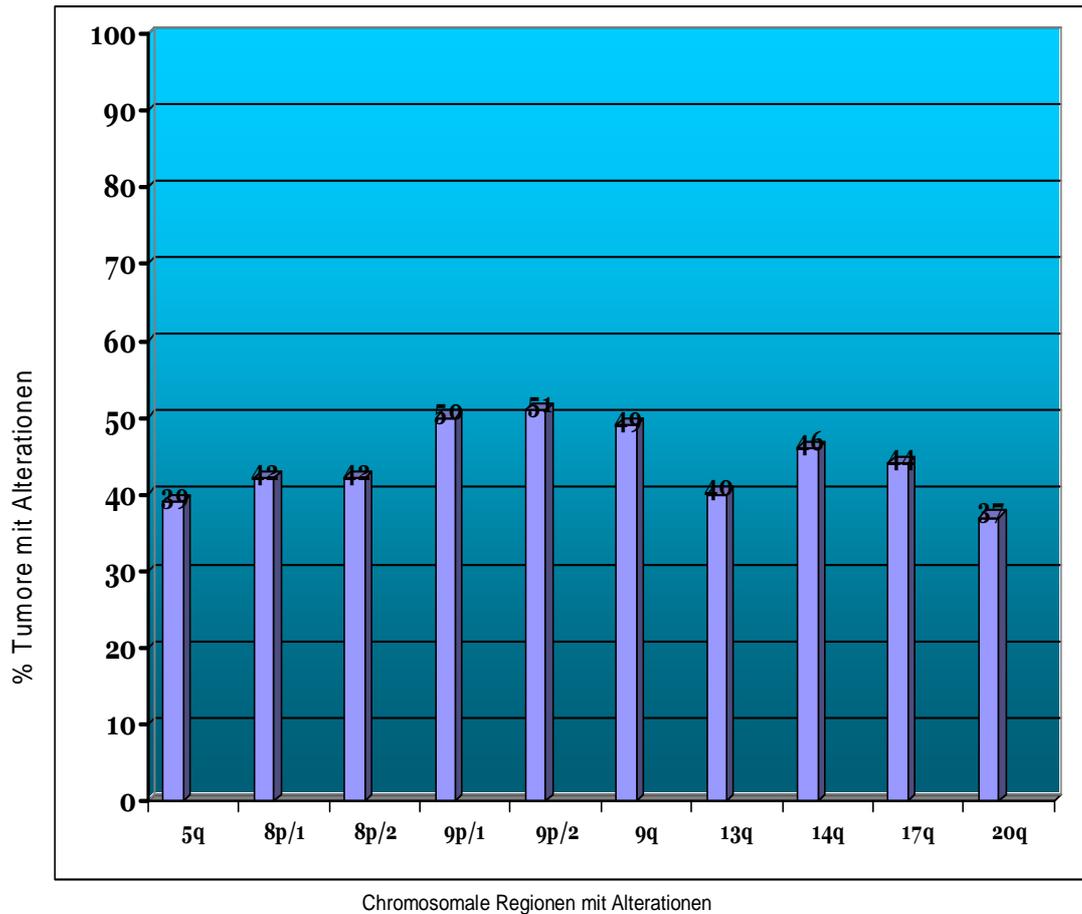
**Tabelle 07:** Allelotypisierung von n = 117 Harnblasenkarzinomen sortiert nach Stadium

Probe	pT	pN	M	G	5q	8p/1	8p/2	9p/1	9p/2	9q	13q	14q	17q	20q
7	A	0	0	1	R	R	R	A	R	R	R	L	R	X
8	A	0	0	1	R	R	R	R	X	R	A	R	X	A
41	A	0	0	1	X	X	R	R	L	X	R	R	X	R
48	A	0	0	1	X	R	R	R	X	X	X	R	X	R
64	A	0	0	1	R	R	A	A	X	A	R	X	A	R
69	A	0	0	1	X	R	R	L	L	X	X	A	X	R
77	A	0	0	1	A	R	X	R	R	X	R	R	X	X
87	A	0	0	1	X	X	R	L	R	X	X	R	X	X
88	A	0	0	1	L	A	R	L	L	L	A	R	A	R
108	A	0	0	1	R	A	X	X	R	X	X	R	X	R
169	A	0	0	1	X	A	R	R	X	L	R	R	X	X
185	A	0	0	1	X	X	R	A	A	L	R	X	A	X
191	A	0	0	1	R	X	R	L	L	L	X	R	X	X
192	A	0	0	1	R	R	R	X	X	X	X	R	R	R
211	A	0	0	1	R	X	A	R	X	A	R	X	X	X
219	A	0	0	1	R	R	R	X	R	R	R	R	R	R
230	A	0	0	1	X	R	R	L	X	X	L	A	A	X
249	A	0	0	1	A	R	R	X	A	X	A	A	R	A
1	A	0	0	2	R	X	L	A	A	A	L	R	A	X
6	A	0	0	2	X	R	R	R	R	X	R	L	R	X
13	A	0	0	2	X	A	R	R	R	X	R	R	R	A
20	A	0	0	2	X	X	X	L	L	X	R	R	R	R
21	A	0	0	2	A	A	R	R	R	X	A	A	A	A
43	A	0	0	2	R	X	X	L	X	L	R	X	A	X
61	A	0	0	2	A	L	L	L	L	X	R	L	X	R
79	A	0	0	2	R	R	R	R	R	X	X	R	X	R
85	A	0	0	2	R	X	R	R	R	R	X	R	X	R
94	A	0	0	2	L	R	A	L	X	L	R	A	R	A
101	A	0	0	2	R	A	R	L	X	L	L	X	A	A
107	A	0	0	2	R	X	A	A	A	L	R	L	X	A
111	A	0	0	2	A	L	L	L	L	L	A	L	X	R
155	A	0	0	2	R	X	R	R	X	A	X	R	R	R
160	A	0	0	2	A	L	L	L	X	L	A	R	X	R
176	A	0	0	2	X	R	R	R	A	X	R	A	X	X
205	A	0	0	2	R	L	X	X	R	X	X	X	X	X
206	A	0	0	2	L	A	A	R	L	X	X	A	L	A
233	A	0	0	2	R	A	A	L	L	L	R	X	R	X
238	A	0	0	2	X	A	L	X	X	A	L	A	X	A
258	A	0	0	2	L	X	A	L	L	A	A	L	A	X
261	A	0	0	2	A	R	R	R	R	X	R	X	A	R

110	tis	0	0		X	A	A	X	X	X	A	A		
81	1	0	0	1	R	R	R	A	A	A	R	R	X	X
213	1	0	0	1	X	R	X	A	L	A	R	X	R	R
254	1	0	0	1	A	X	R	R	X	R	X	A	X	A
4	1	0	0	2	R	R	R	L	A	L	A	R	R	R
5	X	A	0	2	L	L	A	R	R	R	L	X	A	A
17	1	0	0	2	R	A	R	R	A	X	R	X	R	X
34	1	0	0	2	X	L	R	A	L	X	A	R	L	X
45	1	0	0	2	X	R	R	L	X	L	R	X	R	R
68	1	0	0	2	A	X	L	R	A	X	R	L	X	X
102	1	0	0	2	X	X	L	X	A	L	R	R	X	R
112	1	0	0	2	R	R	L	X	A	A	A	X	X	R
128	1	0	0	2	A	R	A	A	X	A	R	R	A	R
129	1	0	0	2	A	X	X	A	L	X	A	X	L	A
152	1	0	0	2	R	X	X	R	R	X	A	R	X	R
170	1	0	0	2	A	L	L	X	X	A	A	X	A	A
183	1	0	0	2	A	A	A	A	X	L	R	A	X	A
215	1	0	0	2	A	X	X	L	L	L	R	R	X	A
224	1	0	0	2	X	L	A	A	X	A	A	L	R	A
262	1	0	0	2	X	R	X	X	X	X	R	R	A	X
131	1	0	1	2	L	A	R	A	L	L	A	A	L	X
37	1	0	0	3	R	A	A	L	L	L	R	A	X	A
55	1	0	0	3	A	X	A	X	X	X	A	X	X	A
80	1	0	0	3	R	A	L	A	L	X	A	A	X	A
114	1	0	0	3	L	A	R	R	R	X	A	X	R	R
154	1	0	0	3	A	A	L	A	X	A	L	L	X	A
196	1	0	0	3	A	A	R	X	A	A	R	A	A	L
207	1	0	0	3	L	A	L	L	L	X	A	A	A	A
239	1	0	0	3	X	X	L	L	L	L	A	A	A	L
19	2	0	0	2	A	A	A	R	L	X	X	L	R	A
47	2	0	0	2	A	R	X	R	A	X	R	A	A	A
130	2	0	0	2	R	X	R	R	R	X	R	X	X	X
151	2	0	0	2	R	R	R	L	L	L	R	A	A	R
186	2	0	0	2	A	A	X	L	A	X	A	X	A	A
198	2	*		2	A	R	X	A	A	X	L	R	A	R
127	2	1	0	2	X	X	X	R	R	X	R	X	R	R
175	2	1	0	2	X	X	A	R	X	R	X	A	X	A
31	2	0	0	3	X	A	R	A	L	L	R	A	R	A
39	2	0	0	3	A	X	R	A	A	A	R	A	A	A
54	2	0	0	3	X	A	A	A	X	R	A	A	A	R
56	2	0	0	3	A	X	A	X	A	L	A	A	X	A
60	2	0	0	3	A	R	A	R	R	R	R	X	X	R
78	2	0	0	3	A	A	L	A	X	R	X	R	X	X
97	2	0	0	3	X	R	X	L	L	L	R	R	R	R
105	2	0	0	3	R	A	X	L	L	L	R	R	R	R

156	2	0	0	3	X	L	L	L	X	L	X	L	R	A
163	2	0	0	3	X	A	A	A	X	X	X	A	X	A
182	2	0	0	3	A	R	R	R	R	X	R	L	A	X
237	2	0	0	3	X	L	L	L	L	L	A	A	X	X
138	2	1	0	3	X	R	A	X	R	X	A	R	X	X
218	2	0	0	4	R	R	X	R	R	R	A	X	R	X
162	3	0	0	2	A	A	X	A	L	X	A	A	X	X
235	3	0	0	2	A	A	R	R	A	X	A	A	A	A
3	3	0	0	3	X	R	R	A	A	L	A	R	X	A
30	3	0	0	3	X	A	A	R	L	X	A	X	A	R
38	3	0	0	3	L	R	R	A	L	R	A	R	R	X
70	3	0	0	3	L	L	R	R	A	A	L	L	L	A
76	3	0	0	3	X	X	R	A	X	A	R	A	A	X
89	3	0	0	3	R	X	X	X	R	X	X	X	A	X
202	3	0	X	3	X	X	X	A	A	A	A	X	R	R
44	3	1	0	3	X	X	A	R	A	X	R	A	R	R
104	3	1	0	3	X	A	A	L	X	L	R	R	A	L
164	3	1	0	3	X	X	A	A	A	X	A	R	X	X
11	3	2	0	3	X	R	X	A	A	X	A	A	R	A
62	3	2	0	3	L	X	L	R	X	R	L	A	A	A
147	3	2	0	3	X	A	A	X	A	A	R	X	A	R
263	3	2	X	3	R	A	A	A	X	R	R	A	X	X
40	3	2	1	3	A	X	L	A	A	L	L	L	X	X
159	4	1	1	1	X	L	X	A	L	L	R	A	A	R
267	4	2	X	2	A	R	R	X	A	A	R	A	X	A
2	4	0	0	3	L	X	L	R	X	X	L	R	A	X
18	4	1	0	3	A	X	R	A	A	A	X	A	A	X
125	4	1	0	3	A	L	R	A	A	A	X	A	A	A
95	4	0	1	3	L	L	L	L	L	L	R	A	X	A
228	4	2	X	3	X	L	R	A	A	A	A	A	A	X
252	4	X	1	4	A	L	L	L	L	A	A	X	R	A
53			**		X	L	A	R	R	X	R	A	R	A

„L“ = LOH; „A“ = allelische Imbalanz; „X“ = homozygot (nicht informativ);  
 „R“ = keine Alterationen; \* = neuroendokriner Tumor; \*\* = Adenokarzinom



**Abbildung 11:** Inzidenz der Alterationen bei n = 117 Harnblasenkarzinomen. Die Abbildung fasst die in obiger Tabelle 07 aufgeführten Daten zusammen.

Keine Alteration war signifikant ( $p < 0,05$ ) mit muskelinvasivem Tumorstadium oder schlechter Kerndifferenzierung assoziiert. Eine Alteration im Bereich 9p war signifikant mit einer lymphogenen Metastasierung verknüpft (Tabelle 08).

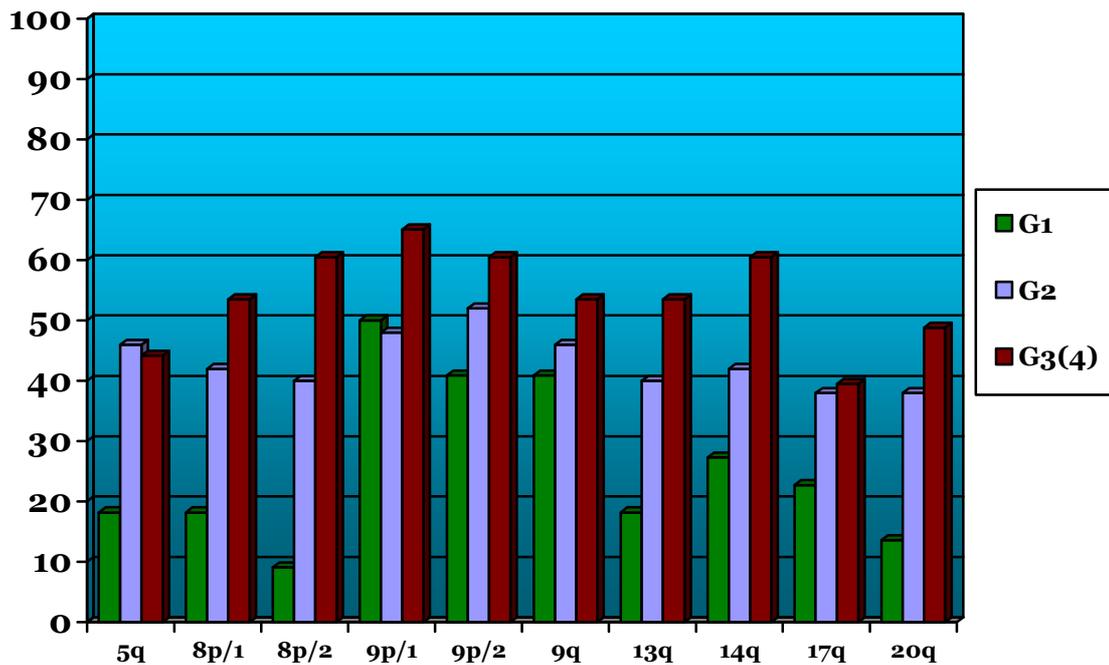
**Tabelle 08:** Assoziation eines Allelverlustes (LOH) verschiedener chromosomaler Regionen mit Differenzierungsgrad, lokalem Tumorstadium und Lymphknotenmetastasierung (t-Test, Mann-Whitney-Test)

**Chromosomale Regionen mit Alterationen**

	<b>pT2-4 (47)</b>	<b>G2-4 (93)</b>	<b>N+(16)</b>
<b>5q</b>	0,500	0,411	0,346
<b>8p/1</b>	0,649	0,411	0,664
<b>8p/2</b>	0,362	0,092	0,289
<b>9p/1</b>	0,187	0,796	<b>0,032</b>
<b>9p/2</b>	0,599	0,850	<b>0,032</b>
<b>9q</b>	0,908	0,768	0,545
<b>13q</b>	0,838	0,476	0,543
<b>14q</b>	0,413	0,497	0,294
<b>17q</b>	0,355	0,259	0,614
<b>20q</b>	0,786	0,458	0,604

*(statistisch signifikante Werte ( $p < 0,05$ ) hervorgehoben)*

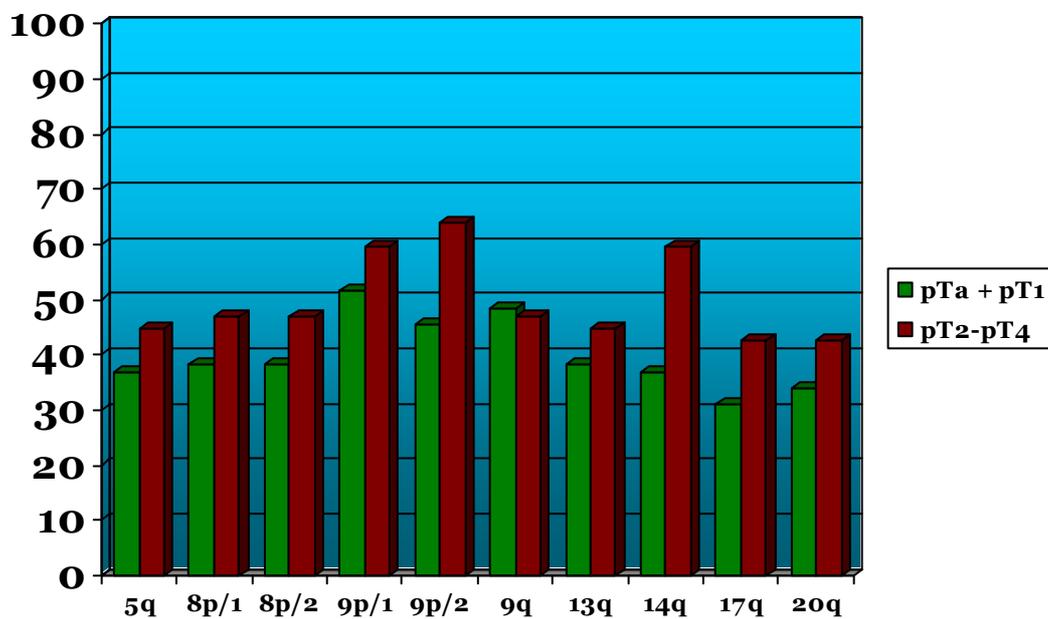
Wenn man die untersuchten Tumoren in die Gruppen mit besserer und schlechterer Prognose einteilt, ergeben sich in dieser Arbeit keine statistisch signifikanten Unterschiede im Alterationsmuster sowie der Alterationshäufigkeit zwischen pTa/pT1 Tumoren und muskelinvasiven pT2-pT4 Tumoren. Eine Auftrennung nach Differenzierungsgraden zeigte keinen signifikanten Unterschied zwischen G1-Tumoren und G2-4-Tumoren. Veränderungen an 9p sind signifikant mit einem positiven Lymphknotenstatus verknüpft. Diese Ergebnisse sind graphisch in den Abbildungen 12 und 13 dargestellt.



**Abbildung 12:** Inzidenz von genetischen Alterationen an 10 untersuchten Regionen gruppiert nach gut (G1), mäßig (G2) und schlecht (G3(4)) differenzierten Tumoren (n=117 Harnblasenkarzinome)

X-Achse: Chromosomale Regionen mit Alterationen

Y-Achse: % Tumoren mit Alterationen



**Abbildung 13:** Inzidenz von genetischen Alterationen an 10 untersuchten chromosomalen Regionen nach nicht muskelinvasiven (pTa+pT1) und invasiven (pT2-pT4) Tumoren (n = 117 Harnblasenkarzinome)

X-Achse: Chromosomale Regionen mit Alterationen

Y-Achse: % Tumoren mit Alterationen

## 4.2. Serum-DNA-Alterationen

Aktuell gibt es keine serologischen Marker des Harnblasenkarzinoms mit hoher Sensitivität sowie Spezifität. Die Arbeitsgruppe von Chen, Stroun et al. konnte 1996 erstmals in einer Pilotstudie die Mikrosatellitenanalyse zur Identifikation von Tumor-DNA-Alterationen im Serum anwenden (*Chen et al., 1996; Nawroz et al., 1996*). Frei zirkulierende Tumor-DNA konnte beim Nierenzellkarzinom als ersten urologischen Tumor nachgewiesen werden (*Goessl et al., 1998*). Von Knobloch et al. konnten 2001 zum ersten Mal auch beim Harnblasenkarzinom durch die Mikrosatellitenanalyse tumorspezifische Serum-DNA-Alterationen bei an diesem Tumor erkrankten Patienten identifizieren (*von Knobloch et al., 2001*). Bei weiterhin hoher Sensitivität konnte in den Vorarbeiten von von Knobloch die Markerzahl jeweils reduziert werden (*von Knobloch et al., 2001; von Knobloch 2002; von Knobloch et al., 2004*). In der vorliegenden Arbeit wurde die Markerzahl nun noch mal auf 10 Marker reduziert bei größerem Patientenkollektiv.

### 4.2.1. Inzidenz

Bei insgesamt 10 eingesetzten polymorphen Mikrosatellitenmarkern der chromosomalen Regionen 5q, 8p, 9p, 9q, 13q, 14q 17q und 20q wurden in 77,7% (87/112) Alterationen der Serum-DNA detektiert. In der Vorarbeit von von Knobloch aus dem Jahr 2002 konnte eine Sensitivität von 79,3% bei 17 eingesetzten Markern erreicht werden. Trotz der geringeren Markerzahl zeigt sich in der vorliegenden Arbeit also eine fast identische Sensitivität (*von Knobloch, 2002*). Bei insgesamt 117 in die Arbeit eingeschlossenen Patienten konnten bei den Serumproben aufgrund von fehlenden bzw. nicht verwertbaren Proben nur 112 eingebracht werden. Die häufigsten Alterationen der Serumproben wurden in der chromosomalen Region 9p (D9S925) mit 33,0% gefunden. Die übrigen untersuchten Regionen zeigten Alterationen von 16,1 bis 25,0%.

pTa/pT1-Tumore wiesen zwischen 15,3 bis 33,0% und muskelinvasive Tumore (pT2-pT4) zwischen 13,3 bis 33,3% Alterationen auf. Die höchsten Detektionsraten zeigten 5q, 9p, 9q und 14q bei pT2-pT4 und 8p, 9p und 20q für pTa und pT1. Das Cis sowie das Adenokarzinom wurden im Serum durch keinen Marker entdeckt. Der neuroendokrine Tumor wurde durch 17q identifiziert. Bei maximal 1% der

Proben zeigten sich Alterationen im Serum, bei welchen die Alterationen im Tumor nicht erkannt wurden.

Mit den 5 sensitivsten Markern der Arbeit (D5S1720, D8S560, D9S925, D9S15 und D14S750) konnte eine Gesamtsensitivität von 69,6% (78/112) für die serologische Tumordiagnose erzielt werden. In der Vorarbeit wurde diese mit 59% angegeben (von Knobloch, 2002).

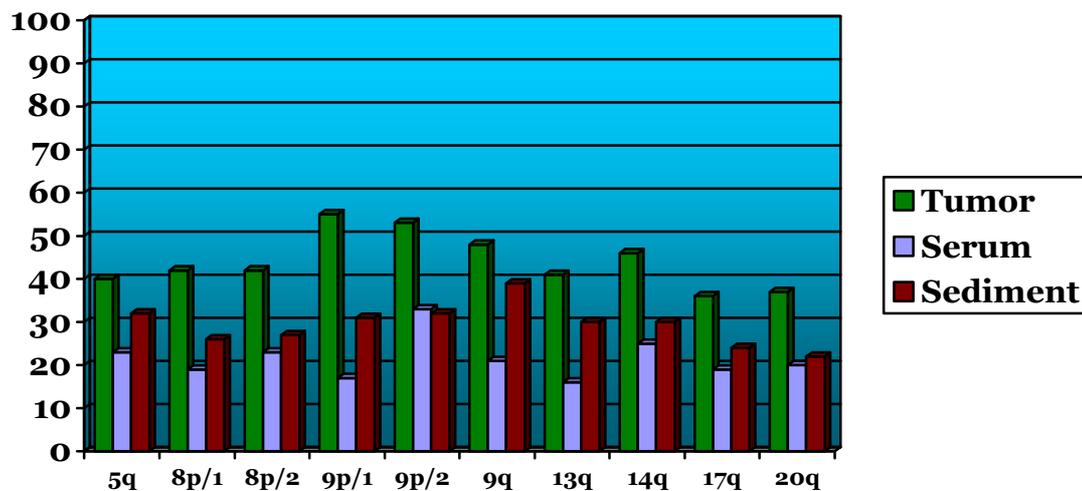
#### **4.2.2. Assoziation mit klinisch-pathologischen Prognoseparametern**

Der Nachweis einer Serum-DNA-Alteration war bei muskelinvasiven Tumorstadien (pT2 –pT4) zu 86,7% möglich. Dabei konnte unter Einbringung aller 10 Marker keine signifikante Assoziation herausgearbeitet werden ( $p = 0,062$ ; Mann-Whitney-Test). Eine mässige - schlechte Differenzierung des Kerns (G2 + G3) beim Primärtumor konnte bei 76 von 91 Tumoren (83,5%) durch Serum-DNA-Alterationen mit einer signifikanten Assoziation nachgewiesen werden ( $p = 0,005$ ; Mann-Whitney-Test). G1 Tumore wurden mit 55% (11/20), G2 Tumore mit 79,6% (39/49) und G3(4) Tumore mit 88,1% (37/42) identifiziert. Mit den 5 häufigsten Markern erreicht man eine Detektion bei muskelinvasivem Tumorstadium von noch 77,8% ( $p = 0,479$ ; Mann-Whitney-Test), bei mäßiger Kerndifferenzierung (G2) von 87,8% ( $p = 0,977$ ; Mann-Whitney-Test) und schlechter Kerndifferenzierung von 81% ( $p = 0,145$ ; Mann-Whitney-Test). Die unterschiedlichen Inzidenzen einer Serum-DNA-Alteration in Abhängigkeit der Differenzierungsgrade wie auch zwischen pTa/pT1 und muskelinvasiven (pT2-pT4) Tumorstadien sind in Abbildung 15 und 16 graphisch dargelegt.

#### **4.2.3. Spezifität**

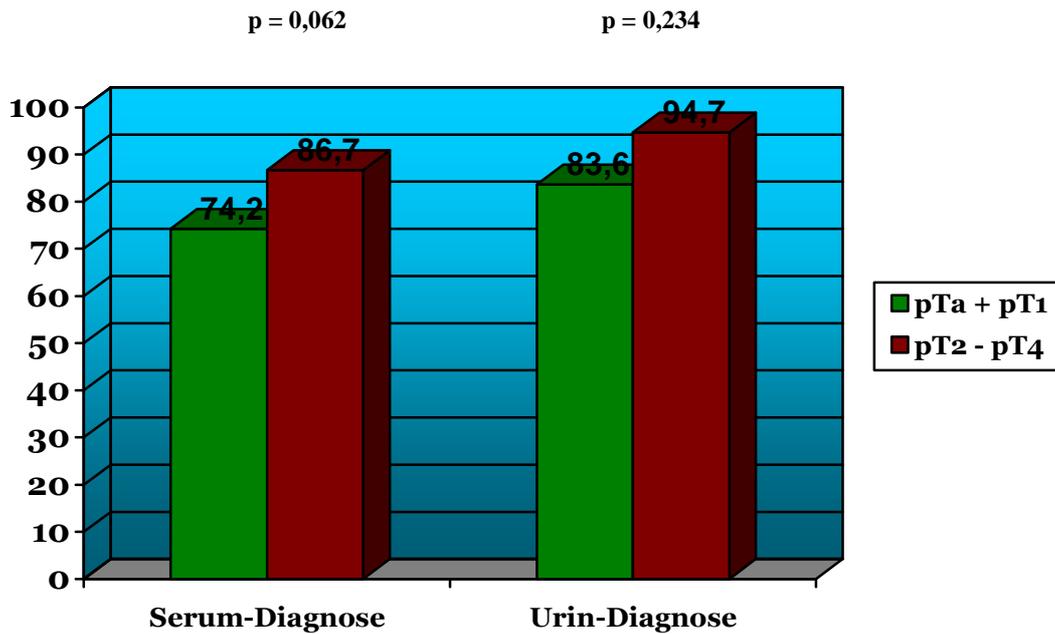
Eine Serum-DNA-Alteration wurde in dieser Arbeit nur als solche gewertet, sofern gleichzeitig eine Alteration in der Tumor-DNA vorlag (Abb. 17; 18 und 19). Eine diskordante allelische Imbalanz zeigte sich bei 7 der 10 verwendeten Markern bei maximal 4% der Proben. Als Kontrolle wurden in der Arbeit von von Knobloch 20 Proben von tumorgesunden Probanden verwendet, bei denen mit 17 Markern gearbeitet wurde. Es zeigten sich bei 4 der anamnestisch gesunden Probanden insgesamt 7 unspezifische allelische Imbalanzen. In der aktuellen Arbeit können

lediglich 2 Proben in diesem Zusammenhang zum Vergleich herangezogen werden, bei denen im histopathologischen Ergebnis kein Tumornachweis geführt werden konnte (Probennummer 9 und 15). Es ließ sich eine Spezifität von 80% in Übereinstimmung mit der Beobachtung von bis maximal 10% unspezifischen Alterationen (bei von Knobloch) bzw. 1% in der vorliegenden Arbeit beim untersuchten Tumorkollektiv errechnen (siehe Tab.11). Diese unspezifischen allelischen Imbalancen können als PCR-Artefakte gewertet werden (*von Knobloch, 2002*).



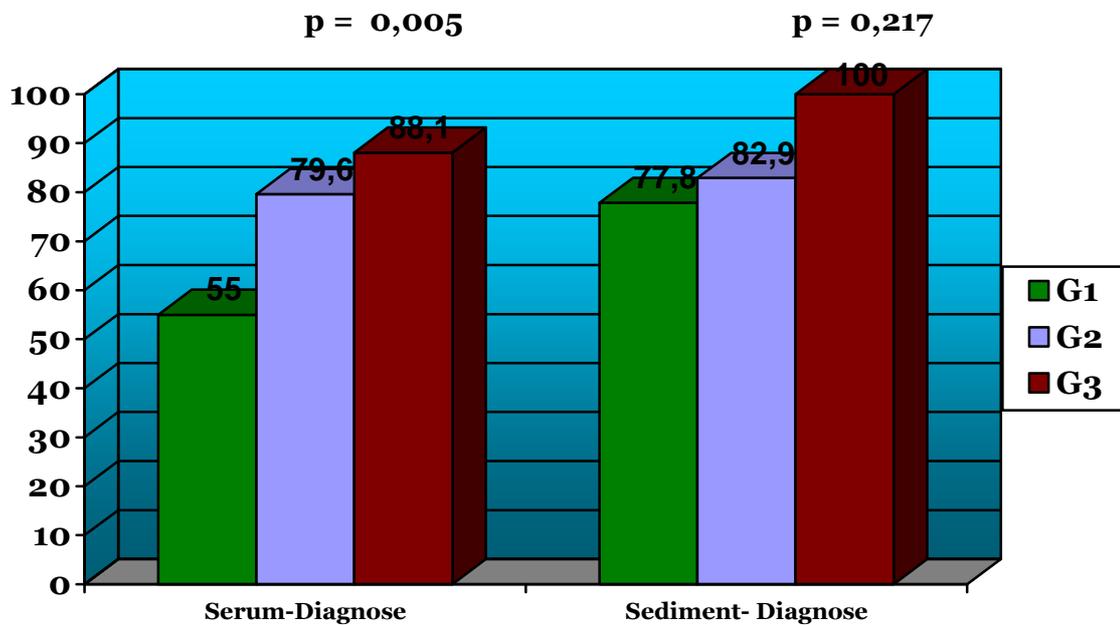
**Abbildung 14:** Inzidenz von DNA-Alterationen in Tumor (n=117), Serum (n=112) und Urin (n=75), untersucht an 8 verschiedenen chromosomalen Regionen mit insgesamt 10 Mikrosatellitenmarkern.

X-Achse: Chromosomale Regionen mit Alterationen  
Y-Achse: % Tumoren mit Alterationen



**Abbildung 15:** Unterschiedliche Inzidenzen von Serum- und Sediment-DNA-Alterationen in Abhängigkeit von nicht muskelinvasivem (pTa + pT1) und muskelinvasivem (pT2-pT4) Tumorwachstum.

Y-Achse: %



**Abbildung 16:** Abhängigkeit von Serum- und Sediment-DNA-Alterationen vom Kerndifferenzierungsgrad des Tumors.

Y-Achse: %

**Tabelle 09:** Inzidenz von DNA-Alterationen in Tumor, Serum und Sediment stratifiziert nach den einzelnen Mikrosatellitenmarkern (Wertetabelle zu Abb. 13)

Chromosom	Marker	Alterationen in:	Tumor <sup>1</sup> (%)	Serum <sup>2</sup> (%)	Sediment <sup>3</sup> (%)
<b>5q</b>	D5S1720		<b>40</b>	<b>23 (0)</b>	<b>32 (4)</b>
<b>8p</b>	D8S261		<b>42</b>	<b>19 (0)</b>	<b>26 (3)</b>
	D8S560		<b>42</b>	<b>23 (0)</b>	<b>27 (1)</b>
<b>9p</b>	D9S171		<b>55</b>	<b>1 (0)</b>	<b>31 (0)</b>
	D9S925		<b>53</b>	<b>17 (0)</b>	<b>32 (0)</b>
<b>9q</b>	D9S15		<b>48</b>	<b>21 (0)</b>	<b>39 (1)</b>
<b>13q</b>	D13S153		<b>41</b>	<b>16 (1)</b>	<b>30 (3)</b>
<b>14q</b>	D14S750		<b>46</b>	<b>25 (0)</b>	<b>30 (1)</b>
<b>17q</b>	D17S1306		<b>36</b>	<b>19 (1)</b>	<b>24 (0)</b>
<b>20q</b>	D20S486		<b>37</b>	<b>20 (0)</b>	<b>22 (1)</b>

<sup>1</sup> 100 % = n = 117 Tumoren; <sup>2</sup> 100 % = n = 112 Serumproben; <sup>3</sup> 100 % = n = 75 Urin-Sedimentproben  
Werte gerundet, Werte in Klammern = zusätzlich identifizierte unspezifische allelische Imbalanz (AI)  
(100 % = dem jeweiligen n (117/112/75))

### 4.3. Urin-DNA-Alterationen

Bereits in mehreren Arbeiten wurde die MSA zur urinbasierten Diagnostik des Harnblasenkarzinoms angewendet (*Mao et al., 1996; Steiner et al., 1997; Mouraht et al., 1998; von Knobloch et al., 2001; von Knobloch 2002*). In dieser Arbeit wurde die MSA mit 10 polymorphen Markern der chromosomalen Regionen 5q, 8p, 9p, 9q, 13q, 14q, 17q und 20q zur Urindiagnostik bei 75 Patienten, die an einem Urothelkarzinom der Harnblase erkrankten, angewendet.

In den Sedimentproben konnten bei pTa und pT1 Tumoren in 85,5% und bei pT2-pT4 Tumoren in 94,7% Alterationen nachgewiesen werden. Die häufigsten Alterationen fanden sich bei den Regionen 5q, 9p und 9q für pTa/pT1 sowie 8p, 9p und 14q für pT2-pT4. Bei dem CIS konnte in 40% (4 von 10 Markern) eine Alteration entdeckt werden. Bei der Probe mit dem Adenokarzinom fehlte die Sedimentprobe, so dass hier keinerlei Aussage getroffen werden konnte. Der neuroendokrine Tumor konnte über die Sediment-Probe bei 2 von 10 Markern identifiziert werden. Bei maximal 4% der Proben zeigten sich unspezifische allelische Imbalanzen, d.h. Marker, bei denen die Alterationen im Tumor nicht erkannt wurden, zeigten Alterationen im Sediment (siehe Tab. 09).

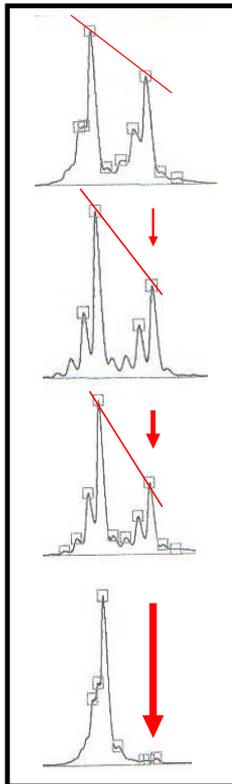
### **4.3.1. Inzidenz**

In 86,7% der untersuchten Proben (65 von 75) konnten tumorspezifische Urin-DNA-Alterationen gefunden werden. In den chromosomalen Regionen 5q, 9p und 9q zeigten sich solche Alterationen am häufigsten (31,1 – 39,2%) (Abb.14). Ebenfalls in Abbildung 14 sind die Häufigkeiten von Alterationen der übrigen chromosomalen Regionen dargestellt. Die Spezifität dieser Methode weist einen Wert von über 90% auf, weil in nicht mehr als 4% Urin-DNA-Alterationen ohne Korrelat der entsprechenden Tumor-DNA entdeckt wurde (Tab. 09; Abb. 17, 18 und 19). Mit den 6 sensitivsten Markern der vorliegenden Serie (D5S170, D9S171, D9S925, D9S15, D13S153 und D14S750) konnte eine Gesamtsensitivität von 78,7% für den urinbasierten Tumornachweis erzielt werden.

### **4.3.2. Assoziation mit klinisch-pathologischen Prognoseparametern**

Bei pTa/pT1 Tumoren konnten 47 von 55 Tumoren identifiziert werden (85,5%), muskelinvasive Tumore sogar in 18 von 19 Fällen (94,7%). Eine signifikante Assoziation ergab sich bei einem p-Wert von 0,234 nicht. Bei mässig-schlechter Kerndifferenzierung der Tumoren wurden 60 von 67 Proben identifiziert bei einem Signifikanz-Wert von  $p = 0,217$  (Mann-Whitney-Test). Gut differenzierte Tumore wurden noch in 77,8% (14 von 18) (siehe Abb. 16) identifiziert. Insgesamt konnten 73,3% der pTaG1-Tumoren durch DNA-Alterationen des Urinsedimentes diagnostiziert werden.

D9S171



Normal-DNA

Serum-DNA: Allelic Imbalance

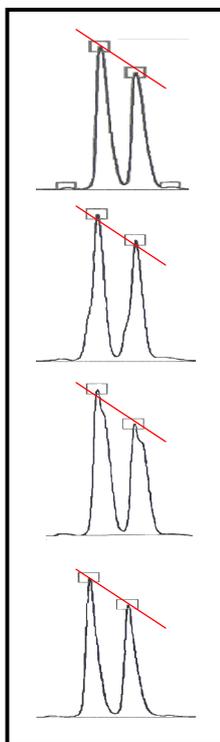
Urin-DNA: Allelic Imbalance

Tumor-DNA: Loss of heterozygosity

**Abbildung 17:**

Exemplarisches Ergebnis der Fluoreszenzmikrosatellitenanalyse für Normal-, Serum-, Urinsediment- und Tumor-DNA beim Harnblasenkarzinom (Probe 239) (pT1G3). Es zeigen sich deutliche Allelverluste. Durch die tumorspezifischen Allelveränderungen war eine Serum- und eine Urindiagnose möglich. Die deutlichen Allelverluste der Tumor-DNA zeigt das Vorliegen sauberer Tumor-DNA.

D5S1720



Normale-DNA

Serum-DNA: R

Urin-DNA: R

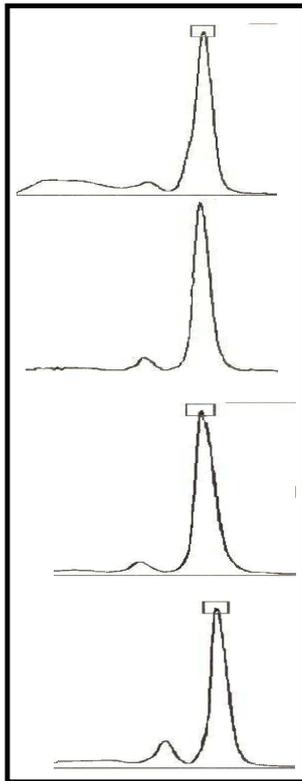
Tumor-DNA: R

**Abbildung 18:**

Exemplarisches Ergebnis der Fluoreszenzmikrosatellitenanalyse für Normal-, Serum-, Urin- und Tumor-DNA beim Harnblasenkarzinom (Probe 205) (pTa G2). Es zeigen sich keinerlei Veränderung i.S. einer Alteration, so dass dies als „R“ gewertet werden musste.

R = keine Alteration

D20S486



Normal-DNA:

Serum-DNA: X

Urin-DNA: X

Tumor-DNA: X

**Abbildung 19:**

Exemplarisches Ergebnis der Fluoreszenzmikrosatellitenanalyse für Normal-, Serum-, Urin- und Tumor-DNA beim Harnblasenkarzinom (Probe 72) (urotheliale Dysplasie). Es zeigen sich keine heterozygoten zwei Allele, sondern ein homozygoten Ergebnis, somit als „X“ bewertet. (Probe nicht in die Auswertung eingegangen).

X = homozygot (nicht informativ)

## 5. Diskussion

Das Urothelkarzinom der Harnblase ist der 4. häufigste Tumor des Mannes (4,6%) und 12. häufigste Tumor bei Frauen (2%). Es ist die Tumorentität mit der höchsten Rezidivneigung (60-70%) aller soliden Tumore. 11% dieser Karzinome führen innerhalb von 5 Jahren zum Progress im Sinne eines muskelinvasiven Wachstums (*Kiemeney et al., 1993; Sylvester et al., 2006*). Bei Erstdiagnose haben etwa 30% bereits ein muskelinvasives Tumorstadium. Von diesen entwickelt die Hälfte innerhalb von 2 Jahren Metastasen und 60% versterben innerhalb von 5 Jahren, unabhängig davon, welche Therapie gewählt wird (*Herman et al., 2008*). Das Lebenszeitrisiko an einem Urothelkarzinom der Blase zu erkranken, liegt bei Männern bei 2,8% und bei Frauen bei 0,9%. Bei rechtzeitiger Früherkennung liegt die 5-Jahres-Überlebensrate bei über 70%. Das Urothelkarzinom der Blase produziert durch den hohen Aufwand regelmäßiger Nachsorgen sehr hohe Kosten pro Patient. In den USA belaufen sich die Kosten auf 96.000 bis 187.000 \$ pro Patient. (*Botteman et al., 2003; Scelo et al., 2007; Cooksley et al., 2008; Jungmann et al., 2009*).

Der maligne Tumor stellt eine genetische Erkrankung dar. So konnten tumorspezifische Alterationen bzw. sogar einzelne Tumorgene mittels molekulargenetischer Analysen nachgewiesen werden. Das Zusammentreffen mehrerer genetischer Einzelereignisse hat zu einem besseren Verstehen der Kanzerogenese geführt und somit eine Charakterisierung der Tumoren ermöglicht. Einige molekulargenetische Klassifikationen konnten bereits durch konstante Alterationsmuster etabliert werden. Dies hat den Vorteil, unabhängig vom Untersucher und von morphologischer Variabilität und somit reproduzierbar zu sein (*Kovacs et al., 1997; Störkel et al., 1997; Kovacs, 1999*). Die prognostische Bedeutung eines molekularen Tumorprofils im Hinblick auf das heterogene biologische Verhalten vieler Tumore liegt somit parallel zur konventionellen Histopathologie vor und kann so auch einen entscheidenden Einfluss auf die zu wählende Therapie haben (*Willman, 1999; Bartelink et al., 1999; Martin et al., 2000*). Der pT1 G3 Tumor der Harnblase dient dabei als repräsentatives Beispiel, da die Therapieoptionen durchaus kontrovers diskutiert werden. Es ist die für den Patienten entscheidende Frage zu klären, ob eine blasenerhaltende Instillations-therapie oder eine Zystektomie mit der Notwendigkeit einer Harnableitung angestrebt wird. Bei der weniger invasiven Option der blasenerhaltenden Therapie muss jedoch in 10 – 30% der Fälle mit einem Progress der Tumorerkrankung und

somit der tumorbedingten Mortalität gerechnet werden. Bei der primären Radikaloperation werden allerdings 70 – 90% einer Übertherapie zugeführt (Holmäng *et al.*, 1995; Herr, 1997; Sauter & Mihatsch, 1998; Herr & Reuter, 1999; Brake *et al.*, 2000; von Knobloch *et al.*, 2000). Obwohl bereits viele molekulargenetische Charakteristika des Harnblasenkarzinoms identifiziert worden sind, haben molekulare Marker zur Beurteilung der Prognose von oberflächlichen Blasenkarzinomen noch keine entscheidende Rolle eingenommen und somit bisher keinen regelhaften Einsatz in der Klinik erreicht. Zusätzlich ist die deutlich erhöhte Rezidivneigung oberflächlicher Blasenkarzinome nach transurethraler Resektion (TUR) ein Problem, da so ein aufwendiges Nachsorgeprotokoll für den Patienten notwendig wird (Holmäng *et al.*, 1995). Dieses Rezidivpotential kann bislang durch genetische Daten nicht dargestellt werden. So genannte „Felddefekte“, also Instabilitäten des gesunden Übergangsepithels, könnten die Ursache für diese Rezidivneigung der oberflächlichen Blasenkarzinome sein (Habuchi *et al.*, 1993a; Takahashi *et al.*, 1998; Simon *et al.*, 2001).

Der Goldstandard der Nachsorge bei Patienten, die an einem oberflächlichen Blasenkarzinom erkrankten, ist nach wie vor die Zystoskopie und Spülzytologie (Jacobs *et al.*, 2010). Bei der Zytologie werden abgeschilferte Urothelzellen nach Papanicolaou gefärbt und vom Pathologen beurteilt (Papanicolaou *et al.*, 1945; Sullivan *et al.*, 2010). Bei der Zystoskopie können jedoch flache Läsionen übersehen werden. Die Verwendung der fluoreszenzgesteuerten Zystoskopie (PDD = Photodynamische Diagnostik) hat die Identifikation solcher Läsionen einen Schritt weitergebracht, ist allerdings in Spezifität und Sensitivität nicht befriedigend. Eine Aussage über die Wachstumstiefe des Tumors kann nicht getroffen werden. Jedoch ist eine genauere Bestimmung der Ausdehnung und Anzahl multilokulärer Tumore möglich. Bei der PDD werden photoaktive Substanzen (das in Europa seit 2007 zugelassene Hexyl-ALA-Ester) intravesical 1-2 Stunden vor der Zystoskopie appliziert. Eine höhere Detektionsrate an high-grade Tumoren sowie eine Reduktion von Residualtumoren bei einer TUR-B konnte damit erreicht werden. Eine Senkung der Rezidivrate ergab sich jedoch nicht (Zaak *et al.*, 2007). Durch die notwendigen regelmäßigen Kontrollzystoskopien kommt es zur Einschränkung der Lebensqualität der betroffenen Patienten. Zusätzlich besteht die Gefahr der Bildung von Harnröhrenstrikturen. Ein weiteres Problem ist der bereits oben genannte hohe finanzielle Aufwand (Cooksley *et al.*, 2008). Die Spülzytologie hat im Bereich der Sensitivität bei gut differenzierten Tumoren ihre Grenzen, da diese etwa bei 17 bis 38% liegt (Wiener *et al.*, 1998). Diese Methode ist

durch äußere Faktoren störanfällig und in einem hohen Maße auch vom jeweiligen Untersucher und dessen Expertise abhängig (*Nielsen et al.*, 2006). Somit besteht die Notwendigkeit ein nicht invasives, hochsensitives und spezifisches Urindiagnostikum für das Harnblasenkarzinom zu entwickeln. Bei high-grade Tumoren liegt die Sensitivität dagegen bei 80 - 95% (*vom Dorp et al.*, 2008).

Ebenfalls fehlen zuverlässige serologische Marker, die vor allem im zeitlichen Verlauf der Tumornachsorge nach durchgeführter tumorablativer Radikalchirurgie ein Tumorrezidiv detektieren können, bevor es durch bildgebende Verfahren morphologisch nachzuweisen ist. Es besteht somit die Notwendigkeit, nicht invasive Untersuchungsmethoden zu etablieren, die einerseits eine Früherkennung ermöglichen (unter Umständen auch als Screening bei Hochrisikogruppen), aber andererseits auch im Bereich der Nachsorge (bezüglich einer Rezidivdiagnose) bzw. einer möglichen Beurteilung des Progressionsrisikos nach transurethral erfolgter Karzinomdiagnose wegweisende Erkenntnisse liefern können. Solch ein Marker sollte im Urin oder Serum standardisiert messbar sein. Es existieren zahlreiche Studien, um solch geeignete Tumormarker zu finden, jedoch gibt es keine groß angelegten relevanten Studien hierzu (*Hautmann et al.*, 2007).

Die Hämaturie als einfachster Marker dagegen ist gut untersucht, bietet bei hoher Sensitivität jedoch eine ungenügende Spezifität.

In dieser Arbeit wurde die Mikrosatellitenanalyse zur molekularen Diagnostik des Urothelkarzinoms der Harnblase angewendet. Mit diesem Verfahren können bestimmte Chromosomenabschnitte gezielt analysiert werden. Es werden Polymorphismen erkannt und somit eine Unterscheidung zwischen einzelnen Allelen ermöglicht. Spezifische Genabschnitte (Loci) werden mittels PCR exponentiell amplifiziert. Mit modernen DNA-Analysesystemen (z.B. „ALFexpressII®“, Amersham Pharmacia Biotech) zusammen mit einer Fluoreszenzmarkierung der PCR-Produkte können Allelverluste (LOH) sowie eine allelische Imbalanz (AI), ein Allelungleichgewicht, schnell nachgewiesen werden. Diese AI kann durch Duplikation eines Allels mit einem resultierenden Allelverhältnis von 2:1 oder dem Verlust eines Allels in einer Subpopulation der Tumorzelle (Mosaizismus) verursacht sein. Da bereits kleinste Mengen der zu amplifizierenden DNA ausreichen und mittlerweile zahlreiche Mikrosatellitenmarker zur Verfügung stehen, konnte sich diese Methode in vielen Bereichen der genetischen Analyse von Tumoren etablieren (*Kovacs*, 1999).

Zusätzlich zur Analyse des Primärtumors können mit der MSA auch Körperflüssigkeiten oder –sekrete untersucht werden, um tumorspezifische Alterationen in minimalen Mengen freier bzw. zellgebundener DNA nachzuweisen. Gegenüber der RNA und den Proteinen hat die DNA als Basis eines molekularen Tumormarkers den Vorteil, wesentlich stabiler zu sein. Sie ist somit sehr gut für eine sichere und klinisch anwendbare Methode zur Tumordiagnostik geeignet. Zusätzlich bietet der DNA basierte Tumornachweis eine Spezifität von bis zu 100% (*Sidransky, 1997; Bartoletti et al., 2005*).

In der hier vorliegenden Arbeit wurde die Methode der MSA bei der genetischen Charakterisierung des Harnblasenkarzinoms sowie beim serologischen Tumornachweis und urinbasierten Tumornachweis angewendet.

### **5.1. Genetische Charakterisierung des Harnblasenkarzinoms**

An den 8 untersuchten chromosomalen Regionen (n = 117) konnten Alterationen in 35,7% bis 54,8 % der Fälle nachgewiesen werden. Alterationen der Chromosomen 8p, 9p, 9q und 14q mit 41,7 % bis 54,8% waren am häufigsten. Die höchste Inzidenz eines LOH („loss of heterozygosity“) wurde für die Regionen 9p und 9q mit den beiden Markern D9S15 und D9S925 in 26,50% gemessen. (Tab. 8 und 9; Abb. 11; 12 und 13). Eine signifikante Assoziation zwischen LOH und muskelinvasivem Tumorstadium bzw. mäßig-schlechter Kerndifferenzierung konnte nicht berechnet werden. Eine Lymphknotenmetastasierung war signifikant mit einer Alteration an der chromosomalen Region 9p (D9171 und D9S925) zu beobachten. Sowohl das Muster der Alterationen als auch deren Häufigkeiten zeigten zwischen pTa/pT1 Tumoren und den muskelinvasiven pT2 – pT4 Tumoren genauso wie zwischen gut differenzierten (G1) und mäßig-schlecht differenzierten (G2 – G4) Tumoren deutliche Unterschiede (Abb. 12 und 13).

Die Auswahl der Tumormarker basiert auf den Voruntersuchungen vor allem von Knobloch und seinen Arbeitsgruppen. So konnte dabei eine Assoziation von Allelverlusten bei fortgeschrittenen Tumorstadien und schlechter Kerndifferenzierung an den chromosomalen Regionen 5q und 17q nachgewiesen werden. Ein LOH an 8p war mit fortgeschrittenem Tumorstadium assoziiert.

Alterationen bei Chromosom 9 wurden für das Urothelkarzinom der Harnblase als initiale Ereignisse bei der Karzinogenese betrachtet (*Dalbagni et al., 1993; Knowles et al., 1994; Spruck et al., 1994; Richter et al., 1997; Knowles, 1999; Legrand et al., 2011*). Durch die Ergebnisse dieser Arbeit kann diese Aussage unterstützt werden,

da bei 27 der 40 untersuchten pTa Tumore Alterationen des 9. Chromosoms zusammen mit anderen untersuchten Chromosomen und bei 5 von 40 pTa Tumoren (12,5%) ausschließlich im Bereich des Chromosoms 9 nachgewiesen wurden. Aufgrund dieser Häufung solcher Alterationen beim Harnblasenkarzinom war ein Ziel vorangegangener Arbeiten, die Tumorsuppressorgene, die auf Chromosom 9 lokalisiert sind, zu identifizieren. Homo- und hemizygoten Deletionen des p16 Genlocus wurden als Schlüsselereignisse der Tumorgenese postuliert (Cairns *et al.*, 1995; Orlov *et al.*, 1995; Stadler & Olopade, 1996). Es gelang bereits an Chromosom 9q eine potentielle Tumorsuppressorregion soweit einzugrenzen, dass ein solches dort vermutetes Tumorsuppressorgen auf 9q32-q33 bereits mit der Bezeichnung DBC1 („deleted in bladder cancer 1“) belegt wurde (Habuchi *et al.*, 1997; Habuchi *et al.*, 1998). Ebenfalls wird dem Tuberose Sklerose Gen TSC1 auf 9q34 eine potentielle Beteiligung zugeschrieben (Hornigold *et al.*, 1999). Dass Veränderungen des Chromosoms 9 bei der Entwicklung eines Harnblasenkarzinoms frühe Ereignisse sind, konnte Hartmann *et al.* durch die Identifikation von Alterationen dieses Bereiches bei prämaligen Schleimhautauffälligkeiten der Harnblase zeigen (Hartmann *et al.*, 1999).

Ein LOH des Chromosoms 8 (D8S261 und D8S560) konnte in dieser Arbeit lediglich mit einer Inzidenz von gesamt 26,5% (einzeln 14,5% bzw. 18,0%) identifiziert werden ( $p = 0,649$  bzw.  $0,362$ ). Dieses Ergebnis deckt sich mit bisherigen Studien, die eine Inzidenz von 22 – 31% beschrieben (Knowles *et al.*, 1994; Takle & Knowles, 1996b; Legrand *et al.*, 2011). Die Vorgängerarbeit von von Knobloch kam auf eine Inzidenz von 55 – 57% (von Knobloch, 2002). In dieser Arbeit von 2002 wurde bei fast doppelter Anzahl an Mikrosatellitenmarkern (17) diese höhere Inzidenz an 8p-Deletionen mit dem höheren Anteil muskelinvasiver Tumore erklärt. Ein fortgeschrittenes Tumorstadium und eine schlechte Kerndifferenzierung waren dort signifikant mit einem 8p-Verlust assoziiert. Betrachtet man in der vorliegenden Arbeit ausschließlich die pT4 Tumore, kommt man auf eine Inzidenz von gesamt 75% (einzeln 37,5% bzw. 62,5%). Ein LOH an Chromosom 8p kann somit als prognostisch ungünstig gewertet werden (Takle & Knowles; 1996b; Bubendorf *et al.*, 1997, von Knobloch, 2002). Auch bei anderen Tumorentitäten, wie dem Prostata-, dem konventionellen Nierenzellkarzinom oder dem kolorektalem Karzinom, werden 8p-Deletionen beobachtet und mit einer schlechten Prognose verknüpft (Bova *et al.*, 1993; Crundwell *et al.*, 1996; Schullerus *et al.*, 1997; Chughtai *et al.*, 1999; von Knobloch *et al.*, 2004). Beim Harnblasenkarzinom grenzte man den möglichen Locus des Tumorsuppressorgens

um 8p23 ein (*Sunwoo et al., 1999; Ohgaki et al., 1999; Muschek et al., 2000*). Da Chromosom-8-Alterationen gehäuft bei soliden Tumoren und dem Carcinoma in situ identifiziert werden, könnte eine 8p-Deletion ein Schlüsselereignis eines zweiten Entstehungsweges des Harnblasenkarzinoms neben dem Chromosom 9 Verlust sein, vor allem im Hinblick auf die verschiedenen postulierten Entstehungswege dieser Tumorentität (*Dalbagni et al., 1993; Spruck et al., 1994; Rosin et al., 1995*).

In vorangegangenen Arbeiten wurde ein LOH an den Chromosomen 13q und 14q als Marker für eine ungünstige Prognose gewertet. Bei von Knobloch konnte eine Assoziation zwischen schlechter Kerndifferenzierung und fortgeschrittenem Tumorstadium herausgearbeitet werden. Bei 13q in 28 – 34% und bei 14q in 27 – 38% (*von Knobloch, 2002*). Das Tumorsuppressorgen Rb (Retinoblastoma-Gen) ist auf dem Chromosomenarm 13q lokalisiert. Eine Alteration dieser Region bzw. eine Mutation des Rb-Gens wurde in zahlreichen Studien als prognoseassoziiert beschrieben (*Cairns et al., 1991; Xu et al., 1993; Cordon-Cardo et al., 1997; Sarkar et al., 2000; Korkolopoulou et al., 2001*). Ein LOH des Chromosomenarms 14q wurde besonders bei fortgeschrittenen Tumoren und dem Carcinoma in situ beobachtet (*Chang et al., 1995; Rosin et al., 1995*). Inzidenzen dieser Alteration wurden in bis zu 70% bei invasiven Tumoren beschrieben (*Chang et al., 1995*). Auch bei der Progression des konventionellen Nierenzellkarzinoms besteht eine Assoziation zur Alteration dieser chromosomalen Region (*Herbers et al., 1997*). In dieser Arbeit zeigte sich ein LOH des Chromosoms 13q bei invasiven Tumoren mit einem Signifikanzwert von  $p = 0,838$  und bei mäßig-schlechter Kerndifferenzierung mit einem p-Wert von  $0,476$ . Bei Chromosomenarm 14q konnte ein LOH bei muskelinvasiven Tumoren in 10,6% ( $p = 0,497$ ) und bei schlechter Kerndifferenzierung in 11,6% ( $p = 0,544$ ) identifiziert werden. Bei pTa/pT1 Tumoren wurden bei 13q in 8,8% und bei 14q in 13,2% ein LOH erkannt. Der Nachweis bei einer guten Kerndifferenzierung gelang für beide Regionen bei 1 von 22 Tumoren (4,5%).

Die guten Werte der Sensitivität in den Vorarbeiten mit 17 Markern konnten trotz Reduktion der Markerzahl auf 10 Marker in dieser Arbeit bestätigt werden. Das letztendliche Potential der analysierten molekularen Marker muss anhand des weiteren Krankheitsverlaufes der untersuchten Patienten im Rahmen der Nachsorge überprüft bzw. objektiviert werden. Weitere prognostische Aspekte im Hinblick sowohl auf die Wahl der weiteren Therapie als auch auf den individuellen Nachsorgeplan der betroffenen Patienten nach primärer Operation eines

Harnblasenkarzinoms können durch die molekulare Analyse von bestimmten Markeregionen zum Operationszeitpunkt erarbeitet werden. Es gelang mit dieser Arbeit, die Anzahl der zu verwendenden Marker bei gleich guten Ergebnissen um fast die Hälfte im Vergleich zur Vorgängerarbeit zu reduzieren.

## 5.2. Serum-DNA-Analyse

Tumorspezifische Alterationen der Serum-DNA konnten mit 10 polymorphen Markern der chromosomalen Regionen 5p, 8p, 9p, 9q, 13q, 14q, 17q und 20q in 77,7% (87/112) nachgewiesen werden. In der Vorgängerarbeit von 2004 mit 61 Patienten und 17 Markern wurde eine ähnliche Sensitivität von 80,3% erreicht. Die höchste Frequenz in Alterationen wird bei 8p mit 36% angegeben (*von Knobloch et al.*, 2004). In der vorliegenden Arbeit waren 9p-Alterationen mit einer Inzidenz von 33% am häufigsten. Es folgten 14q-Alterationen (25%) und 5q- bzw. 8p-Alterationen (je 23,2%). Alterationen an den anderen chromosomalen Regionen wurden in 16,1 bis 21,4% detektiert (Abb. 14). In der vorliegenden Auswertung konnte statistisch bei 112 Patienten keine Abhängigkeit des Nachweises von Serum-DNA-Alterationen mit muskelinvasivem Tumorstadium ( $p = 0,062$ ; Mann-Whitney-Test) berechnet werden. Bei mäßig-schlechter Kerndifferenzierung des Primärtumors zeigte sich eine signifikante Assoziation ( $p = 0,005$ ; Mann-Whitney-Test) (Abb. 15 und 16).

Eine Serum-DNA-Alteration wurde nur als solche gewertet, wenn eine Korrespondenz zu einer Alteration in der Tumor-DNA bestand (Abb. 17, 18 und 19). Diskordante AI fand sich mit einer Inzidenz von 0 – 1% in Abhängigkeit des verwendeten Markers und wurde als Artefakt bewertet (Tab. 09). Für die Spezifität wird auf Daten von von Knobloch zurückgegriffen. Bei dieser Arbeit wurde durch die Analyse von 20 gesunden Probanden mit insgesamt 17 Markern die Spezifität überprüft. In Übereinstimmung mit der Serum-DNA der Tumorpatienten konnte die Spezifität der Methode mit 80% errechnet werden, da bei 4 Probanden insgesamt 7 unspezifische AI in 340 Kontroll-PCRs (2%) gefunden wurden (*von Knobloch*, 2002; *von Knobloch et al.*, 2004).

Da sich bereits pTa/pT1-Tumoren mit einer Sensitivität von 72,7% serologisch nachweisen lassen, kann man für diese Methode eine Stadienunabhängigkeit postulieren (Abb. 16). Bei vorangegangenen Studien und anderen Tumorentitäten konnten ähnliche Ergebnisse vorgelegt werden (*Goessl et al.*, 1998; *Chen et al.*,

1999; *Sozzi et al.*, 1999; *Coulet et al.*, 2000; *Shaw et al.*, 2000; *von Knobloch*, 2002; *von Knobloch et al.*, 2004).

Wie bei von Knobloch 2002 und 2004 konnte auch in dieser Arbeit nach Auswertung der 112 untersuchten Patienten eine klare Abhängigkeit der serologischen Tumordiagnose vom Kerndifferenzierungsgrad des Tumors errechnet werden ( $p = 0,005$ ; Mann-Whitney-Test; Abb. 15) (*von Knobloch*, 2002; *von Knobloch et al.*, 2004). Dies kann nachvollzogen werden, da schlecht differenzierte Tumoren eine erhöhte Proliferationsrate bei gleichzeitig erhöhter genetischer Instabilität aufweisen (*Stroun et al.*, 1987; *Anker et al.*, 1999; *Anker*, 2000). Leon und Shapiro haben in Pionierarbeiten zur Serum-DNA-Bestimmung gezeigt, dass die Konzentration an freier Serum-DNA bei Tumorpatienten höher war als bei Patienten mit benigner Grunderkrankung bzw. gesunden Probanden (*Leon et al.*, 1977; *Shapiro et al.*, 1983). In den eben zitierten Veröffentlichungen war in der Gruppe der Tumorpatienten die Konzentration jedoch unabhängig von der Größe des Tumors und dem lokalen Stadium und zeigte lediglich bei Metastasierung einen signifikanten Anstieg.

Die Sensitivität der Methode zum serologischen Tumornachweis dieser Arbeit mit 77,7% deckt sich mit dem Wert von von Knobloch (79,3%) und ist im Vergleich zu den Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen (0 – 71%) mit der gleichen Methode deutlich höher (*Chen et al.*, 1996; *Nawroz et al.*, 1996; *Goessl et al.*, 1998; *Hibi et al.*, 1998; *Chen et al.*, 1999; *Silva et al.*, 1999; *Shaw et al.*, 2000; *Sozzi et al.*, 2001; *von Knobloch*, 2002, *Legrand et al.*, 2011). Dies konnte bei von Knobloch auf den Einsatz einer größeren Anzahl von Mikrosatellitenmarkern zurückgeführt werden. In dieser Arbeit wurden 17 Marker verwendet. In den anderen oben genannten Studien wurden lediglich zwischen 2 und 12 Marker eingesetzt. Die vorliegende Studie wurde mit 10 Markern durchgeführt und bestätigt somit die guten Ergebnisse von von Knobloch trotz fast halbiertes Markerzahl. Die höchste Sensitivität konnte für die chromosomale Region 9p mit dem Marker D9S925 mit 33% erzielt werden (Abb. 14). Legrand und seine Arbeitsgruppe konnten mit 20 Markern für 9p eine Sensitivität von 35%, also ein fast identisches Ergebnis benennen (*Legrand et al.*, 2011). Auch die Eigenschaften der einzelnen Marker sowie die Größe der PCR-Produkte nehmen neben der Inzidenz der Alterationen im Tumor Einfluss auf die Sensitivität. Dies liegt daran, dass die freie Serum-DNA fragmentiert vorliegt (Tab. 09) (*von Knobloch et al.*, 2001). In dieser Arbeit konnten für das Harnblasenkarzinom 5 sensitive Marker ermittelt werden (D5S170, D8S560, D9S15, D9S925 und D14S750) mit einer Gesamtsensitivität von 69,9% für

die Serumdiagnose. Bei vertretbarem Aufwand und Kosten könnte die Methode mit oben genannten Markern als serologisches Diagnostikum klinisch im Bereich der Patientennachsorge nach radikalchirurgischer Therapie bei invasiven und schlecht differenzierten Tumoren dienen, um vor dem morphologischen Rezidivnachweis mittels bildgebender Verfahren ein lokales oder Fernrezidiv zu detektieren, solange sich diese noch im Stadium der Mikrometastasierung befinden.

### 5.3. Urin-DNA-Analyse

Ebenso wie bei der Untersuchung der Serum-DNA wurden in dieser Arbeit 10 polymorphe Marker der chromosomalen Regionen 5q, 8p, 9p, 9q, 13q, 14q, 17q und 20q zur Urindiagnostik bei 75 Patienten mit Urothelkarzinom der Harnblase verwendet. Die Auswahl der Marker beruht auf der Vorarbeit von Knobloch und reduzierte die eingesetzte Markerzahl von 17 auf die 10 vielversprechendsten Marker. Es konnten in 86,7% tumorspezifische Urin-DNA-Alterationen der analysierten Proben (65 von 75) identifiziert werden. Die chromosomalen Regionen 5q, 9p und 9q wiesen in 31,1 bis 39,2% die höchste Inzidenz in Alterationen auf (Abb. 14). Die Spezifität dieser Methode kann mit über 90% angegeben werden, da in nicht mehr als 4% Alterationen der Urin-DNA ohne Korrelation zu der untersuchten Tumor-DNA gefunden wurden (Tab. 11; Abb. 17, 18 und 19). Wie bereits bei der Serum-DNA-Diagnostik können diese unspezifischen Alterationen als PCR-Artefakte gewertet werden. Die Sensitivität der Methode bei schlecht differenzierten Tumoren war jedoch schlechter. Eine Assoziation zu schlechter Kerndifferenzierung konnte bei einem Signifikanz-Wert von  $p = 0,217$  (Mann-Whitney-Test) nicht berechnet werden. Dennoch erreichte diese Methode eine Sensitivität von 73,3% für Diagnose von pTaG1-Tumoren anhand spezifischer DNA-Alterationen des Urinsedimentes. Dieser Wert liegt deutlich über der Sensitivität der Zytologie, die bei diesem frühen Tumorstadium mit weniger als 40% richtig positive Ergebnisse erbringt (*Murphy et al.*, 1990; *Wiener et al.*, 1993).

Am sensitivsten waren die Marker D5S170, D9S171, D9S15, D9S925 und D13S153. Sie erzielten zusammen eine Sensitivität von 75,7%. In vorherigen Arbeiten (unter anderem die Pionierarbeit von Steiner et al.) zur Mikrosatellitenanalyse von DNA-Alterationen des Urinsedimentes zur Diagnostik von Harnblasenkarzinomen ergaben sich Werte zwischen 71 bis 90% (*Steiner et al.*, 1997; *Mourah et al.*, 1998; *von Knobloch*, 2002; *Legrand et al.*, 2011). Die 90% von Steiner wurden bei 20 Patienten mit 20 verschiedenen Mikrosatellitenmarkern erreicht. Die

Arbeitsgruppe um von Knobloch verwendete noch 17 Mikrosatellitenmarker und bezifferte die Sensitivität mit 71%. Somit ist bei der vorliegenden Arbeit mit „nur“ 10 Mikrosatellitenmarkern und einer Gesamtsensitivität von 75,7% die Wertigkeit dieser Methode weiter bestätigt worden und ein Ziel dieser Arbeit, die Reduktion der eingesetzten Markerzahl bei gleicher oder besserer Sensitivität, erreicht worden. Dazu muss erwähnt werden, dass im Gegensatz zu Steiner in dieser Arbeit die Gewinnung des Urinsedimentes nicht über eine Spülzytologie, sondern über die weniger invasive Methode mittels Abgabe eines Spontanurins erfolgte.

Im Vergleich zu anderen molekularen und zytogenetischen Urinanalyseverfahren, bietet die Mikrosatellitenanalyse bei guter Sensitivität besonders auch in frühen Tumorstadien eine sehr hohe Spezifität. RT-PCR für Cytokeratin 20, Bestimmung der Telomeraseaktivität sowie FISH erreichen Sensitivitäten von 63 bis 91% bei Spezifitäten von 73 bis 99% (*Meloni et al.*, 1993; *Sugano et al.*, 1997; *Heine et al.*, 1998; *Müller et al.*, 1998; *Buchumensky et al.*, 1998; *Junker et al.*, 1999; *Bubendorf et al.*, 2001; *Ishiwata et al.*, 2001). Die oben genannten molekularen Methoden sowie die Mikrosatellitenanalyse haben im Vergleich zur Urinzytologie auch bei gut differenzierten oberflächlichen Tumoren noch eine akzeptable Sensitivität. Nicht-molekulare Methoden, welche meist auf dem Nachweis von bestimmten Tumorproteinen beruhen (NMP-22Test, BTA-Test oder BRA-TRAK-Test), haben vor allem im Bereich der Spezifität ihre Defizite (*Wiener et al.*, 1998). Weitere nicht-molekulare Methoden wiesen Sensitivitäten und Spezifitäten von mehr als 80% auf. Einerseits wird Hyaluronsäure und Hyaluronidase nachgewiesen, andererseits mit Immunocyt® ein Antikörper (*Lokesswar et al.*, 1997; *Mian et al.*, 1999). In der vorliegenden Arbeit gelang in 77,8% der Nachweis von G1-Tumoren anhand des Urinsedimentes. Bei der Urin-Zytologie können in diesem Tumorstadium die niedrig malignen Karzinome lediglich mit einer Sensitivität von 10 bis 30% detektiert werden und somit hat die Zytologie, bei hoher Detektionsrate im mittel bis schlecht differenzierten Bereich, hier ihren Schwachpunkt. Somit steht mit der molekularen Tumordiagnose von G1-Tumoren mit der Mikrosatellitenanalyse ein Werkzeug zu Verfügung, welches diese diagnostische Lücke zu schließen in der Lage ist, da eine mehr als doppelt so hohe Sensitivität erreicht wird.

Auch der Nachweis von Prostata- und Nierenzellkarzinomen konnte im Urin bereits bestätigt werden. Bei 25 Patienten wurde für das Nierenzellkarzinom eine Sensitivität von 76% mittels der Mikrosatellitenanalyse angegeben (*Eisenberger et al.*, 1997). Für die Diagnose aus Exprimaturin wurde beim Prostatakarzinom die

Methode der methylierungsspezifischen PCR verwendet. Dabei wird eine für das Prostatakarzinom hochspezifische GSTP1 Gen-Promoterhypermethylierung nachgewiesen (Goessl *et al.*, 2000; Goessl *et al.*, 2001). Somit steht eine nicht-invasive Methode zur Verfügung, die den Nachweis eines Prostatakarzinoms mit einer Sensitivität von 68 bis 78% (n = 40 Proben) bei einer Spezifität von 98% erreicht.

Die hier vorliegenden Daten können als Grundlage zur weiteren Entwicklung der MSA zum nicht-invasiven und somit patientenfreundlicheren urinbasierten Nachweis eines Harnblasenkarzinoms dienen. Solche molekulare Methoden können ebenfalls eingesetzt werden, um auch andere Tumorentitäten des urologischen Fachgebietes, wie das Prostata- oder das Nierenzellkarzinom, nachzuweisen. Dazu müssen weitere Untersuchungen an größeren Patientenkollektiven erfolgen. Ebenfalls sollte der zeitliche, apparative und finanzielle Aufwand durch Weiterentwicklung der Techniken reduziert werden, wenn eine breite klinische Anwendung angestrebt wird.

## **5.4. Zukünftige Anwendungen**

### **5.4.1. Diagnose**

#### **5.4.1.1. Genetische Klassifikation**

Die Klassifizierung und Diagnose von Tumoren werden in den jeweils aktuellen theoretischen Kenntnissen und Hypothesen über die Biologie von Tumoren sowie die technischen Möglichkeiten der Tumorforschung wiedergegeben. Die Möglichkeiten in der molekularen Analyse von Tumoren sowie die phänotyp-unabhängigen genetischen Charakteristika haben beim Nierenzellkarzinom zu einem Klassifizierungssystem geführt, welches allein auf genetischen Veränderungen basiert (Kovacs *et al.*, 1997; Störkel *et al.*, 1997). Das komplette Potential dieser genetischen Klassifizierung ist bislang klinisch noch nicht vollständig ausgeschöpft. Vor allem beim Urothelkarzinom der Harnblase und dem heterogenen biologischen Verhalten dieser Tumorentität, könnten eine Fortführung der genetischen Charakterisierung und eine damit mögliche Klassifizierung im klinischen Alltag einen bedeutenden Stellenwert erlangen. Die genetischen Entstehungswege des Harnblasenkarzinoms sind Mitte der 90er Jahre postuliert worden (Dalbagni *et al.*, 1993; Spruck *et al.*, 1994). Durch die Identifikation molekularer Marker könnten die vorhandenen therapeutischen Möglichkeiten gezielter eingesetzt werden, um

beim oberflächlichen Harnblasenkarzinom die Fähigkeit zur Progression und die Entstehung von Rezidiven sowie beim muskelinvasiven Tumor die Metastasierungstendenz zu erkennen und im Idealfall rechtzeitig die nötigen therapeutischen Schritte einzuleiten. Diese Arbeit leistet einen Teil zur genaueren genetischen Charakterisierung der Tumoren der Harnblase mit der Eingrenzung tumorassoziierter chromosomaler Regionen.

#### **5.4.1.2. Serologischer Nachweis**

In dieser Arbeit bietet die Analyse von frei zirkulierender Tumor-DNA beim Urothelkarzinom der Harnblase die Möglichkeit, die Akkumulation im zeitlichen Verlauf von genetischen Veränderungen eines Tumors durch repetitive Analysen von Serum-DNA nicht-invasiv wiederzugeben. Mulcahy et al. haben die Anwendbarkeit solcher molekularen Untersuchungsmethoden im Rahmen einer Verlaufsbeobachtung bereits beim Pankreaskarzinom belegt (*Mulcahy et al.*, 1998). Mit der Promoterhypermethylisierungsanalyse von Tumorsuppressorgenen durch die Applikation quantitativer PCR-Techniken ist eine quantitative Überwachung epigenetisch veränderter Plasma-DNA möglich (*Lo et al.*, 1999; *Kawakami et al.*, 2000; *Goessl*, 2001).

Anhand des Survivinspiegels können Aussagen über den Progress gemacht werden. So ist einer erhöhter Survivinspiegel mit einem Tumorprogress vergesellschaftet. Bislang war eine Korrelation zwischen Survivinspiegel und Prognose nicht sicher nachweisbar (*Duffy et al.*, 2007; *Margulis et al.*, 2007).

#### **5.4.2. Anwendung**

Mit der genetischen Charakterisierung von Tumoren ist nun die Identifikation von Risikopopulationen möglich, welche spezifische genetische Veränderungen aufweisen, die für die Tumorentstehung grundlegend sind. Damit könnte die onkologische Basis zur Früherkennung solcher Risikopatienten und damit zur Verhinderung der Entstehung einer Erkrankung genutzt werden. Insbesondere können die erlangten Erkenntnisse der Tumorbiologie die Basis für gezielte genterapeutische Ansätze bilden (*Torrance et al.*, 2000; *Blot*, 2000). Die Mikrosatellitenanalyse bietet eine zuverlässige Methode der Detektion von Harnblasenkarzinomen mit hoher Spezifität (100%) und Sensitivität 72 – 97% (*Van Rhijn et al.*, 2001; *von Knobloch et al.* 2001; *von Knobloch*, 2002; *von Knobloch et*

*al.*, 2004; *Amira et al.*, 2002; *Rhijn et al.*, 2005, *Bartoletti et al.*, 2005, *Gudjonsson et al.*, 2008). Kombiniert man die MSA mit der konventionellen Zytologie, ergaben sich in der Studie von Collin-Chavagnac eine Sensitivität für low grade Karzinome von 74,4% und für low stage Karzinome von 80,2%. Die Sensitivität der Kombination war jeweils höher als die Einzelwerte für MSA bzw. Zytologie getrennt (*Rhijn et al.*, 2005; *Collin-Chavagnac et al.*, 2010). Eine solche Verknüpfung der beiden etablierten Methoden kann Kosten senken (*Wild et al.*, 2009). Doch die MSA ist eine aufgrund der technischen Komplexität störanfällige Methode, die mit großem Aufwand und hohen Kosten verbunden ist. Sollten durch Standardisierung diese Probleme reduziert werden, kann die MSA einen entscheidenden Platz in der Diagnostik des Harnblasenkarzinoms einnehmen. Im Follow-up kann zum Beispiel bei wiederholten Messungen das Rezidivrisiko innerhalb von 2 Jahren bestimmt werden. Van der Aa ermittelte bei persistierenden Alterationen ein solches Risiko von 83%. Weist man konstant keine Alterationen nach, liegt dieses Risiko lediglich bei 22% (*Van der Aa et al.*, 2009).

### **5.4.3. Andere Methoden**

In den letzten Jahren wird an verschiedensten Markersystemen zur Früherkennung, Rezidivdiagnose oder Prognoseabschätzung gearbeitet. Bislang hat noch keiner der untersuchten Marker konstant gute Ergebnisse geliefert, als dass die Verwendung in den internationalen Leitlinien empfohlen würde (*Babjuk et al.*, 2008; *Stenzl et al.*, 2009; *Sturgeon et al.*, 2010; *Tilki et al.*, 2011). Im Folgenden werden einige Tests bzw. potentielle Marker beschrieben.

Von der FDA (American Food & Drug Administration) zugelassen ist der NMP-22 Test. Bei NMP-22 handelt es sich um ein Matrixprotein des Zellkerns (des Spindelapparates), welches bei urothelialer Replikation vermehrt im Urin vorhanden ist (*Gutiérrez-Banos et al.*, 2001). Es existieren zwei verschiedene Testverfahren. Ein Schnelltest (NMP-22-BladderCheck®) und ein Enzymimmunoassay (NMP22 EIA®). Die Angaben in der Literatur für Sensibilität und Spezifität schwanken. So werden Sensibilitäten zwischen 32 bis 100% und Spezifitäten zwischen 55 bis 96,7% angegeben (*Compton et al.*, 1993; *Soloway et al.*, 1996; *Wiener et al.*, 1998; *Ramakumar et al.*, 1999; *Ponsky et al.*, 2001; *Glas et al.*, 2003; *Rhijn et al.*, 2005; *Lokeshwar et al.*, 2006; *Hautmann et al.*, 2007; *Konety et al.*, 2008; *Vrooman et al.*, 2008; *Lotan et al.*, 2009; *Hatzichristodoulou et al.*, 2011; *Hwang et al.*, 2011). In einer Studie mit 1500 Patienten zeigte sich eine geringe

klinische Detektionsrate (Lotan *et al.*, 2009). Der routinemäßige Einsatz wird auch von Ausschlusskriterien beeinträchtigt. So sind Hämaturie, Leukozyturie, BPH, Harnwegsinfekte und Urolithiasis Ausschlusskriterien und verantwortlich für die hohen Raten an falsch positiven Ergebnissen (Poulakis *et al.*, 2001; Rhijn *et al.*, 2005; Konety *et al.*, 2008; Vrooman *et al.*, 2008).

Ein weiterer bereits kommerzialisierter Marker ist UroVysion®. Dabei werden chromosomale Veränderungen nachgewiesen, indem per FISH (Fluoreszenz in situ Hybridisierung) mittels fluoreszenzmarkierter Sonden Zentromere der Chromosomen 3, 7 und 17 sowie der Genlocus 9p21 markiert werden. Ausgewertet werden zytogenetische morphologische Kriterien. So genannte Copy Number Variations (CNV), also Allelverluste bzw. Amplifikationen, werden an oben genannten Chromosomen bzw. Genloci untersucht (Halling *et al.*, 2000, Bubendorf *et al.*, 2001; Daniely *et al.*, 2007; vom Dorp *et al.*, 2007; Sullivan *et al.*, 2010). Definiert wird dieses Verfahren als Ergänzungstest zur Zytologie durch die Notwendigkeit, dass atypische Zellen im Urin vorhanden sind (Knüchel *et al.*, 2009). In Studien ergab sich bisher keine Relevanz in prognostischen Fragestellungen (Pycha *et al.*, 1997). Es gilt weiter zu prüfen, ob ein positives Testergebnis eine neoplastische Umformung oder ein instabiles Urothel mit der Tendenz zur malignen Entartung darstellt (Veeramachaneni *et al.*, 2003). Eine vorangegangene intravesikale BCG-Instillation hingegen beeinflusst die Testergebnisse nicht (Mengual *et al.*, 2007; Konety *et al.*, 2008; Zwarthoff *et al.*, 2008; Vrooman *et al.*, 2008). Die Sensitivität wird mit 68 – 81% bei einer Spezifität von 79 – 96% angegeben. Es kann jedoch nicht gesagt werden, ob ein positives Ergebnis eine neoplastische Umformung darstellt oder instabiles Urothel mit Entartungstendenz vorliegt (Halling *et al.*, 2000; Tritschler *et al.*, 2006; Alvarez *et al.*, 2007; Hautmann *et al.*, 2007). In der so genannten Uroscreen-Studie wurden die herkömmlichen Untersuchungsmethoden (Urin-teststreifen auf Hämaturie und Urin-Zytologie) sowie NMP-22 und UroVysion® an einer Risikopopulation von 1772 Chemiewerkeitarbeitern angewendet. Auf dem DGU-Jahreskongress 2011 wurden erste Ergebnisse vorgestellt. Die Sensitivität und Spezifität ist für jeden Test einzeln betrachtet nicht ausreichend. So wurden Sensitivitäten für G1 Tumore mit 36%, für G2 Tumore mit 76% und für G3 Tumore mit 96% bei einer Spezifität mit 96% angegeben (Halling *et al.*, 2002; Sarosdy *et al.*, 2002). Eine Kombination der verschiedenen Testverfahren kann eine Verbesserung der Aussagekraft in Zukunft bringen und somit z.B. zum Screening von Hochrisikogruppen verwendet werden (Huber *et al.*, 2011).

Einen anderen Weg bietet der BTA-Stat bzw. die Weiterentwicklung der BTA-TRAK™-Test (Bladder tumor antigen). Hier wird eine Proteinbestimmung im Urin vorgenommen. Genauer gesagt ist dieser Point-of-Care-Test (Streifentest) ein über zwei monoklonale Antikörper geführter qualitativer Nachweis des hCFH bzw. hCFHrp (humaner Komplementfaktor H Protein bzw. hCFH ähnliches Protein). Das hCFHrp wird ausschließlich in urothelialen Tumorzellen gebildet. Mit deutlichen Einschränkungen bei low-grade Tumoren bzw. bei benignen urologischen Erkrankungen werden die Sensitivitäten zwischen 8 bis 89% bei Spezifitäten zwischen 50 bis 95% angegeben. Allerdings sinkt die Spezifität bei Pyurie oder Urolithiasis (*Sarkis et al., 1994; Mahnert et al., 1999; Guitèrrez Banos et al., 2001; Poulakis et al., 2001; Lokeshwar et al., 2006; Alvarez et al., 2007; Hautmann et al., 2007; Babjuk et al., 2008; Raitanen et al., 2008; Kinders et al., 2009*).

Auch über die Untersuchung von Mikro-RNA (miRNA) gibt es die ersten Ergebnisse. Dies sind nicht-codierende RNA, welche ein wichtiges regulatorisches Bindeglied zwischen DNA, mRNA und Proteinsynthese darstellen. Sie umfassen etwa 22 Nukleotide. Ihnen werden auch immunsuppressive Eigenschaften zugeschrieben. 2001 wurde die miRNA erstmals von Ruvkun beschrieben (*Ruvkun et al., 2001*). Bis März 2009 wurden bereits 695 humane miRNA nachgewiesen (*Schaefer et al., 2009*). 30% der humanen RNA werden durch solche miRNA reguliert (*Lewis et al., 2005*). Nun wurden Veränderungen der Expressionsprofile dieser miRNA bei Tumorpatienten nachgewiesen. Da sie auch im Urin detektiert werden konnten, bietet sich damit die Möglichkeit eines Biomarker für Diagnose, Prognose bzw. neue Therapieformen des Harnblasenkarzinoms. Cowland et al. berichteten über die Möglichkeit einer Abgrenzung zwischen Karzinom von reaktiven Läsionen (*Calin et al., 2002; Iorio et al., 2005; Lu et al., 2005; Calin et al., 2006; Murakami et al., 2006; Volinia et al., 2006; Cowland et al., 2007; Yu et al., 2008*). Deregulierte, mit Krebs assoziierte miRNA werden als „Oncomirs“ bezeichnet (*Esquela-Kerscher et al., 2006; Schäfer et al., 2010*). Bei Untersuchungen von Blut bei Patienten mit einem Prostatakarzinom konnte eine Abschätzung der Aggressivität des Tumors erfolgen (*Mitchell et al., 2008*). Auch bei Patienten mit einem Harnblasenkarzinom gibt es erste Ergebnisse. Es wurden 10 hochregulierte miRNA in Tumorproben identifiziert sowie ein nicht signifikanter Abfall der miR-26-Expression bei steigendem Tumorstadium (*Gottardo et al., 2007*).

Auch Wachstumsfaktoren rückten in den Fokus von Studien. VEGF (vascular endothelial growth factor) und EGFR (endothelial growth factor receptor) korrelierten mit der Progressionsfähigkeit von Urothelkarzinomen (*Messing et al.*, 1990; *Crew et al.*, 1997; *Danielly et al.*, 2007). Auch bFGF (basic fibroblast growth factor) zeigte sich in Serum und Urin als proangiogenetischer Faktor von Tumorpatienten erhöht (*Nguyen et al.*, 1994; *O'Brien et al.*, 1997; *Gravas et al.*, 2004). Eine aktivierende Mutation von FGFR<sup>3</sup> ist zum Beispiel überwiegend mit nicht-invasiven Blasen Tumoren von niedrigem Malignitätsgrad assoziiert. Eine p53-Mutation ist dabei fast auszuschließen. Bei diesen Tumoren wurden häufig auch Mutationen von proliferationsfördernden Onkogenen wie PIK<sup>3</sup>CA oder HRAS sowie Deletionen auf beiden Armen des 9. Chromosoms gefunden (*Oers et al.*, 2007; *Goebell et al.*, 2010).

Als weiterer interessanter Ansatzpunkt sind Glykosaminoglykane wie die Hyaluronsäure und das abbauende Enzym Hyaluronidase-1 (HYAL-1) zu nennen. Eine erhöhte Expression ist mit aggressiven Blasen Tumoren und einer erhöhten Rezidivwahrscheinlichkeit sowie mit einer Metastasierung assoziiert (*Kramer et al.*, 2010). Die real-time PCR für HYAL-1 ergab eine Sensitivität von 72% (*Kramer et al.*, 2008).

Der Apoptose-Inhibitor Survivin (BIRC5) erscheint durch gute erste Daten ein hohes Potential als Marker zu besitzen (*Altieri et al.*, 2003). Survivin initialisiert die Zellproliferation sowie die Angiogenese. Die Sensitivität wird mit 100% angegeben bei 87 bis 100%iger Spezifität bei allerdings geringen Fallzahlen (*Smith et al.*, 2001; *Sharp et al.*, 2002; *Datta et al.*, 2002; *Lokeshwar et al.*, 2006; *Duffy et al.*, 2007; *Margulis et al.*, 2007; *Hautmann et al.*, 2007). Der prognostische Wert ist vor allem bei pT1G3 Tumoren vielversprechend (*Gradilone et al.*, 2010). Die Messung erfolgt mittels PCR. Eine Überexpression korreliert mit einer kürzeren progressionsfreien Zeit und erhöhter Rezidivrate (*Swana et al.*, 1999; *Smith et al.*, 2001; *Shariat et al.*, 2007; *Coleman et al.*, 2009). Eine Kohortenstudie hat diese viel versprechenden Befunde allerdings wieder etwas relativiert (*Shariat et al.*, 2009).

Eine Vielzahl an Proteinen wurde als potentielle Marker untersucht. Zu erwähnen ist zum Beispiel das Clusterin, welches im Serum von Tumorpatienten mit invasiven und oberflächlichen Blasen Tumoren erhöht ist. Die Sensitivität betrug 80% bei 91% Spezifität (*Hazzaa et al.*, 2010). Der Serin-Protease-Inhibitor Maspin zeigte eine Assoziation zwischen verminderter Expression und höheren T-Stadien sowie Expressionsunterschiede zwischen nicht-invasiven und invasiven Tumoren

( $p < 0,05$ ). Zusätzlich zeigte sich Maspin als unabhängiger prognostischer Faktor für die Rezidiv-Vorhersage ( $p < 0,03$ ) und die Tumorprogression ( $p < 0,001$ ) (Kramer *et al.*, 2008). Das zur Gruppe der Immunglobuline gehörige Transmembranprotein EMMPRIN (CD147), das vor allem auf Epithelzellen exprimiert wird, ist ein weiterer Kandidat, da es häufig am Tumorrand, am Ort des invasiven Tumorwachstums, vorkommt. EMMPRIN induziert die Synthese von Matrixmetalloproteinasen (MMP) und VEGF. Es konnte ein Einfluss auf die Progression von Blasentumoren nachgewiesen werden (Zucker *et al.*, 2001; Gabison *et al.*, 2005; Tang *et al.*, 2005; Yan *et al.*, 2005; Nawroth *et al.*, 2008; Riethdorf *et al.*, 2008). Eine Anwendungsmöglichkeit ist die Target-Therapie mittels Antikörper (Xu *et al.*, 2007). Von den bereits angesprochenen Matrixmetalloproteinasen ist die MMP-7 mit einem erhöhten Risiko einer Metastasierung verknüpft (Szarvas *et al.*, 2010). Auch das Fibronektin (FN), ein Glykoprotein, zeigt bei erhöhter Expression einen Zusammenhang zum Urothelkarzinom der Blase (Sanchez-Carbayo *et al.*, 2000; Kirkali *et al.*, 2001). Ein erhöhter cFN-Plasmaspiegel ist mit einem muskelinvasiven Wachstum assoziiert. FN unterstützt dabei das lokale Tumorwachstum und die Metastasierung (Hegele *et al.*, 2008). Eine Überexpression des Calcium-bindenden Proteins Calgranulin ist mit einer Muskelinvasion und einer schlechten Prognose assoziiert (Nicklas *et al.*, 2010). Auch Galectin-3 (ein Lektin) ist im Plasma bei Blasenkarzinompatienten erhöht und seine Expression signifikant bei pT1-Tumoren erniedrigt und wurde von den Autoren als unabhängiger Prognosefaktor für Rezidive bezeichnet (Kramer *et al.*, 2008; Sakaki *et al.*, 2008). Der Wachstumsfaktor Proepithelin zeigte im Urin von Blasenkarzinompatienten eine Überexpression. Sensitivität und Spezifität wurden mit 74,6 bis 85, 2% angegeben (Selmy *et al.*, 2010).

Das Zelladhäsionsmolekül CEACAM<sup>1</sup> (carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1) führt durch seine Expression zur Hochregulation proangiogenetischer Faktoren (z.B. VEGF). Es konnte eine Diskriminierung zwischen gesunden Probanden und Tumorpatienten erfolgen (Ergün *et al.*, 2000; Kilic *et al.*, 2005; Tilki *et al.* 2009).

Ein weiterer Forschungsfokus beschäftigt sich mit dem Nachweis von Zytokeratin und Uroplakin. Erstmals gelang ein solcher Nachweis für CK20 mittels „nested PCR“ (Kaneda *et al.*, 1998; Yuasa *et al.*, 1999; Nezos *et al.*, 2009). Für Uroplakin II werden Spezifitäten von 100% angegeben (Li *et al.*, 1999; Osman *et al.*, 2004). Allerdings war die Detektionsrate für oberflächliche und nicht-metastasierte

Tumore gering (*Li et al.*, 1999; *Lu et al.*, 2000). CK20 erreichte ebenfalls gute Spezifitäten bei jedoch nur mäßiger Sensitivität (*Retz et al.*, 2001; *Nezos et al.*, 2009). Auch erhöhte Messwerte für MUC-7- und EGFR sind mit dem Nachweis eines Urothelkarzinoms assoziiert (*Gazzaniga et al.*, 2001; *Kinjo et al.*, 2004; *Osman et al.*, 2004). Mittels Real-Time-PCR oder mit Marker Panels als Multiplex-PCR lässt sich die Sensitivität steigern. Mit einem Panel von 7 Markern konnte eine Sensitivität von 83% bei Spezifität von 93% erreicht werden (*Okegawa et al.*, 2004; *Osman et al.*, 2006; *Nezos et al.*, 2009).

Kurz sei noch die Tumorangiogenese als Forschungsfokus erwähnt. Die Angiogenese ist für die Entwicklung invasiver Harnblasentumore essentiell und bietet als Marker somit interessante Perspektiven (*Folkman et al.*, 1971; *Cao et al.*, 2008; *Becker et al.*, 2009).

Auch Transkriptionsfaktoren stehen im Mittelpunkt des Interesses. HIF-1 $\alpha$  (hypoxia-inducible-factor) korreliert bei Überexpression mit sehr aggressiven Tumorformen und einer schlechten Prognose (*Theodoropoulos et al.*, 2005). Genauso zeigt das antiapoptotische Gen BCL2 eine Assoziation mit schlechter Prognose (*Kirsh et al.*, 1998; *Karam et al.*, 2007). Als letztes soll auch das Tumorsuppressorgen p16INK4a genannt werden als Marker für schlecht differenzierte Tumore (*Tauber et al.*, 2011).

Abschließend bleibt festzuhalten, dass trotz der Fülle der potentiellen Marker aus vielen Bereichen des Stoffwechsels von Tumorzellen, derzeit auch bei guten Ergebnissen die Zystoskopie der Goldstandard in der Diagnose und der Nachsorge beim Urothelkarzinom der Harnblase bleibt. Durch weitere intensive Forschung an großen Patientenpopulationen müssen Kosten und Effektivität der bereits etablierten Verfahren weiter gesenkt und die vielversprechenden Ergebnisse zum Beispiel beim Survivin verifiziert werden.

## 6. Zusammenfassung

Für das Urothelkarzinom der Harnblase gibt es derzeit keine serologischen Marker und keine suffizienten nicht-invasiven Untersuchungsmethoden für eine Karzinomdiagnose anhand von Urinproben. In der vorliegenden Arbeit wurde mit der Methode der Mikrosatellitenanalyse (MSA) eine genetische Charakterisierung beim Urothelkarzinom der Harnblase durchgeführt, um Alterationen in der Serum-DNA und Urin-Sediment bei an einem Urothelkarzinom der Blase erkrankten Patienten nachzuweisen. Insgesamt wurden von 2001 bis 2003 frische Tumor-, Blut-, Serum und Urin-Sedimentproben von 117 im Universitätsklinikum Marburg an einem Urothelkarzinom der Blase operierten Patienten prospektiv asserviert. Mittels der Phenol-Chloroform Methode wurde die DNA aus Tumor und Lymphozyten des Blutes isoliert. Frei zirkulierende Serum- und Urin-Sediment DNA wurde mit dem Untersuchungs-Kit (Mini-Kit, Qiagen) isoliert. Die MSA wurde mit insgesamt 10 polymorphen Markern für die chromosomalen Regionen 5q, 8p, 9p, 9q, 13q, 14q, 17p und 20q angewendet, um tumorspezifische Alterationen der Serum- und Urin-Sediment DNA zu identifizieren. Nach Amplifikation mittels PCR wurde allelic imbalance und loss of heterozygosity mit dem automatischen Laser Sequenzer (ALFexpress II, Amersham-Pharmacia Biotech) detektiert. 20 gesunde Kontrollen wurden mit denselben Markern untersucht.

Es konnten Serum-DNA Alterationen in 77,7% (87/112) identifiziert werden. Unter Anwendung von denselben 10 Mikrosatellitenmarkern konnten tumorspezifische Urin-DNA Alterationen in 85% nachgewiesen und somit eine Tumordiagnose gestellt werden (64/75). Vier gesunde Kontrollen zeigten Serum-DNA Artefakte. Dies bedeutet eine Spezifität von 80%. Die höchste Frequenz von Serum-DNA Alterationen wurde für die chromosomale Region 9p mit 35% gefunden. Die anderen Chromosomen zeigten Serum-DNA Alterationen in 16 bis 26%. Bei den Urin-Proben zeigte die Region 9q mit 37% die häufigsten Alterationen. Die Identifikation von Serum-DNA Alterationen war assoziiert mit dem Tumorstadium ( $p = 0,008$ ) und häufiger in schlecht differenzierten Tumoren ( $p = 0,005$ ). Dies gilt nicht für die Urindiagnose ( $p > 0,05$ ).

Bei gut differenzierten G1-Tumoren war eine Urindiagnose in 77,8% möglich. Bei der Zytologie gelingt dies lediglich mit etwa 30%. Damit bietet sich die MSA bei dieser Tumorentität als eine hervorragende Ergänzung im Rahmen der Diagnostik an.

Ein wesentliches Ziel dieser Arbeit, die Reduktion der Anzahl an Tumormarkern von 17 auf nur noch 10 bei gleichen oder besseren Werten für die Sensitivität im Vergleich zu den Vorarbeiten von von Knobloch, konnte erfüllt werden.

## 7. Abstract

### **MOLECULAR SEROLOGICAL DIAGNOSIS AND URINANALYSIS IN TRANSITIONAL CELL BLADDER CANCER**

Raphael Goetzky<sup>1</sup>, Heidrun Brandt<sup>2</sup>, Rainer Hofmann<sup>2</sup>, Rolf von Knobloch<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Department of Urology, Vinzenz-Hospital, Hannover, Germany

<sup>2</sup>Department of Urology, Philipps-University Marburg, Germany

<sup>3</sup>Department of Urology, Klinikum Kempten, Germany

**Introduction and Objectives:** For transitional cell carcinoma (TCC) of the urinary bladder no reliable serological markers and no sufficient non-invasive tools for urine diagnosis are available. We applied the fluorescent microsatellite analysis (MSA) to detect serum-DNA and urine-sediment-DNA alterations in patients suffering from bladder cancer.

**Materials and Methods:** From 2001 to 2003 we prospectively collected fresh tumor-, peripheral blood-, serum- and spontaneous urine specimens from 117 consecutive patients treated for TCC of the bladder at our institution. DNA was extracted by phenol-chloroform method from tumors and blood lymphocytes. Free Serum- and cellular urine-sediment-DNA was isolated by a commercial kit (Mini-Kit, Qiagen). We performed MSA with a total of only 10 polymorphic markers from the chromosomal regions 5q, 8p, 9p, 9q, 13q, 14q, 17p, and 20q to identify tumor specific serum- and urine-sediment-DNA alterations. After PCR-amplification detection of allelic imbalance and loss of heterozygosity was carried out on an automated laser sequencer (ALFexpress II, Amersham-Pharmacia Biotech). 20 healthy controls were investigated with the same markers.

**Results:** We identified serum-DNA alterations in 77.7% (87/112) of cases. By applying the same 10 microsatellite markers we observed tumor specific urine-DNA alterations allowing cancer diagnosis in 85% (64/75) of cases. Four healthy controls displayed serum-DNA artefacts rendering a specificity of 80%. The highest frequency of serum-DNA alterations was detected for chromosomal region 9p with 35%. The other Chromosomes showed serum-DNA alterations in 16 to 26%. In urine 9q displayed alterations most frequently in 37% of cases. The identification of serum-DNA alterations was associated with underlying

tumor–stage ( $p = 0.008$ ) and was also more frequent in high grade tumors ( $p = 0.005$ ). This was not the case for the urine-diagnosis ( $p > 0.05$ ).

**Conclusions:** In patients with TCC of the urinary bladder microsatellite analysis with only 10 markers has a high sensitivity of 77.7% in the detection of free serum-DNA alterations, thus allowing tumor diagnosis. For urine-sediment specimens the detection rate is even 85% independent of tumor stage or grade.

## 8. Literaturverzeichnis

- Aaboe M, Marcussen N, Jensen KM, Thykjaer T, Dyrskjot L, Orntoft TF. Gene expression profiling of noninvasive primary urothelial tumours using microarrays. *Br J Cancer*. (2005) Nov 14;93(10): 1182-1190.
- Ahlquist DA, Skoletsky JE, Boynton KA, Harrington JJ, Mahony DW, Pierceall WE, Thibodeau SN und Shuber AP. Colorectal cancer screening by detection of altered human DNA in stool: feasibility of a multitarget assay panel. *Gastroenterology* (2000), 119: 1219-1227.
- Altieri DC. Survivin, versatile modulation of cell division and apoptosis in cancer. *Oncogene* (2003) 22: 8581–8589.
- Alvarez A, Lokeshwar VB. Bladder cancer biomarkers: current developments and future implementation. *Curr Opin Urol* (2007); 17(5):341-346.
- Amira N, Mourah S, Rozet F et al. Non-invasive molecular detection of bladder cancer recurrence. *Int.J.Cancer* (2002), 101: 293-297.
- Anderstöm C, Johannson SL, von Schultz L. Primary adenocarcinoma of the urinary bladder. A clinicopathologic and prognostic study. *Cancer* (1983) Oct 1; 52(7); 1273-1280.
- Anker P. Quantitative aspects of plasma/serum DNA in cancer patients. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* (2000), 906: 5-7.
- Anker P, Lefort F, Vasioukhin V, Lyautey J, Ledderrey C, Chen XQ, Stroun M, Mulcahy HE und Farthing MJ. K-ras mutations are found in DNA extracted from the plasma of patients with colorectal cancer. *Gastroenterology* (1997), 112: 1114-1120.
- Anker P, MulcahyH, Chen XQ und Stroun M. Detection of circulating tumour DNA in the blood (plasma/serum) of cancer patients. *Cancer Metastasis Rev.* (1999), 18: 65-73.
- Anker P, Stroun M und Maurice PA. Spontaneous release of DNA by human blood lymphocytes as shown in an in vitro system. *Cancer Res.* (1975), 35: 2375-2382.
- Ashida S, Okuda H, Chikazawa M, Tanimura M, Sugita O, Yamamoto Y, Nakamura S, Moriyama M und Shuin T. Detection of circulating cancer cells with von hippel-lindau gene mutation in peripheral blood of patients with renal cell carcinoma. *Clin.Cancer Res.* (2000), 6: 3817-3822.
- Aveyard JS, Skilleter A, Habuchi T und Knowles MA. Somatic mutation of PTEN in bladder carcinoma. *Br.J.Cancer* (1999), 80: 904-908.

- Babaian Alu, Kariakin OB, Teplov AA, Zaletaev DV, Nemtsova MV. Some molecular-genetic markers, defining the pathogenesis of superficial and invasive bladder cancer. *Mol Biol (Mosk)*, (2011) Nov-Dec; 45(6): 1012-1016.
- Babjuk M, Oosterlinck W, Sylvester R, Kaasinen E, Böhle A, Palou-Redorta J. EAU guidelines on nonmuscle-invasive carcinoma of the bladder. *Eur.Urol.* (2008), 54: 303-314.
- Babjuk M, Soukup V, Pesl M et al. Urinary cytology and quantitative BTA and UBC tests in surveillance of patients with pT<sub>a</sub>pT<sub>1</sub> bladder urothelial carcinoma. *Urology* (2008), 71: 718-722.
- Balazs M, Carroll P, Kerschmann R, Sauter G und Waldmann FM. Frequent homozygous deletion of cyclin-dependent kinase inhibitor 2 (MTS1, p16) in superficial bladder cancer detected by fluorescence in situ hybridization. *Genes Chromosomes. Cancer* (1997), 19: 84-89.
- Baron A, Mastroeni F, Moore PS, Bonetti F, Orlandini S, Manfrin E, Schiavone D, Migliorini F, Lusuardi L et al. Detection of bladder cancer by semiautomated microsatellite analysis of urine sediment. *Adv.Clin.Path.* (2000), 4: 19-24.
- Bartelink H, Begg AC, Martin JC, van Dijk M, Moonen L, van 't Veer LJ, Van D, V und Verheij M. Translational research offers individually tailored treatments for cancer patients. *Cancer J.Sci.Am.* (2000), 6: 2-10.
- Bartoletti R, Dal Canto M, Cai T, Piazzini M, Travaglini F, Gavazzi A und Rizzo M. Early diagnosis and monitoring of superficial transitional cell carcinoma by microsatellite analysis on urine sediment. *Oncology reports* (2005), 13(3): 531-537.
- Bates SE. Clinical applications of serum tumor markers. *Ann.Intern.Med.* (1991), 115: 623-638.
- Becker M, Tilki D, Szarvas T, Rübber H und Ergün S. Urinbasierte Angiogenesemarker beim Urothelkarzinom der Harnblase. *Der Urologe* (2009), 48(6): 609-614.
- Bialkowska-Hobrzanska H, Bowles L, Bukala B, Joseph MG, Fletcher R und Razvi H. Comparison of human telomerase reverse transcriptase messenger RNA and telomerase activity as urine markers for diagnosis of bladder carcinoma. *Mol.Diagn.* (2000), 5: 267-277.
- Blot WJ. Preventing cancer by disrupting progression of precancerous lesions. *J.Natl.Cancer Inst.* (2000), 92: 1868-1869.

- Bohlander SK, Dreyling MH, Hagos F, Sveen L, Olopade OI und Diaz MO. Mapping a putative tumor suppressor gene on chromosome 9 bands p21-p22 with microdissection probes. *Genomics* (1994), 24: 211-217.
- Boland CR. Setting microsatellites free. *Net.Med.* (1996), 2: 972-974.
- Bolanos-Garcia VM. Aurora kinases. *Int J Biochem Cell Biol.* (2005) Aug;37(8):1572-7. Epub 2005 Mar 21.
- Bosl GJ & Chaganti RS. The use of tumor markers in germ cell malignancies. *Hematol.Oncol.Clin.North Am.* (1994), 8: 573-587.
- Bostick PJ, Chatterjee S, Chi DD, Huynh KT, Giuliano AE, Cote R und Hoon DS. Limitations of specific reverse-transcriptase polymerase chain reaction markers in the detection of metastases in the lymph nodes and blood of breast cancer patients. *J.Clin.Oncol.* (1998), 16: 2632-2640.
- Botteman MF, Pashos CL, Redaelli A et al. The health economics of bladder cancer: a comprehensive review of the published literature. *Pharmacoeconomics* (2003), 21: 1315-1330.
- Bova GS, Carter BS, Bussemakers MJ, Emi M, Fujiwara Y, Kyprianou N, Jacobs SC, Robinson JC, Epstein JI et al. Homozygous deletion and frequent allelic loss of chromosome 8p22 loci in human prostate cancer. *Cancer Res.* (1993), 53: 3869-3873.
- Boyle JO, Mao L, Brennan JA, Koch WM, Eisele DW, Saunders JR und Sidransky D. Gene mutations in salvia as molecular markers for head and neck squamous cell carcinomas. *Am.J.Surg.* (1994), 168: 429-432.
- Brabender J, Usadel H, Danenberg KD, Metzger R, Schneider PM, Lord RV, Wickramasinghe K, Lum CE, Park J et al. Adenomatous polyposis coli gene promoter hypermethylation in non-small cell lung cancer is associated with survival. *Oncogene* (2001), 20: 3528-3532.
- Brake M, Loertzer H, Horsch R und Keller H. Recurrence and progression of stage T1, grade 3 transitional cell carcinoma of the bladder following intravesical immunotherapy with bacillus Calmette-Guerin. *J.Urol* (2000), 163: 1697-1701.
- Brennan P, Bogillot O, Cordier S, Greiser E, Schill W, Vineis P et al. Cigarette smoking and bladder cancer in men: a pooled analysis of 11 case-control studies. *Int J Cancer* (2000) 86: 289-294.
- Brewster SF, Gingell JC, Browne S und Brown KW. Loss of heterozygosity on chromosome 18q is associated with muscle-invasive transitional cell carcinoma of the bladder. *Br.J.Cancer* (1994), 70: 697-700.

- Bringuier PP, Tamimi Y, Schuurig E und Schalken J. Expression of cyclin D1 and EMS1 in bladder tumours; relationship with chromosome 11q13 amplification. *Oncogene* (1996), 12: 1747-1753.
- Brossart P, Keilholz U, Scheibenbogen C, Mohler T, Willhauck M und Hunstein W. Detection of residual tumour cells in patients with malignant melanoma responding to immunotherapy. *J.Immunother.* (1994), 15: 38-41.
- Bubendorf L, Grilli B, Sauter G, Mihatsch MJ, Gasser TC und Dalquen P. Multiprobe FISH for enhanced detection of bladder cancer in voided urine specimens and bladder washings. *Am.J.Clin.Pathol.* (2001), 116: 79-86.
- Buchumensky V, Klein A, Zemer R, Kessler OJ, Zimlichman S und Nissenkorn I. Cytokeratin 20: a new marker for early detection of bladder cell carcinoma? *J.Urol.* (1998), 160: 1971-1974.
- Bugert P & Kovacs G. Molecular differential diagnosis of renal cell carcinomas by microsatellite analysis. *Am.J.Pathol.* (1996), 149: 2081-2088.
- Bugert P, von Knobloch R und Kovacs G. Duplication of two distinct regions on chromosome 5q in non-papillary renal-cell carcinomas. *Int.J.Cancer* (1998), 76: 337-340.
- Cao Y, Langer R. A review of judah folkman's remarkable achievements in biomedicine. *Proc Natl Acad Sci USA* (2008), 105(36): 13203-13205.
- Cairns P, Esteller M, Herman JG, Schoenberg M, Jeronimo C, Sanchez-Cespedes M, Chow NH, Grasso M, Wu L et al. Molecular detection of prostate cancer in urine by GSTP1 hypermethylation. *Clin.Cancer Res.* (2001), 7: 2727-2730.
- Cairns P, Evron E, Okami K, Halachmi N, Esteller M, Herman JG, Bose S, Wang SI, Parsons R et al. Point mutation and homozygous deletion of PTEN/MMAC1 in primary bladder cancers. *Oncogene* (1998), 16: 3215-3218.
- Cairns P, Polascik TJ, Eby Y, Tokino K, Califano J, Merlo A, Mao L, Herath J, Jenkins R et al. Frequency of homozygous deletion at p16/CDKN2 in primary human tumours. *Net.Genet.* (1995), 11: 210-212.
- Cairns P, Proctor AJ und Knowles MA. Loss of heterozygosity at the RB locus is frequent and correlates with muscle invasion in bladder carcinoma. *Oncogene* (1991), 6: 2305-2309.
- Cairns P, Shaw ME und Knowles MA. Preliminary mapping of the deleted region of chromosome 9 in bladder cancer. *Cancer Res.* (1993), 53: 1230-1232.

- Calin GA, Croce CM. MicroRNA signatures in human cancers. *Nat.Rev.Cancer* (2006), 6: 857-866.
- Calin GA, Dumitru CD, Shimizu M et al. Frequent deletions and down-regulation of microRNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proc.Natl.Acad.Sci USA* (2002), 99: 15524-15529.
- Capone RB, Pai SI, Koch WM, Gillison ML, Danish HN, Westra WH, Daniel R, Shah KV und Sidransky D. Detection and quantitation of human papillomavirus (HPV) DNA in the sera of patients with HPV-associated head and neck squamous cell carcinoma. *Clin.Cancer Res.* (2000), 6: 4171-4175.
- Capellen D, Gil Diez dM, Chopin D, Thiery JP und Radvanyi F. Frequent loss of heterozygosity on chromosome 10q in muscle-invasive transitional cell carcinomas of the bladder. *Oncogene* (1997), 14: 3059-3066.
- Cassel A, Rahat MA, Lahat N, Lindenfeld N, Mecz Y und Stein A. Telomerase activity and cytokeratin 20 as markers for the detection and follow-up of transitional cell carcinoma: an unfulfilled promise. *J.Urol.* (2001), 166: 841-844.
- Castaldo G, Cecere G, di F, V, Prezioso D, d'Armiento M und Salvatore F. Prostate-specific antigen (protein and mRNA) analysis in the differential diagnosis and staging of prostate cancer. *Clin.Chim.Acta* (1997), 265: 65-76.
- Castaldo G, Tomaiuolo R, Sanduzzi A, Bocchino ML, Ponticiello A, Barra E, Vitale D, Bariffi F, Sacchetti L et al. Lung cancer metastatic cells detected in blood by reverse transcriptase-polymerase chain reaction and dot-blot analysis. *J.Clin.Oncol.* (1997), 15: 3388-3393.
- Chan MW, Hui AB, Yip SK, Ng CF, Lo KW, Tong JH, Chan AW, Cheung HY, Wong WS, Chan PS, Lai FM, To KF. Progressive increase of genetic alteration in urinary bladder cancer by combined allelotyping analysis and comparative genomic hybridization. *Int J Oncol.* (2009), 34(4): 963-970.
- Chang WY, Cairns P, Schoenberg MP, Polascik TJ and Sidransky D. Novel suppressor loci on chromosome 14q in primary bladder cancer. *Cancer Res.* (1995), 55: 3246-3249.
- Chatterjee SJ, Geroge B, Goebell PJ, Alava-Tafreshi M, Shi SR, Fung YK, Jones PA, Cordon-Cardo C, Datar RH, Cote RJ. *J Pathol* (2004) Jul; 203(3): 762-770.

- Chen XQ, Bonnefoi H, Pelte MF, Lyautey J, Lederey C, Movarekhi S, Schaeffer P, Mulcahy HE, Meyer P et al. Telomerase RNA as a detection marker in the serum of breast cancer patients. *Clin.Cancer Res.* (2000), 6: 3823-3826.
- Chen XQ, Stroun M, Magnenat JL, Nicod LP, Kurt AM, Lyautey J, Lederey C und Anker P. Microsatellite alterations in plasma DNA of small cell lung cancer patients. *Nat.Med.* (1996), 2: 1033-1035.
- Christensen M, Wolf H und Orntoft TF. Microsatellite alterations in urinary sediments from patients with cystitis and bladder cancer. *Int.J.Cancer* (2000), 85: 614-617.
- Chudek J, Wilhelm M, Kenck C, Bugert P, Ritz E, Waldman F und Kovacs G. The genetics of renal tumors in end-stage renal failure differs from those occurring in the general population. *J.Am.Soc.Nephrol.* (1998), 9: 1045-1051.
- Chughtai SA, Crundwell MC, Cruickshank NR, Affie E, Armstrong S, Knowles MA, Takle LA, Kuo M, Khan N et al. Two novel regions of interstitial deletion on chromosome 8p in colorectal cancer. *Oncogene* (1999), 18; 657-665.
- Cole P. Coffee-drinking and cancer of the lower urinary tract. *Lancet* i (1971): 1335.
- Coleman JF, Hansel DE. Utility of diagnostic and prognostic markers in urothelial carcinoma of the bladder. *Adv.Anat.Pathol.* (2009), 16(2): 67-78.
- Collin-Chavagnac D, Marcais C, Billon S, Descotes F, Piaton E, Decaussin M, Rodriguez-Lafrasse C und Ruuffion A. Quantitative loss of heterozygosity analysis for urothelial carcinoma detection and prognosis. *Urology* (2010), 76(2): 5515.e1-7.
- Compton DA, Cleveland DW NuMA is required for proper completion of mitosis. *J Cell Biol* (1993) 120: 947-957.
- Cooksley CD, Avritscher EB, Grossman HB et al. Clinical model of cost of bladder cancer in the elderly. *Urologie A* (2008), 71(3): 519-525.
- Cookson MS, Herr HW, Zhang ZF, Soloway S, Sogani PC und Fair WR. The treated natural history of high risk superficial bladder cancer: 15-year outcome. *J.Urol.* (1997), 158: 62-67.
- Coombs LM, Pigott DA, Sweeney E, Proctor AJ, Eydmann ME, Parkinson C und Knowles MA. Amplification and over-expression of c-erbB-2 in transitional cell carcinoma of the urinary bladder. *Br.J.Cancer* (1991), 63: 601-608.

- Cordon-Cardo C, Wartinger D, Petrylak D, Dalbagni G, Fair WR, Fuks Z und Reuter VE. Altered expression of the retinoblastoma gene product: prognostic indicator in bladder cancer. *J.Natl.Cancer Inst.* (1992), 84: 1251-1256.
- Cordon-Cardo C, Zhang ZF, Dalbagni G, Drobnjak M, Charytonowicz E, Hu SX, Xu HJ, Reuter VE und Benedict WF. Cooperative effects of p53 and pRB alterations in primary superficial bladder tumors. *Cancer Res.* (1997), 57: 1217-1221.
- Cordon-Cardo C, Cote JR, Sauter G. Genetic and molecular markers of urothelial premalignancy and malignancy. *Scand J Urol Nephrol Suppl.* (2000);(205): 82-93. Review.
- Coulet F, Blons H, Cabelguenne A, Lecomte T, Lacourreye O, Brasnu D, Beaune P, Zucman J und Laurent-Puig P. Detection of plasma tumor DNA in head and neck squamous cell carcinoma by microsatellite typing and p53 mutation analysis. *Cancer Res.* (2000), 60: 707-711.
- Cowland JB, Hother C, Gronbaek K. MicroRNAs and cancer. *APMIS* (2007), 115: 1090-1106.
- Crew JP, O'Brien T, Bradburn M et al. Vascular endothelial growth factor is a predictor of relapse and stage progression in superficial bladder cancer. *Cancer Res.* (1997), 57(23): 5281-5285.
- Crundwell MC, Chughtai S, Knowles M, Takle L, Luscombe M, Neoptolemos JP, Morton DG und Phillips SM. Allelic loss on chromosomes 8p, 22q and 18q (DCC) in human prostate cancer. *Int.J.Cancer* (1996), 69: 295-300.
- Cui J, Rohr LR, Swanson G, Speights VO, Maxwell T und Brothman AR. Hypermethylation of the caveolin-1 gene promotor in prostate cancer. *Prostate* (2001), 46: 249-256.
- Dalbagni G, Presti J, Reuter V, Fair WR und Cordon-Cardo C. Genetic alterations in bladder cancer. *Lancet* (1993), 342: 469-471.
- Dalbagni G, Presti JC, Jr., Reuter V,E, Zhang ZF, Sarkis AS, Fair WR und Cordon-Cardo C. Molecular genetic alterations of chromosome 17 and p53 nuclear overexpression in human bladder cancer. *Diagn.Mol.Pathol.* (1993), 2: 4-13.
- Dalbagni G, Ren ZP, Herr H, Cordon-Cardo C und Reuter V. Genetic alterations in tp53 in recurrent urothelial cancer: a longitudinal study. *Clin.Cancer Res.* (2001), 7: 2797-2801.
- Daniely M, Rons R, Kaplan T et al. Combined morphologic and fluorescence in situ hybridization analysis of voided urine samples for the detection and follow-up of bladder cancer in patients with benign urine cytology. *Cancer* (2007), 25(6): 517-524.

- Datta SN, Allen GM, Evans R et al. Urinary tract ultrasonography in the evaluation of haematuria – a report over 1.000 cases. *Ann.R.Coll.Surg.Engl.*(2002), 84: 203-205.
- DeGregori J, Leone G, Ohtani K, Miron A, Nevins JR. E2F-1 accumulation bypasses a G1 arrest resulting from the inhibition of G1 cyclin-dependent kinase activity. *Genes Dev.* (1995) Dec 1;9(23): 2873-2887.
- Denzinger S, Stoehr R, Schwarz S, Eichenseher N, BrockhoffG, Obermann EC, Knuechel R, Blaszyk H, Hartmann A, Wild PJ. Low level STK15 amplification in histologically benign urothelium of patients with bladder cancer adversely predicts patients outcome following cystectomy. *Int J Oncol.* (2007) Oct;31(4): 793-802.
- Devlin J, Keen Aj und Knowles MA. Homozygous deletion mapping at 9p21 in bladder carcinoma defines a critical region within 2cM of IFNA. *Oncogene* (1994), 9: 2757-2760.
- di Martino E, Tomlinson DC, Knowles MA. A decade of FGF Receptor Research in Bladder Cancer: Past, Present and Future Challanges. *Adv. Urol.* 2012; (2012): 429213. Epub 2012 Jul 31.
- Dong SM, Kim HS, Rha SH und Sidransky D. Promoter hypermethylation of multiple genes in carcinoma of the uterine cervix. *Clin.Cancer Res.* (2001), 7:1982-1986.
- Duffy MJ, O`Donovan N, Brennan DJ, Gallagher WM, Ryan BM. Survivin: a promising tumor marker. *Cancer Lett* (2007); 249(1):49-60.
- Eble JN, Sauter G, Epstein JI, Sesterhenn IA. World Health Organization classification of tumours. Pathology and genetics of tumours of the urinary system and malegenital organs. IARC Press: Lyon, (2004)
- Eisenberger CF, Schoenberg M, Enger C, Hortopan S, Shah S, Chow NH, Marshall FF und Sidransky D. Diagnosis of renal cancer by molecular urinalysis, *J.Natl.Cancer Inst.* (1999), 91: 2028-2032.
- Elder PA, Bell SM und Knowles MA. Deletion of two regions on chrmosome 4 in bladder carcinoma: definition of a critical 750kB region at 4p16.3. *Oncogene* (1994), 9: 3433-3436.
- Ennis RD, Katz AE, De Vries GM, Heitjan DF, O`Toole KM, Rubin M, Buttyan R, Benson MC und Schiff PB. Detection of circulating prostate carcinoma cells via an enchanced reverse trancriptase-polymerase chain reaction assay in patients with early atage prostate carcinoma. Independence from other pretreatment characteristics. *Cancer* (1997), 79: 2402-2408.

- Ergün S, Kilik N, Ziegeler G et al. CEA-related cell adhesion molecule 1: a potent angiogenic factor and a major effector of vascular endothelial growth factor. *Mol.Cell* (2000), 5(2): 311-320.
- Esquela-Kerscher A, Slack FJ. Oncomirs – microRNAs with a role in cancer. *Nat.Rev.Cancer* (2006), 6: 259-269.
- Esrig D, Elmajian D, Groshen S, Freeman JA, Stein JP, Chen SC, Nichols PW, Skinner DG, Jones PA et al. Accumulation of nuclear p53 and tumor progression in bladder cancer. *N.Engl.J.Med.* (1994), 331: 1259-1264.
- Esteller M, Sanchez-Cespedes M, Rosell R, Sidransky D, Baylin SB und Herman JG. Detection of aberrant promoter hypermethylation of tumor suppressor genes in serum DNA from non-small cell lung cancer patients. *Cancer Res.* (1999), 59: 67-70.
- Esteller M, Sparks A, Toyota M, Sanchez-Cespedes M, Capella G, Peinado MA, Gonzalez S, Tarafa G, Sidransky D et al. Analysis of adenomatous polyposis coli promoter hypermethylation in human cancer. *Cancer Res.* (2000), 60: 4366-4371.
- Fearon ER, Feinberg AP, Hamilton SH und Vogelstein B. Loss of genes on the short arm of chromosome 11 in bladder cancer. *Nature* (1985), 318: 377-380.
- Fearon ER & Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* (1990), 61: 759-767
- Ferrigno D, Buccheri G und Biggi A. Serum tumour markers in lung cancer: history, biology and clinical applications. *Eur.Respir.J.* (1994), 7: 186-197.
- Fitzgerald JM, Ramchurren N, Rieger K, Levesque P, Silverman M, Libertino JA und Summerhayes IC. Identification of H-ras mutations in urine sediments complements cytology in the detection of bladder tumors. *J.Natl.Cancer Inst.* (1995), 87: 129-133.
- Fliss MS, Usadel H, Caballero OL, Wu L, Buta MR, Eleff SM, Jen J und Sidransky D. Facile detection of mitochondrial DNA mutations in tumors and bodily fluids. *Science* (2000), 287: 2017-2019.
- Folkman J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N.Engl.J.Med.* (1971), 285(21): 1182-1186.
- Folkman J, Merler E, Abernathy C, Williams G. Isolation of a tumor factor responsible for angiogenesis. *J.Exp.Med.* (1971), 133: 275-288.
- Fuji Y, Kageyama Y, Kawakami S, Kihara K und Oshima H. Detection of disseminated urothelial cancer cells in peripheral venous blood by a cytokeratin 20-specific nested reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *Jpn.J.Cancer Res.* (1999), 90: 753-757.

- Fujimoto K, Yamada Y, Okajima E, Kakizoe T, Sasaki H, Sugimura T, Terada M. Frequent association of p53 gene mutation in invasive bladder cancer. *Cancer Res.* (1992) Mar 15; 52(6): 1393-1398.
- Gazzaniga P, Gandini O, Giuliani L et al. Detection of epidermal growth factor receptor mRNA in peripheral blood: a new marker of circulating neoplastic cells in bladder cancer patients. *Clin.Cancer Res.* (2001), 7(3): 577-583.
- Glas AS, Roos D, Deutekom M et al. Tumor markers in the diagnosis of primary bladder cancer. A systematic review. *J.Urol.* (2003), 169: 1975-1982.
- Goebell PJ, Knowles MA. Bladder cancer or bladder cancers? Genetically distinct malignant conditions of the urothelium. *Urol.Oncol.* (2010), 28(4): 409-428.
- Goessl C. Laser-flourescence microsatellite analysis and new results in microsatellite analysis of plasma/serum DNA of cancer patients. *Ann.N.Y.Acad.Aci.* (2000), 906: 63-66.
- Goessl C, Heicappell R, Munker R, Anker P, Stroun M, Krause H, Muller M und Miller K. Microsatellite analysis of plasma DNA from patients with clear cell renal carcinoma. *Cancer Res.* (1998), 58: 4728-4732.
- Goessl C, Krause H, Muller M, Heicappell R, Schrader M, Sachsinger J und Miller K. Flourescent methylation-specific polymerase chain reaction for DNA-based detection of prostate cancer in bodily fluids. *Cancer Res.* (2000), 60: 5941-5945.
- Goessl C, Muller M, Heicappell R, Krause H, Straub B, Schrader M und Miller K. DNA-based detection of prostate cancer in urine after prostatic massage. *Urology* (2001), 58: 335-338.
- Gonzalez R, Silva JM, Sanchez A, Dominguez G, Garcia JM, Chen XQ, Stroun M, Provencio M, Espana P et al. Microsatellite alterations and TP53 mutations in plasma DNA of small- cell lung cancer patients: follow-up study and prognostic significance. *Ann.Oncol.* (2000), 11: 1097-1104.
- Gootardo F, Liu CG, Ferracin M et al. MicroRNA profiling in kidney and bladder cancers. *Urol.Oncol.* (2007), 25: 387-392.
- Gradilone A, Petracca A, Nicolazzo C et al. Prognostic significance of survivin-expressing circulating tumour cells in pT1G3 bladder cancer. *BJU Int* (2010), 106: 710-715.

- Gravas S, Bosinakou I, Kehayas P, Giannopoulos A. Urinary basic fibroblast growth factor in bladder cancer patients. Histopathological correlation and clinical potential. *Urol.Int.* (2004), 73(2): 173-177.
- Gregoire M, Fradet Y, Meyer F, Tetu B, Bois R, Bedard G, Charrois R, Naud A. Diagnostic accuracy of urinary cytology and desoxyribonucleic acid flow cytometry and cytology on bladder washings during follow-up for bladder tumors. *J Urol* (1997), 157: 1660–1664.
- Grem J. The prognostic importance of tumor markers in adenocarcinomas of the gastrointestinal tract. *Curr.Opin.Oncol.* (1997), 9: 380-387.
- Gudjonsson S, Isfoss BL, Hansson K et al. The value of the UroVysion assay for surveillance of non-muscle-invasive bladder cancer. *Eur.Urol.* (2008), 54(2): 402-408.
- Gutiérrez Banos JL, Rebollo Rodrigo MH, Antolin Juárez FM, Martín García B. NMP 22, BTA stat test and cytology in the diagnosis of bladder cancer: a comparative study. *Urol.Int.* (2001), 66(4): 185-190.
- Habuchi T, Devlin J, Elder PA und Knowles MA. Detailed deletion mapping of chromosome 9q in bladder cancer: evidence for two tumour suppressor loci. *Oncogene* (1995), 11: 1671-1674.
- Habuchi T, Luscombe M, Elder PA und Knowles MA. Structure and methylation-based silencing of a gene (DBCCR1) within a candidate bladder cancer tumor suppressor region at 9q32-q33. *Genomics* (1998), 48: 277-288.
- Habuchi T, Takahashi R, Yamada H, Kakehi Y, Sugiyama T und Yoshida O. Metachronous multifocal development of urothelial cancers by intraluminal seeding. *Lancet* (1993a), 342: 1087-1088.
- Habuchi T, Takahashi R, Yamada H, Ogawa O, Kakehi Y, Ogura K, Hamazaki S, Toguchida J, Ishizaki K et al. Influence of cigarette smoking and schistosomiasis on p53 gene mutation in urothelial cancer. *Cancer Res.* (1993b), 53: 3795-3799.
- Habuchi T, Takahashi T, Kakinuma H, Wang L, Tsuchiya N, Satoh S, Akao T, Sato K, Ogawa O et al. Hypermethylation at 9q32-33 tumour suppressor region is age-related in normal urothelium and an early and frequent alteration in bladder cancer. *Oncogene* (2001), 20: 531-537.
- Habuchi T, Yoshida O und Knowles MA. A novel candidate tumour suppressor locus at 9q32-33 in bladder cancer: localization of the candidate region within a single 840 kb YAC. *Hum.Mol. Genet.* (1997), 6: 913-919.

- Halling KC, King W, Sokolova IA et al. A comparison of cytology and fluorescence in situ hybridization for the detection of urothelial carcinoma. *J.Urol.* (2000), 164: 1768-1775.
- Halling KC, King W, Sokolova IA, Karnes RJ, Meyer RG; Powell EL, Sebo EJ, Chevillie JC, Clayton AC, Krajnik KL, Ebert TA, Nelson RE, Burkhardt HM, Ramakumar S, Stewart CS, Pankratz VS, Lieber MM, Blute ML, Zincke H, Seelig SA, Jenkins RB, O' Kane DJ. A comparison of BTA stat, hemoglobin dipstick, telomerase and Vysis UroVision assays for the detection of urothelial carcinoma in urine. *J Urol.* (2002) May; 167(5):2001-6.
- Hanke S, Bugert P, Chudek J und Kovacs G. Cloning a calcium channel alpha2delta-3 subunit gene from a putative tumor suppressor gene region at chromosome 3p21.1 in conventional renal cell carcinoma. *Gene* (2001), 264: 69-75.
- Hartmann A, Moser K, Kriegmair M, Hofstetter A, Hofstaedter F und Knuechel R. Frequent genetic alterations in simple urothelial hyperplasias of the bladder in patients with papillary urothelial carcinoma. *Am.J.Pathol.* (1999), 154: 721-727.
- Hautmann R, Huland H. *Urologie* (2001), 8: 204-217.
- Hautmann S, Eggers , Meyhoff H, Melchior D, Munk A, Hamann M, Naumann M, Braun PM, Jünemann KP. Tumor markers for bladder cancer. Up-to-date study by the Kiel Tumor Bank. *Urologe* (2007), 46:1508-13.
- Hatzichristodoulou G, Kübler H, Schwaibold H, Wagenpfeil S, Eibauer C, Gschwend J und Treiber U. Nukleäres Matrix Protein 22 (NMP22) als urinbasierter Tumormarker für die Detektion von primären und rezidivierenden Harnblasenkarzinomen: Ergebnisse einer prospektiven Studie zum Vergleich der Point-of-care-Version (NMP22 BladderChek®) und des NMP22 ELISA Test. *Urologe – 50[Suppl. 1]* (2011), V1.3: 10.
- Hautmann S, Eggers J, Meyhoff H et al. Tumor markers for bladder cancer: Up to date study by the Kiel tumor bank. *Urologe* (2007), 46(11): 1508-1513.
- Hazzaa SM, Elashry OM, Afifi IK. Clusterin as a diagnostic and prognostic marker for transitional cell carcinoma of the bladder. *Pathol.Oncol.Res.* (2010), 16(1): 101-109.
- Hegele A, Kosche B, Schrader AJ, Sevinc S, Olbert PJ, Hofmann R, Kropf J. Das Transitionalzellkarzinom der Harnblase: Evaluation von zellulärem Fibronektin im Plasma als stadienabhängiger Marker. *Urologe* (2008), 47: 1137-1140.

- Heine B, Hummel M, Muller M, Heicappell R, Miller K und Stein H. Non-radioactive measurement of telomerase activity in human bladder cancer, bladder washings, and in urine. *J.Pathol.* (1998), 184: 71-76.
- Herbers J, Schullerus D, Chudek J, Bugert P, Kanamaru H, Zeisler J, Ljungberg B, Akhtar M und Kovacs G. Lack of genetic changes at specific genomic sites separates renal oncocytomas from renal cell carcinomas. *J.Pathol.* (1998), 184: 58-62.
- Herman JG, Graff JR, Myohanen S, Nelkin BD und Baylin SB. Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands. *Proc.Natl.Acad.Sci:U.S.S* (1996), 93: 9821-9826.
- Herman JG, Jen J, Merlo A und Baylin SB. Hypermethylation-associated inactivation indicates a tumor suppressor role for p15INK4B. *Cancer Res.* (1996), 56: 722-727.
- Herman JG, Merlo A, Mao L, Lapidus RG, Issa JP, Davidson NE, Sidransky D und Baylin SB. Inactivation of the CDKN2/p16/MTS1 gene is frequently associated with aberrant DNA methylation in all common human cancers. *Cancer Res.* (1995), 55: 4525-4530.
- Herman MP, Svatek RS, Totan Y et al. Urinebased biomarkers for the early detection and surveillance of non-muscle invasive bladder cancer. *Minerva Urol.Nefrol.* (2008), 60(4): 217-235.
- Herr HW. Tumour progression and survival in patients with T1G3 bladder tumours: 15-year outcome. *Br.J.Urol.* (1997), 80: 762-765.
- Herr HW & Reuter VE. Progression of T1 bladder tumors: better staging or better biology? *Cancer* (1999), 86: 908-912.
- Hibi K, Robinson CR, Brooker S, Wu L, Hamilton SR, Sidransky D und Jen J. Molecular detection of genetic alterations in the serum of colorectal cancer patients. *Cancer Res.* (1998), 58: 1405-1407.
- Hickey KP, Boyle KP, Jepps HM, Andrew AC, Buxton EJ und Burns PA. Molecular detection of tumour DNA in serum and peritoneal fluid from ovarian cancer patients. *Br.J.Cancer* (1999), 80: 1803-1808.
- Hofstädter F, Delgado R, Jakse G, Judmaier W. Urothelial dysplasia and carcinoma in situ of the bladder. *Cancer.* (1986) Jan 15;57(2):356-361.
- Holmäng S, Hedelin H, Anderstorm C und Johansson SL. The relationship among multiple recurrences, progression and prognosis of patients with stages Ta and T1 transitional cell cancer of the bladder followed for at least 20 years. *J.Urol.* (1995), 153: 1823-1826.

- Hornigold N, Devlin J, Davies AM, Aveyard JS, Habuchi T und Knowles MA. Mutation of the 9q34 gene TSC1 in sporadic bladder cancer. *Oncogene* (1999), 18: 2657-2661.
- Hovey RM, Chu L, Balazs M, DeVries S, Moore D, Sauter G, Carroll PR und Waldman FM. Genetic alterations in primary bladder cancers and their metastases. *Cancer Res.* (1998), 58: 3555-3560.
- Hwang EC, Choh HS, Jung SI et al. Use of the NMP22 bladdercheck test in the diagnosis and follow-up of urothelial cancer: A cross-sectional study. *Urology* (2011), 77: 154-159.
- Iorio MV, Ferracin M, Liu CG et al. MicroRNA gene expression deregulation in human breast cancer. *Cancer Res.* (2005), 65: 7065-7070.
- Ishikawa J, Xu HJ, Hu SX, Yandell DW, Maeda S, Kamidono S, Benedict WF und Takahashi R. Inactivation of the retinoblastoma gene in human bladder and renal cell carcinomas. *Cancer Res.* (1991), 51: 5736-5743.
- Ishiwata S, Takahashi S, Homma Y, Tanaka Y, Kameyama S, Hosaka Y und Kitamura T. Noninvasive detection and prediction of bladder cancer by fluorescence in situ hybridization analysis of exfoliated urothelial cells in voided urine. *Urology* (2001), 57: 811-815.
- Jachertz D, Anker P, Maurice PA und Stroun M. Information carried by the DNA released by antigen-stimulated lymphocytes. *Immunology* (1979), 37: 753-763.
- Jacobs BL, Lee CT, Montie JE. Bladder cancer in 2010. How far have we come? *CA Cancer J.Clin.* (2010), 60: 244-272.
- Jakse G, Jacobi GH, Altwein JE. Adenocarcinoma of the bladder (author's transl). *Urologe A.* (1979) Mar; 18(2):86-90. German.
- Jen J, Wu L und Sidransky D. An overview on the isolation and analysis of circulating tumor DNA in plasma and serum. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* (2000), 906: 8-12.
- Jocham D, Miller K. (Herausgeber) *Praxis der Urologie*. In zwei Bänden. Band II 3. überarbeitete Auflage. Kapitel 47.3 S74.
- Jungmann O, Zumbé J. Urothelkarzinom: Tumormarker im Screening von Risikogruppen: Auf Spurensuche im Urin. *Uro-News* (2009), 9: 29-36.
- Junker K, Werner W, Mueller C, Ebert W, Schubert J und Claussen U. Interphase cytogenetic diagnosis of bladder cancer on cells from urine and bladder washing. *Int.J.Oncol.* (1999), 14: 309-313.

- Kaasinen E, Wijkstrom H, Malmstrom PU, Hellsten S, Duchek M, Mestad O, and Rintala E (2003) Alternating mitomycin C and BCG instillations versus BCG alone in treatment of carcinoma in situ of the urinary bladder: a nordic study. *Eur Urol.* (2003), 43(6): 637-645.
- Kagan J, Liu J, Stein JD, Wagner SS, Babkowski R, Grossman BH und Katz RL. Cluster of allele losses within a 2.5 cM region of chromosome 10 in highgrade invasive bladder cancer. *Oncogene* (1998), 16: 909-913.
- Kallioniemi A, Kallioniemi OP, Citro G, Sauter G, DeVries S, Kerschmann R, Carroll P und Waldman F. Identification of gains and losses of DNA sequences in primary bladder cancer by comparative genomic hybridization. *Genes Chromosomes.Cancer* (1995), 12: 213-219.
- Kaneda T, Hoshi S, Mao H et al. Detection of urogenital malignant cells in the peripheral blood by nested RT-PCR using keratin 19 mRNA. *Nippon Hinyokika Gakkai Zasshi* (1998), 89(1): 33-42.
- Karam JA, Lotan Y, Karakiewicz PI, et al. Use of combined apoptosis biomarkers for prediction of bladder cancer recurrence and mortality after radical cystectomy. *Lancet Oncol.* (2007), 8:128-136.
- Kargaonkar C, Zhao L, Modestou M, Quelle DE. ARF function does not require p53 stabilization or Mdm2 relocalization. *Mol Cell Biol.* (2002) Jan, 22(1):196-206.
- Kassen A & Hofmockel G. [Molecular genetic and cell biology principles for the development of malignant tumors. *Urologe A* (2000), 39: 214-221.
- Katayama H, Sasai K, Kawai H, Yuan ZM, Bondaruk J, Suzuki F, Fujii S, Arlinghaus RB, Czerniak BA, Sen S. Phosphorylation by aurora kinase A induces Mdm2-mediated destabilization and inhibition of p53. *Nat Genet.* (2004) Jan;36(1):55-62. Epub 2003 Dec 14.
- Kawakami K, Brabender J, Lord RV, Groshen S, Greenwald BD, Krasna MJ, Yin J, Fleisher AS, Abraham JM et al. Hypermethylated APC DNA in plasma and prognosis of patients with esophageal adenocarcinoma. *J.Natl.Cancer Inst.* (2000), 92: 1805-1811.
- Ke YW, Dou Z, Zhang J, Yao XB. Function and regulation of Aurora/lpl1p kinase family in cell division. *Cell Res.* (2003) Apr; 13(2):69-81.
- Kersting M, Friedl C, Kraus A, Behn M, Pankow W und Schuermann M. Differential frequencies of p16(INK4a) promoter hypermethylation, p53 mutation, and K-ras mutation in exfoliative material mark the development of lung cancer in symptomatic chronic smokers. *J.Clin.Oncol.* (2000), 18: 3221-3229.

- Kiemeney LA, Witjes JA, Verbeek AL et al. The clinical epidemiology of superficial bladder cancer. Dutch South-East Cooperative Urological Group. *Br.J.Cancer* (1993), 67: 806-812.
- Kilic N, Oliveira-Ferrer L, Wurmbach HJ et al. Pro-angiogenic signaling by the endothelial presence of CEACAM1. *J.Biol.Chem* (2005), 280(3): 2361-2369.
- Kim EJ, Kim Yj, Jeong P, Ha YS, Bae SC, Kim WJ. Methylation of the RUNX3 promoter as a potential prognostic marker for bladder tumor. *J Urol* (2008), 180(3):1141-1145.
- Kim YK, Kim WJ. Epigenetic markers as promising prognosticators for bladder cancer. *Int J Urol* (2008), 16(1): 17-22.
- Kinders R, Jones T, Root R et al. Complement factor H or a related protein is a marker for transitional cell cancer of the bladder. *Clin.Cancer Res.* (1998), 4: 2511-2520.
- Kinjo M, Okegawa T, Horie S et al. Detection of circulating MUC7-positive cells by reverse transcription-polymerase chain reaction in bladder cancer patients. *Int.J.Urol.* (2004), 11(1): 38-43.
- Kirkali G, Tuzel E, Guler C et al. Significance of tissue laminin P(1) elastase and fibronectin levels in transitional cell carcinoma of the bladder. *Eur.Urol.* (2001), 39: 292-299.
- Kirsh EJ, Baunoch DA, Stadler WM. Expression of bcl-2 and bcl-X in bladder cancer. *J.Urol.* (1998), 159: 1348-1353.
- Kito H, Suzuki H, Ichikawa T, Sekita N, Kamiya N, Akakura K, Igarashi T, Nakayama T, Watanabe M et al. Hypermethylation of the CD44 gene is associated with progression and metastasis of human prostate cancer. *Prostate* (2001), 49: 110-115.
- Klavins JV. Advances in biological markers for cancer. *Ann.Clin.Lab Sci.* (1983a), 13: 275-280.
- Klavins JV. Gastrointestinal tumor markers, other than carcinoembryonic antigen, and alpha fetal protein. *Cancer Detect.Prev.* (1983b), 6: 131-136.
- Knowles MA. The genetics of transitional cell carcinoma: progress and potential clinical application. *BJU.Int.* (1999), 84: 412-427.
- Knowles MA, Elder PA, Williamson M, Cairns JP, Shaw ME und Law MG. Allelotype of human bladder cancer. *Cancer Res.* (1994), 54: 531-538.

- Knowles MA, Shaw ME und Proctor AJ. Deletion mapping of chromosome 8 in cancers of the urinary bladder using restriction fragment length polymorphisms and microsatellite polymorphisms. *Oncogene* (1993), 8: 1357-1364.
- Knowles MA & Williamson M. Mutation of H-ras is infrequent in bladder cancer: confirmation by single-strand conformation polymorphism analysis, designed restriction fragment length polymorphisms, and direct sequencing. *Cancer Res.* (1993), 53: 133-139.
- Knudson AG, Jr. & Strong LC. Mutation and cancer: a model for Wilms' tumor of the kidney. *J.Natl.Cancer Inst.* (1973), 52: 198-204.
- Knüchel R, Lindemann-Doctor K. Urinbasierte Tumordiagnostik des Harnblasenkarzinoms: Auswirkungen der neuen histopathologischen Klassifikation – Ein Denkanstoß. *Urologe* (2009), 48: 598-608.
- Koffler D, Agnello V, Winchester R und Kunkel HG. The occurrence of single-stranded DNA in the serum of patients with systemic lupus erythematosus and other diseases. *J.Clin.Invest* (1973), 52: 198-204.
- Konety B, Lotan Y. Urothelial bladder cancer: biomarkers for detection and screening. *BJU Int.* (2008), 102(9 Pt B): 1234-1241.
- Kopreski MS, Benko FA, Kwee C, Leitzel KE, Eskander E, Lipton A und Gocke CD. Detection of mutant K-ras DNA in plasma or serum of patients with colorectal cancer. *Br.J.Cancer* (1997), 76: 1293-1299.
- Korkolopoulou P, Christodoulou P, Lazaris A, Thomas-Tsagli E, Kapralos P, Papanikolaou A, Kalliterraki I und Davaris P. Prognostic implications of aberrations in p16/pRb pathway in urothelial bladder carcinomas: a multivariate analysis including p53 expression and proliferation markers. *Eur.Urol.* (2001), 39: 167-177.
- Koss LG, Deitch D, Ramanathan R, Sherman AB. Diagnostic value of cytology of voided urine. *Acta Cytol* (1985), 29: 810–816.
- Kovacs G. [Molecular genetics and diagnosis of renal cell tumors]. *Urologe A* (1999), 38: 433-441.
- Kovacs G, Akhtar M, Beckwith BJ, Bugert P, Cooper CS, Delahunt B, Eble JN, Fleming S, Ljungberg B et al. The Heidelberg classification of renal cell tumours. *J.Pathol.* (1997), 183: 131-133.
- Kramer MW, Kuczyk MA, Hennenlotter J et al. Decreased expression of galectin-3 predicts tumour recurrence in pTa bladder cancer. *Oncol.Rep.* (2008), 20(6): 1403-1408.

- Kramer MW, Golshani R, Merseburger A, Caruso D, Stenzel A, Kuczyk M, Soloway M, Lokeshwar VB. Ein Urin-basierter real-time PCR Test erkennt Harnblasenkarzinome mittels Analyse von HYAL1 Hyaluronidase und HA-1,2&3 Synthetasen. *Urologe Supp.V3.3* (2008). 78
- Kramer MW, Golshani R, Merseburger AS et al. HYAL-1 hyluronidase: a potential prognostic indicator for progression to muscle invasion and recurrence in bladder cancer. *Eur.Urol.* (2010), 57(1): 86-93.
- Kunze E, Calude J, Frentzel-Beyme R. Association of cancer of the lower urinary tract with consumption of alcoholic beverages – a case control study. *arcinogenesis* (1986), 7: 163
- Labrie F, Candas B, Dupont A, Cusan L, Gomez JL, Suburu RE, Diamond P, Levesque J und Belanger A. Screening decreases prostate cancer death: first analysis of the 1988 Quebec prospective randomized controlled trial. *Prostate* (1999), 38: 83-91.
- Lamerz R, Stieber O und Fateh-Moghadam A. Serum marker combinations in human breast cancer (review). *In Vivo* (1993), 7: 607-613.
- Latif F, Tory K, Gnarr J, Yao M, Duh FM, Orcutt ML, Stackhouse T, Kuzmin I, Modi W et al. Identification of the von Hippel-Lindau disease tumor suppressor gene. *Science* (1993), 260: 1317-1320.
- Legrand G, Soliman H, Dubosq F, Vérine J, Desgrandchamps F, de Thé H, Mongiat-Artus P, Ploussard G. Prevalence and spectrum of microsatellite alterations in nonmuscle invasive bladder cancers. *Am J Cancer Res* (2011), 1(5):595-603.
- Leon SA, Ehrlich GE, Shapiro B und Labbate VA. Free DNA in the serum of rheumatoid arthritis patients. *J.Rheumatol.* (1977), 4: 139-143.
- Leon SA, Green A, Yaros MJ und Shapiro B. Radioimmunoassay for nanogram quantities of DNA. *J.Immunol.Methods* (1975), 9: 157-164.
- Leon SA, Shapiro B, Servi P und Parsons RG. A comparison of DNA and DNA-binding protein levels in malignant disease. *Eur.J.Cancer* (1981), 17: 533-538.
- Leon SA, Shapiro B, Sklaroff DM und Yaros MJ. Free DNA in the serum of cancer patients and the effect of therapy. *Cancer Res.* (1977), 37: 646-650.
- Lewis BP, Burge CB, Bartel DP. Conserved seed pairing, often flanked by adenosins, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell* (2005), 120: 15-20.

- Li M, Zhang ZF, Reuter VE und Cordon-Cardo C. Chromosome 3 allelic losses and microsatellite alterations in transitional cell carcinoma of the urinary bladder. *Am.J.Pathol.* (1996), 149: 229-235.
- Li SM, Zhang ZT, Chan S et al. Detection of circulating uroplakin-positive cells in patients with transitional cell carcinoma of the bladder. *J.Urol.* (1999), 162(3 Pt 1): 931-935.
- Lin X, Tascilar M, Lee WH, Vles WJ, Lee BH, Veeraswamy R, Asgari K, Freije D, van Rees B et al. GSTP1 CpG Island Hypermethylation Is Responsible for the Absence of GSTP1 Expression in Human Prostate Cancer Cells. *Am.J.Pathol.* (2001), 159: 1815-1826.
- Lindemann-Docter K, Knüchel-Clarke R. Histopathologie des Harnblasenkarzinoms – Entscheidend für das Management der betroffenen Patienten. *Urologe A* (2008), 47(5): 627-636.
- Linn JF, Lango M, Halachmi S, Schoenberg MP und Sidransky D. Microsatellite analysis and telomerase activity in archived tissue and urine samples of bladder cancer patients. *Int.J.Cancer* (1997), 74: 625-629.
- Lipponen PK & Liukkonen TJ. Reduced expression of retinoblastoma (Rb) gene protein is related to cell poliferation and prognosis in transitional-cell bladder cancer. *J.Cancer Res.Clin.Oncol.* (1995), 121: 44-50.
- Lo YM, Chan LY, Lo KW, Leung SF, Zhang J, Chan AT, Lee JC, Hjelm NM, Johnson PJ et al. Quantitative analysis of cell-free Epstein-Barr virus DNA in plasma of patients with nasopharyngeal carcinoma. *Cancer Res.* (1999), 59: 1188-1191.
- Lo YM, Wong IH, Zhang J, Tein MS, Ng MH und Hjelm NM. Quantitative analysis of abberant p16 methylation using real-time quantitative methylation-specific polymerase chain reaction. *Cancer Res.* (1999), 59: 3899-3903.
- Logothetis CJ, Xu HJ, Ro JY, Hu SX, Sahin A, Ordonez N und Benedict WF. Altered expression of retinoblastoma protein and known prognostic variables in locally advanced bladder cancer. *J.Netl.Cancer Inst.* (1992), 84: 1256-1261.
- Lokeshwar VB, Habuchi T, Grossman HB et al. Bladder tumor markers beyond cytology: International Consensus Panel on bladder tumor markers. *Urology* (2005), 66: 35-63.
- Lokeshwar VB, Habuchi T, Grossman HB et al. Cytology and tumor markers: Markers beyond cytology. In: Soloway MS (ed) *Bladder Tumors*. 21 edn. Health publications limited, Paris France (2006), pp 65-138.

- Lokeshwar VB, Obek C, Soloway MS und Block NL. Tumor-associated hyaluronic acid: a new sensitive and specific urine marker for bladder cancer. *Cancer Res.* (1997), 57: 773-777.
- Lopez-Beltran A, Alvarez-Kindelan J, Luque RJ, Blanca A, Quintero A, Montironi R, Cheng L, Gozalez-Camporab R, Requena MJ. Loss of heterozygosity at 9q32-33 (DBC1 locus) in primary non-invasive papillary urothelial neoplasm of low malignant potential and low-grade urothelial carcinoma of the bladder and their associated normal urothelium. *J Path* (2008), 215(3):263-72.
- Lotan Y, Elias K, Svatek RS et al. Bladder cancer screening in a high risk asymptomatic population using a point of care urine based protein tumor marker. *J.Urol.* (2009), 182(1): 52-57; discussion 58.
- Lu J, Getz G, Miska EA et al. MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature* (2005), 435: 834-838.
- Lu JJ, Kakehi Y, Takahashi T et al. Detection of circulating cancer cells by reverse transcription-polymerase chain reaction for uroplakin II in peripheral blood of patients with urothelial cancer. *Clin.Cancer Res.* (2000), 6(8): 3166-3171.
- Mahnert B, Tauber S, Kriegmair M et al. BTA-TRAK – a useful diagnostic tool in urinary bladder cancer? *Anticancer Res.* (1999), 19: 2615-2619.
- Malone PR, Visvanathan KV, Ponder BA, Shearer RJ und Summerhayes IC. Oncogenes and bladder cancer. *Br.J.Urol.* (1985), 57: 664-667.
- Mandel P & Metais P. Les acides nucleiques du plasma sanguin chez l'homme. *C.R.Acad.Sci.Paris* (1948), 142 : 241-243.
- Mao L, Hruban RH, Boyle JO, Tockman M und Sidransky D. Detection of oncogene mutations in sputum precedes diagnosis of lung cancer. *Cancer Res.* (1994), 54: 1634-1637.
- Mao L, Schoenberg MP, Scicchitano M, Erozan YS, Merlo A, Schwab D und Sidransky D. Molecular detection of primary bladder cancer by microsatellite analysis. *Science* (1996), 271: 659-662.
- Marcus PM, Hayes RB, Vineis P, Garcia-Closas M, Caporaso NE, Autrup H et al.. Cigarette smoking, N-acetyltransferase 2 acetylation status, and bladder cancer risk: a case-series meta-analysis of a gene-environment interaction. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* (2000), 9: 461-467.
- Margulis V, Lotan Y, Shariat SF. Survivin : a promising biomarker for detection and prognosis of bladder cancer. *World J Urol* (2007).

- Martin KJ, Kritzman BM, Price LM, Koh B, Kwan CP, Zhang X, Mackay A, O'Hare MJ, Kaelin CM et al. Linking gene expression patterns to therapeutic groups in breast cancer. *Cancer Res.* (2000), 60: 2232-2238.
- Mayall F, Jacobson G, Wilkins R und Chang B. Mutations of p53 gene can be detected in the plasma of patients with large bowel carcinoma. *J.Clin.Pathol.* (1998), 51: 611-613.
- Mellon JK, Lunec J, Wright C, Horne CH, Kelly P und Neal DE. C-erbB-2 in bladder cancer: molecular biology, correlation with epidermal growth factor receptors and prognostic value. *J.Urol.* (1996), 155: 321-326.
- Meloni AM, Peier AM, Haddad FS, Powell IJ, Block AW, Huben RP, Todd I, Potter W und Sandberg AA. A new approach in the diagnosis and follow-up of bladder cancer. FISH analysis of urine, bladder washings, and tumors. *Cancer Genet.Cytogenet.* (1993), 71:105-118.
- Mengual L, Marín-Aguilera M, Ribal MJ et al. Clinical utility of fluorescent in situ hybridization for the surveillance of bladder cancer patients treated with bacillus Calmette Guerin therapy. *Eur.Urol.* (2007), 52(3): 752-759.
- Merlo A, Herman JG, Mao L, Lee DJ, Gabrielson E, Burger PC, Baylin SB und Sidransky D. 5' CpG island methylation is associated with transcriptional silencing of the tumour suppressor p16/CDKN2/MTS1 in human cancers. *Nat.Med.* (1995), 1: 686-692.
- Messing EM. Clinical implications of the expression of epidermal growth factor receptors in human transitional cell carcinoma. *Cancer Res.* (1990), 50(8): 2530-2537.
- Mhaweche-Fauceslia P, Cheney RT, Schwaller J. Genetic Alterations in Urothelial Bladder Carcinoma. *Cancer 2006*; 106(6):1205-1216.
- Mian C, Pycha A, Wiener H, Haitel A, Lodde M und Marberger M. Immunocyt: a new tool for detecting transitional cell cancer of the urinary tract. *J.Urol* (1999), 161: 1486-1489.
- Miozzo M, Sozzi G, Musso K, Pilotti S, Incarbone M, Pastorino U und Pierotti MA. Microsatellite alterations in bronchial and sputum specimens of lung cancer patients. *Cancer Res.* (1996), 56: 2285-2288.
- Mitchell PS, Parkin RK, Kroh EM et al. Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. *Proc.Natl.Acad.Sci USA* (2008), 105: 10513-10518.

- Mitra AP, Birkhan M, Cote RJ. p53 and retinoblastoma pathways in bladder cancer. *World J Urol.* (2007) Dec, 25(6): 536-71. Epub 2007 Aug 21 Review.
- Miyamoto H, Shuin T, Torigoe S, Iwasaki Y und Kubota Y. Retinoblastoma gene mutations in primary human bladder cancer. *Br.J.Cancer* (1995), 71: 831-835.
- Moreno JG, Croce CM, Fischer R, Monne M, Vihko P, Mulholland SG und Gomella LG. Detection of hematogenous micrometastasis in patients with prostate cancer. *Cancer Res.* (1992), 52: 6110-6112.
- Moriyama M, Akiyama T, Yamamoto T, Kawamoto T, Kato T, Sato K, Watanuki T, Hikage T, Katsuta N et al. Expression of c-erbB-2 gene product in urinary bladder cancer. *J.Urol.* (1991), 145: 423-427.
- Mourah S, Cussenot O, Vimont V, Desgrandchamps F, Teillac P, Cochant-Priollet B, Le Duc A, Fiet J und Soliman H. Assessment of microsatellite instability in urine in the detection of transitional-cell carcinoma of the bladder. *Int.J.Cancer* (1998), 79: 629-633.
- Mulcahy HE, Croke DT und Farthing MJ. Cancer and mutant DNA in blood plasma. *Lancet* (1996), 348: 628.
- Mulcahy HE, Lyautey J, Ledderrey C, qi C, X, Anker P, Alstead EM, Ballinger A, Farthing MJ und Stroun M. A prospective study of K-ras mutations in the plasma of pancreatic cancer patients. *Clin.Cancer Res.* (1998), 4: 271-275.
- Mullis Kary B. The polymerase chain reaction. Birkhäuser, Boston (1994)
- Murakami Y, Yasuda T, Saigo K et al. Comprehensive analysis of microRNA expression patterns in hepatocellular carcinoma and non-tumorous tissues. *Oncogene* (2006), 25: 2537-2545.
- Murphy WM Current status of urinary cytology in the evaluation of bladder neoplasms. *Hum.Pathol.* (1990) Sep; 21(9): 886-96.Review.
- Murphy WM, Rivera-Ramirez I, Medina CA, Wright NJ, Waijsman Z. The bladder tumor antigen (BTA) test compared to voided urine cytology in the detection of bladder neoplasms. *J Urol* (1997), 158: 2102-2106.
- Muscheck M, Sukosd F, Pesti T und Kovacs G. High density deletion mapping of bladder cancer localizes the putative tumor suppressor gene between loci D8S504 and D8S264 at chromosome 8p23.3. *Lab Invest* (2000), 80: 1089-1093.

- Müller M, Krause H, Heicappell R, Tischendorf J, Shay JW und Miller K. Comparison of human telomerase RNA and telomerase activity in urine for diagnosis of bladder cancer. *Clin.Cancer Res.* (1998), 4: 1949-1954.
- Nawroth R, Hartmann A, Kurzrock A, Wild P, Sidhu SS, Lehmann J, Stöhr R, Gschwend JE, Retz M, Deutscher Forschungsverbund Harnblasenkarzinom e.V. EMMPRIN (CD147): ein Schlüsselprotein in der Tumorprogression des Harnblasenkarzinoms. *Urologe Supp.* P 7.6(2008), 34.
- Nawroz H, Koch W, Anker P, Stroun M und Sidransky D. Microsatellite alternations in serum DNA of head and neck cancer patients. *Nat.Med.* (1996), 2: 1035-1037.
- Nezos A, Pissimisis N, Lembessis P et al. Detection of circulating tumor cells in bladder cancer patients. *Cancer Treat.Rev.* (2009), 35(3): 272-279.
- Nguyen M, Watanabe H, Budson AE et al. Elevated levels of an angiogenic peptide, basic fibroblast growth factor, in the urine of patients with a wide spectrum of cancers. *J.Natl.Cancer Inst.* (1994), 86(5): 356-361.
- Nielsen ME, Gonzalgo ML, Schoenberg MP, Getzenberg RH. Toward critical valuation of the role(s) of molecular biomarkers in the management of bladder cancer. *World J Urol* (2006), 24(5):499-508.
- Nishiyama H, Takahashi T, Kakehi Y, Habuchi T und Knowles MA. Homozygous deletion at the 9q32-33 candidate tumor suppressor locus in primary human bladder cancer. *Genes Chromosomes.Cancer* (1999), 26: 171-175.
- Nobori T, Miura K, Wu DJ, Lois A, Takabayashi K und Carson DA. Deletions of the cyclin-dependent kinase-4 inhibitor gene in multiple human cancers. *Nature* (1994), 368: 753-756.
- Nollau P, Moser C, Weinland G und Wagener C. Detection of K-ras mutations in stools of patients with colorectal cancer by mutant-enriched PCR. *Int.J.Cancer* (1996), 66: 332-336.
- O'Brien T, Cranston D, Fuggle S at. Two mechanism of basic fibroblast growth factor-induced angiogenesis in bladder cancer. *Cancer Res.* (1997), 57(1): 136-140.
- Oers JM van, Wild PJ, Burger M et al. FGFR3 mutations and a normal CK20 staining pattern define low-grade noninvasive urothelial bladder tumours. *Eur.Urol.* (2007), 52(3): 760-768.
- Oesterling JE. Prostate-specific antigen: a valuable clinical tool. *Oncology (Huntingt)* (1991a), 5: 107-122.

- Oesterling JE. Prostate specific antigen: a critical assessment of the most useful tumor marker for adenocarcinoma of the prostate. *J.Urol.* (1991b), 145: 907-923.
- Ohgaki K, Iida A, Ogawa O, Kubota Y, Akimoto M und Emi M. Localization of tumor suppressor gene associated with distant metastasis of urinary bladder cancer to a 1-Mb interval on 8p22. *Genes Chromosomes.Cancer* (1999), 25: 1-5.
- Okegawa T, Kinjo M, Nutahara K et al. Value of reverse transcription polymerase chain assay in peripheral blood of patients with urothelial cancer. *J.Urol.* (2004), 171(4): 1461-1466.
- Olsson CA, De Vries GM, Buttyan R und Katz AE. Reverse transcriptase-polymerase chain reaction assays for prostate cancer. *Urol.Clin.North Am.* (1997), 24: 367-378.
- Orlow I, Lacombe L, Hannon GJ, Serrano M, Pellicer I, Dalbagni G, Reuter VE, Zhang ZF, Beach D et al. Deletion of the p16 and p15 genes in human bladder tumors. *J.Natl.Cancer Inst.* (1995), 87: 1524-1529.
- Osmàn I, Kang M, Lee A et al. Detection of circulating cancer cells expressing uroplakins and epidermal growth factor receptor in bladder cancer patients. *Int.J.Cancer* (2004), 111(6): 934-939.
- Osman I, Bajorin DE, Sun TT et al. Novel blood biomarkers of human urinary bladder cancer. *Clin.Cancer Res.* (2006), 12(11 Pt 1): 3374-3380.
- Oya M, Schmidt B, Schmitz-Drager BJ und Schulz WA. Expression of G1-->S transition regulatory molecules in human urothelial cancer. *Jpn.J.Cancer Res.* (1998), 89: 719-726.
- Palmedo G, Fischer J, Kovacs G. Fluorescent microsatellite analysis reveals duplication of specific chromosomal regions in papillary renal cell tumors. *Lab Invest* (1997), 77(6).
- Palmedo G, Fischer J und Kovacs G. Duplications of DNA sequences between loci D20S478 and D20S206 at 20q11.2 and between loci D20S902 and D20S480 at 20q13.2 mark new tumor genes in papillary renal cell carcinoma. *Lab Invest* (1999), 79: 311-316.
- Palmisano WA, Divine KK, Saccomanno G, Gilliland FD, Baylin SB, Herman JG und Belinsky SA. Predicting lung cancer by detecting aberrant promoter methylation in sputum. *Cancer Res.* (2000), 60: 5954-5958.
- Palou J, Salvador J, Parada R, Chechile G, Millan F, and Vicente J. Carcinoma in situ of the prostatic urethra: the role of intravesical BCG. *Urol Integr Invest* (2001), 6: 165-170

- Papanicolaou GN, Marshall VF. Urine sediment smears as a diagnostic procedure in cancers of the urinary tract. *Science* (1945), 101: 519.
- Peck K, Sher YP, Shih JY, Roffler SR, Wu CW und Yang PC. Detection and quantitation of circulating cancer cells in the peripheral blood of lung cancer patients. *Cancer Res.* (1998), 58: 2761-2765.
- Ponsky LE, Sharma S, Pandrangi L et al. Screening and monitoring for bladder cancer: refining the use of NMP22. *J.Urol* (2011), 166:75-78.
- Poulakis V, Witzsch U, De Vries R et al. A comparison of urinary nuclear matrix protein-22 and bladder tumour antigen tests with voided urinary cytology in detecting and following bladder cancer : the prognostic value of false-positive results. *BJU Int.* (2001), 88(7): 692-701.
- Pornthanakasem W, Shotelersuk K, Termrungruanglert W, Voravud N, Niruthisard S und Mutirangura A. Human papillomavirus DNA in plasma of patients with cervical cancer. *BMC.Cancer* (2001), 1:2.
- Presti JC, Jr., Reuter VE, Cordon-Cardo C, Motzer RJ, Albino AP, Jhanwar SC und Nanus DM. Expression of the retinoblastoma gene product in renal tumors. *Anticancer Res.* (1996), 16: 549-556.
- Presti JC, Jr., Reuter VE, Galan T, Fair WR und Cordon-Cardo C. Molecular genetic alterations in superficial and locally advanced human bladder cancer. *Cancer Res.* (1991), 51: 5405-5409.
- Proctor AJ, Coombs LM, Cairns JP und Knowles MA. Amplification at chromosome 11q13 in transitional cell tumours of the bladder. *Oncogene* (1991), 6: 789-795.
- Przbojewska B, Jagiella A, Jalmuzna P. H-Ras, K-Ras and N-Ras gene activation in human bladder cancers. *Cancer Genet Cytogenet* (2000), 123: 73
- Pycha A, Mian C, Haitel A et al. Fluorescence in situ hybridization identifies more aggressive types of primarily noninvasive (stage pTa) bladder cancer. *J.Urol.* (1997), 157(6): 2116-2119.
- Raghavan D, Huben R. Management of bladder cancer, *Curr. Probl. Cancer* (1995) Jan-Feb; 19(1):1-64.Review.
- Raitanen MP, FinnBladder Group. The role of BTA stat test in follow-up of patients with bladder cancer: results from FinnBladder studies. *World J.Urol.* (2008), 26:45-50.
- Ramakumar S, Bhuiyan J, Besse JA, Roberts SG, Wollan PC, Blute ML, O’Kane DJ. Comparison of screening methods in the detection of bladder cancer. *J Urol* (1999), 161: 388–394

- Rassekh CH, Johnson JT und Eibling DE. Circulating markers in squamous cell carcinoma of the head and neck: a review. *Eur.J.Cancer B Oral Oncol.* (1994), 30B: 23-28.
- Ratto C, Flamini G, Sofo L, Nucera P, Ippoliti M, Curgliano G, Ferretti G, Sgambato A, Merico M et al. Detection of oncogenes mutation from neoplastic colonic cells exfoliated in feces. *Dis.Colon Rectum* (1996), 39: 1238-1244.
- Reddy EP, Reynolds RK, Santos E, Barbacid M. A point mutation is responsible for the acquisition of transforming properties by the T24 human bladder carcinoma oncogene. *Nature.* (1982) Nov 11;300(5888):149-152.
- Retz M, Lehmann J, Röder C, Weichert-Jacobsen K, Loch T, Romahn E, Luhl C, Kalthoff H und Stockle M. Cytokeratin-20 reverse-transcriptase polymerase chain reaction as a new tool for the detection of circulating tumor cells in peripheral blood and bone marrow of bladder cancer patients. *Eur.Urol.* (2001), 39: 507-515; discussion 516-517.
- Reznikoff CA, Belair CD, Yeager TR, Savelieva E, Blesloch RH, Puthenveetil JA und Cuthill S. A molecular genetic model of human bladder cancer pathogenesis. *Smin.Oncol.* (1996), 23: 571-584.
- Reznikoff CA, Sarkar S, Jülicher KP, Burger MS, Puthenveetil JA, Jarrard DF, Newton MA. Genetic alterations and biological pathways in human bladder cancer pathogenesis. *Urol Oncol.* (2000) Sep 1;5(5): 191-203.
- Rhodes CH, Honsinger C und Sorenson GD. Detection of tumor-derived DNA in cerebrospinal fluid. *J.Neuropathol.Exp.Neurol.* (1994), 53: 364-368.
- Richter J, Jiang F, Gorog JP, Sartorius G, Egenter C, Gasser TC, Moch H, Mihatsch MJ und Sauter G. Marked genetic differences between stage pTa and stage pT1 papillary bladder cancer detected by comparative genomic hybridization. *Cancer Res.* (1997), 57: 2860-2864.
- Robert Koch Institut (Hrsg.): Krebs in Deutschland 2007/2008. Häufigkeiten und Trends. Berlin 2012.
- Rosas SL, Koch W, Costa Carvalho MG, Wu L, Califano J, Wstra W, Jen J und Sidransky D. Promoter hypermethylation patterns of p16, O6-methylguanine-DNA- methyltransferase, and death-associated protein kinase in tumors and saliva of head and neck cancer patients. *Cancer Res.* (2001), 61: 939-942.

- Rosin MP, Cairns P, Epstein JI, Schoenberg BP und Sidransky D. Partial allelotype of carcinoma in situ of the human bladder. *Cancer Res.* (1995), 55: 5213-5216.
- Rotem D, Cassel A, Lindenfeld N, Mecz Y, Sova Y, Resnick M und Stein A. Urinary cytokeratin 20 as a marker for transitional cell carcinoma. *Eur.Urol.* (2000), 37: 601-604.
- Rübben H, Bubenzer J, Bokenkamp K, Lutzeyer W, Rathert P. Grading of transitional cell tumors of the urinary tract by urine cytology *Urol Res* (1979), 7: 83-91
- Ruvkun G. Molecular biology. Glimpses of a tiny RNA world. *Science* (2001), 294: 797-799.
- Sakaki M, Oka N, Nakanishi R et al. Serum level of galectin-3 in human bladder cancer. *J.Med.Invest.* (2008), 55(1-2): 127-132.
- Sanchez-Carbayo M, Urrutia M, Gonzalez de Buitrago JM et al. Evaluation of two new urinary tumor markers : bladder tumors fibronectin and cytokeratin 18 for the diagnosis of bladder cancer. *Clin.Cancer Res.* (2000), 6: 3585-3594.
- Sandberg AA & Berger CS. Review of chromosome studies in urological tumors. II. Cytogenetics and molecular genetics of bladder cancer. *J.Urol.* (1994) 151: 545-560.
- Sarkar S, Julicher KP, Burger MS, Della V, V, Larsen CJ, Yeager TR, Grossman TB, Nickells RW, Protzel C et al. Different combinations of genetic/epigenetic alterations inactivate the p53 and rRb pathways in invasive human bladder cancers. *Cancer Res.* (2000), 60: 3862-3871.
- Sarkis AS, Dalbagni G, Cordon-Cardo C, Melamed J, Zhang ZF, Sheinfeld J, Fair WR, Herr HW und Reuter VE. Association of p53 nuclear overexpression and tumor progression in carcinoma in situ of the bladder. *J.Urol.* (1994), 152: 388-392.
- Sarkis AS, Dalbagni G, Cordon-Cardo C, Zhang ZF, Sheinfeld J, Fair WR, Herr HW und Reuter VE. Nuclear overexpression of p53 protein in transitional cell bladder carcinoma: a marker for disease progression. *J.Natl.Cancer.Inst* (1993), 85: 53-59.
- Sarosdy MF, Schellhammer P, Bokinsky G et al. (2002) Clinical evaluation of a multi-target fluorescent in situ hybridization assay for detection of bladder cancer. *J Urol* 168: 1950-1954.
- Sauter G & Mihatsch MJ. Pussycats and baby tigers: non-invasive (pTa) and minimally invasive (pT1) bladder carcinomas are not the same! *J.Pathol.* (1998), 185: 339-341.

- Sauter G, Moch H, Moore D, Carroll P, Kerschmann R, Chew K, Mihatsch MJ, Gudat F und Waldman F. Heterogeneity of erbB-2 gene amplification in bladder cancer. *Cancer Res.* (1993), 53: 2199-2203.
- Scelo G, Brennan P. The epidemiology of bladder and kidney cancer. *Nature Clin.Pract.Urol.* (2007), 4: 205-217.
- Schaefer A, Jung M, Kristiansen G, Lein M, Schrader M, Miller K, Erbersdobler A, Stephan C, Jung K. Mikro-RNA in der Uroonkologie: Neue Hoffnungen für die Diagnostik und Therapie von Tumoren? *Urologe* (2009), 48: 877-885.
- Schäfer A, Stephan C, Busch J et al. Diagnostic, prognostic and therapeutic implications of minorRNAs in urologic tumors. *Nat.Rev.Urol.* (2010), 7:286-297.
- Schneider A, Borgnat S, Lang H, Regine O, Lindner V, Kassem M, Suassine C, Oudet P, Jacqmin D et al. Evaluation of microsatellite analysis in urine sediment for diagnosis of bladder cancer. *Cancer Res.* (2000), 60: 4617-4622.
- Schullerus D, Herbers J, Chudek J, Kanamura H und Kovacs G. Loss of heterozygosity at chromosome 8p, 9p and 14q is associated with stage and grade of non-papillary renal cell carcinomas. *J.Pathol.* (1997), 183: 151-155.
- Selmy MA, Ibrahim GH, El Serafi TI und Ghobeish AA. Evaluation of urinary proepithelin as a potential biomarker for bladder cancer detection and prognosis in Egyptian patients. *Cancer biomarkers* (2010), 7(3): 163-170.
- Serrano M, Hannon GJ, Beach D. A new regulatory motif in cell-cycle control causing specific inhibition of cyclin D/CDK4. *Nature* (1993) Dec 16;366(6456): 704-707.
- Shapiro B, Chakrabaty M, Cohn EM und Leon SA. Determination of circulating DNA levels in patients with benign or malignant gastrointestinal disease. *Cancer* (1983), 51: 2116-2120.
- Shariat SF, Ashfaq R, Karakiewicz PI et al. Survivin expression is associated with bladder cancer presence, stage, progression and mortality. *Cancer* (2007), 109(6): 1106-1113.
- Shariat SF, Karakiewicz PI, Godoy G et al. Survivin as a prognostic marker for urothelial carcinoma of the bladder: A multicenter external validation study. *Clin.Cancer Res.* (2009), 15: 7012-7019.
- Sharp JD, Hausladen DA, Maher MG, Wheeler MA, Altieri DC, Weiss RM. Bladder cancer detection with urinary survivin, an inhibitor of apoptosis. *Front Biosci* (2002), 7: E36-E41

- Shaw JA, Smith BM, Walsh T, Johnson S, Primrose L, Slade MJ, Walker RA und Coombes RC. Microsatellite alterations plasma DNA of primary breast cancer patients. *Clin.Cancer Res.* (2000), 6: 1046-1051.
- Shaw ME & Knowles MA. Deletion mapping of chromosome 11 in carcinoma of the bladder. *Genes Chromosomes.Cancer Clin.Cancer Res.* (1995), 13: 1-8.
- Shotelersuk K, Khorprasert C, Sakdikul S, Pornthanakasem W, Voravud N und Utirangura A. Epstein-Barr virus DNA in serum/plasma as a tumor marker for nasopharyngeal cancer. *Clin.Cancer Res.* (2000), 6: 1046-1051.
- Sidransky D. Nucleic acid-based methods for the detection o cancer. *Science* (1997), 278: 1054-1059.
- Sidransky D, Frost P, von Eschenbach A, Oyasu R, Preisinger AC und Vogelstein B. Clonal origin bladder cancer. *N.Engl.J.Med.* (1992), 326: 737-740.
- Sidransky D, von Eschenbach A, Tsai YC, Jones P, Summerhayes I, Marshall F, Paul M, GreenP, Hamilton SR et al. Identification of p53 gene mutations in bladder cancers and urine samples. *Science* (1991), 252: 706-709.
- Silva JM, Dominguez G, Garcia JM, Gonzalez R, Villanueva MJ, Navarro F, Provencio M, San Martin S, Espana P et al. Presence of tumor DNA in plasma of breast cancer patients: clinicopathological correlations. *Cancer Res.* (1999), 59: 3251-3256.
- Silva JM, Gonzalez R, Dominguez G, Garcia JM, Espana P und Bonilla F. TP53 gene mutations in plasma DNA of cancer patients. *Genes Chromosomes. Cancer* (1999), 24: 160-161.
- Simon M, Park TW, Köster G, Mahlberg R, Hackenbroch M, Boström J, Löning T, Schramm J. Alterations of INK4a(p16-p14ARF)/INK4b(p15) expression and telomerase activation in meningioma progression. *J Neurooncol.* (2001) Dec;55(3): 149-58.
- Simon R, Eltze E, Schafer KL, Burger H, Semjonow A, Hertle L, Dockhorn-Dworniczak B, Terpe HJ und Bocker W. Cytogenetic analysis of multifocal bladder cancer supports a monoclonal origin and intraepithelial spread of tumor cells. *Cancer Res.* (2001), 61: 355-362.
- Simoneau M, Aboukassim TO, LaRue H, Rousseau F und Fradet Y. Four tumor suppressor loci on chromosome 9q in bladder cancer: evidence for two novel candidate regions at 9q22.3 and 9q31. *Oncogene* (1999), 18: 157-163.

- Slaton JW, Benedict WF, Dinney CP. p53 in bladder cancer: mechanism of action, prognostic value and target for therapy. *Urology* (2001) May; 57(5): 852-859.
- Smith B, Selby P, Southgate J, Pittman K, Bradley C und Blair GE. Detection of melanoma cells in peripheral blood by means of reverse transcriptase and polymerase chain reaction. *Lancet* (1991), 338: 1227-1229.
- Smith SD, Wheeler MA, Plescia J et al. Urine detection of survivin and diagnosis of bladder cancer. *JAMA* (2001), 285: 324-328.
- Sobin LH & Wittekind C. TNM classification of malignant tumors, John Wiley & Sons, Inc., (1997).
- Sobin LH, CH. Wittekind C. TNM Classification of Malignant Tumours. John Wiley & Sons, Hoboken, New Jersey, (2002), (6): 199-202.
- Soloway MS, Briggman V, Carpinito GA, Chodak GW, Church PA, Lamm DL, Lange P, Messing E, Pasciak RM, Reservitz GB, Rukstalis DB, Sarosdy MF, Stadler WM, Thiel RP, Hayden CL. Use of a new tumor marker, urinary NMP22, in the detection of occult or rapidly recurring transitional cell carcinoma of the urinary tract following surgical treatment. *J Urol* (1996), 156: 363-367
- Sorensen GD, Pribish DM, Valone FH, Memoli VA, Bzik DJ und Yao SL. Soluble normal and mutated DNA sequences from single-copy genes in human blood. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* (1994), 3: 67-71.
- Sozzi G, Conte D, Mariani L, Lo VS, Roz L, Lombardo C, Pierotti MA und Tavecchino L. Analysis of circulating tumor DNA in plasma at diagnosis and during follow-up of lung cancer patients. *Cancer Res.* (2001), 61: 4675-4678.
- Sozzi G, Musso K, Ratcliffe C, Goldstraw P, Pierotti MA und Pastorino U. Detection of microsatellite alterations in plasma DNA of non-small cell lung cancer patients: a prospect for early diagnosis. *Clin. Cancer Res.* (1999), 5: 2689-2692.
- Spruck CH, III, Gonzalez-Zulueta M, Shibata A, Simoneau AR, Lin MF, Gonzales F, Tsai YC und Jones PA. P16 gene in uncultured tumours. *Nature* (1994), 370: 183-184.
- Spruck CH, III, Ohneseit PF, Gonzalez-Zulueta M, Esrig D, Miyao N, Tsai YC, Lerner SP, Schmutte C, Yang AS et al. Two molecular pathways to transitional cell carcinoma of the bladder. *Cancer Res.* (1994), 54: 784-788.

- Spruck CH, III, Ohneseit PF, Gonzalez-Zulueta M, Esrig D, Miyao N, Tsai YC, Lerner SP, Schmutte C, Yang AS et al. Two molecular pathways to transitional cell carcinoma of the bladder. *Cancer Res.* (1993), 53: 1162-1166.
- Stadler WM & Olopade OI. The 9p21 region in bladder cancer cell lines: large homozygous deletion inactivate the CDKN2, CDKN2B and MTAP genes. *Urol.Res.* (1996), 24: 239-244.
- Steiner G, Schoenberg MP, Linn JF, Mao L und Sidransky D. Detection of bladder cancer recurrence by microsatellite analysis of urine. *Nat.Med.* (1997), 3: 621-624.
- Steiner G & Sidransky D. Molecular differential diagnosis of renal carcinoma: from microscopes to microsatellites. *Am.J.Pathol.* (1996), 149: 1791-1795.
- Steinman CR. Free DNA in serum and plasma from normal adults. *J.Clin.Invest* (1975), 56: 512-515.
- Stenzl A, Cowan NC, De Santis M et al. The updated eau guidelines on muscle-invasive and metastatic bladder cancer. *Eur.Urol.* (2009), 55: 815-825.
- Störkel S, Eble JN, Adlakha K, Amin M, Blute ML, Bostwick DG, Darson M, Delahunt B und Iczkowski K. Classification of renal cell carcinoma: Workgroup No. 1. Union Internationale Contre le Cancer (UICC) and the American Joint Committee on Cancer (AJCC). *Cancer* (1997), 80: 987-989.
- Stott FJ, Bates S, James MC, McConnell BB, Starborg M, Brookes S, Palmero I, Ryan K, Hara E, Vousden KH, Peters G. The alternative product from the human CDKN2A locus, p14(AFR), participates in a regulatory feedback loop with p53 and MDM2. *EMBO J.* (1998) Sep 1;17(17):5001-5014.
- Straub B, Müller M, Krause H, Goessl C, Schrader M, Heicappell R und Miller K. Reverse transcriptase-polymerase chain reaction for prostate-specific antigen in the molecular staging of pelvic surgical margins after radical prostatectomy. *Urology* (2001), 57: 1006-1011.
- Stroun M, Anker P, Lyautey J, Lederrey C und Maurice PA. Isolation and characterization of DNA from the plasma of cancer patients. *Eur.J.Cancer Clin.Oncol.* (1987), 23: 707-712.
- Stroun M, Maurice P, Vasioukhin V, Lyautey J, Ledderrey C, Lefort F, Rossier A, Chen XQ und Anker P. The origin and mechanism of circulating DNA. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* (2000), 906: 161-168.

- Sturgeon CM, Duffy MJ, Hofmann BR, et al. National Academy of Clinical Biochemistry Laboratory medicine Practice Guidelines for use of tumor markers in liver, bladder, cervical and gastric cancers. *Clin.Chem.* (2010), 56:e1-48.
- Sugano K, Tsutsumi M, Nakashima Y, Yamaguchi K, Ohkura H, Kakizoe T und Sekiya T. Diagnosis of bladder cancer by analysis of the allelic loss of the p53 gene in urine samples using blunt-end single-strand conformation polymorphism. *Int.J.Cancer* (1997), 74: 403-406.
- Sunwoo JB, Sun PC, Gupta VK, Schmidt AP, El Mofty S und Scholnick SB. Localization of a putative tumor suppressor gene in the sub-telomeric region of chromosome 8p. *Oncogene* (1999), 18: 2651-2655.
- Sullivan PS, Chan JB, Levin MR et al. Urine cytology and adjunct markers for detection and surveillance of bladder cancer. *Am.J.Transl.Res.* (2010), 2: 412-440.
- Swana HS, Grossman D, Anthony JN et al. Tumor content of the antiapoptosis molecule survivin and recurrence of bladder cancer. *N.Engl.J.Med.* (1999), 341(6): 452-453.
- Szarvas T, Kovalsky I, Bedi K, Szendroi A, Majoros A, Riesz P, Füle T, Laszlo V, Kiss A, Romics I. Deletion analysis of tumor and urinary DNA to detect bladder cancer: urine supernatant versus urine sediment. *Oncol Rep* (2007), 18(2):405-409.
- Tabin CJ, Bradley SM, Bargmann CI, Weinberg RA, Papageorge AG, Scolnick EM, Dhar R, Lowy DR und Chang EH. Mechanism of activation of a human oncogene. *Nature* (1982), 300: 143-149.
- Tada M, Omata M, Kawai S, Saisho H, Ohto M, Saiki RK und Sninsky JJ. Detection of ras gene mutations in pancreatic juice and peripheral blood of patients with pancreatic adenocarcinoma. *Cancer Res.* (1993), 53: 2472-2474.
- Takagi Y, Takahashi M, Koshikawa T, Sakata T, Oshima S. Immunohistochemical demonstration of cyclin D1 in bladder cancer as an inverse indicator of invasiveness but not an independent prognostic factor. *Int J Urol.* (2000) Oct;7(10):366-372.
- Takahashi T, Habuchi T, Kakehi Y, Mitsumori K, Akao T, Terachi T und Yoshida O. Clonal and chronological genetic analysis of multifocal cancers of the bladder and upper urinary tract. *Cancer Res.* (1998), 58: 5835-5841.
- Takeda S, Ichii S und Nakamura Y. Detection of K-ras mutation in sputum by mutant-allele-specific amplification (MASA). *Hum.Mutat.* (1993), 2: 112-117.

- Takle LA & Knowles MA. Deletion mapping implicates two tumor suppressor genes on chromosome 8p in the development of bladder cancer. *Oncogene* (1996a), 12: 1083-1087.
- Takle LA & Knowles MA. Deletion mapping implicates two tumor suppressor genes on chromosome 8p in the development of bladder cancer. *Oncogene* (1996b), 12: 1083-1087.
- Tan EM, Schur PH, Carr RI und Kunkel HG. Deoxyribonucleic acid (DNA) and antibodies to DNA in the serum of patients with systemic lupus erythematosus. *J.Clin.Invest* (1966), 45: 1732-1740.
- Taylor KJ & Schwartz PE. Screening for early ovarian cancer. *Radiology* (1994), 192: 1-10.
- Theodorescu D, Frierson HF, Jr. Und Sikes RA. Molecular determination of surgical margins using fossa biopsies at radical prostatectomy. *J.Urol.* (1999), 161: 1442-1448.
- Thomas F, Noon AP, Rubin N, Goepel JR, Catto JW. Comparative outcomes of primary, recurrent and high-risk non-muscle-invasive bladder cancer. *Eur. Urol.* (2012) Sep. 5 pii: S0302-2838(12)01017-2.
- Tilki D, Burger M, Dalbagni G, Grossman HB, Hakenberg OW, Palou J, Reich O, Rouprêt M, Shariat SF und Zlotta AR. Urine markers for detection and surveillance of non-muscle-invasive bladder cancer. *Eur.Urol.* (2011), 60(3): 484-492.
- Torrance CJ, Jackson PE, Montgomery E, Kinzler KW, Vogelstein B, Wissner A, Nunes M, Frost P und Discafani CM. Combinatorial chemoprevention of intestinal neoplasia. *Nat.Med.* (2000), 6: 1024-1028.
- Tritschler S, Zaak D, Knuechel R, Stief CG. Urinzytologie und Urinmarker – Bedeutung für die Praxis. *Urologe* (2006), 45: 1441-1448.
- Tsai YC, Nichols PW, Hiti Al, Williams Z, Skinner DG und Jones PA. Allelic losses of chromosome 9, 11, and 17 in human bladder cancer. *Cancer Res.* (1990), 50: 44-47.
- Tyrkus M, Powell I, Fakr W. Cytogenetic studies of carcinoma in situ of the bladder: prognostic implications. *J.Urol.* (1992), 148(1): 44-46.
- Tzai TS, Chen SH, Ho CC, Tsai YS, Cheng HC, Dai YC, Lin JS, Yang WH, Chow NH. Clinical significance of allelotype profiling for urothelial carcinoma. *Urology* (2003), 62(2):378-384.
- Underwood M, Bartlett J, Reeves J, Gardiner DS, Scott R und Cooke T. C.erbB-2 gene amplification: a molecular marker in recurrent bladder tumors? *Cancer Res.* (1995), 55: 2422-2430.

- van Brussel JP & Mickisch GH. Prognostic factors in renal cell and bladder cancer. *BJU.Int.* (1999), 83: 902-908.
- Van der Aa MN, Zwarthoff EC, Steyerberg EW, Boogaard MW, Nijsen Y, van der Keur KA, van Exsel AJ, Kirkels WJ, Bangma C und van der Kwast TH. Microsatellite analysis of voided-urine samples for surveillance of low grade non-muscle-invasive urothelial carcinoma: feasibility and clinical utility in a prospective multicenter study (Cost-Effectiveness of Follow-Up of Urinary Bladder Cancer trial [CEFUB]). *Eur.Urol.* (2009), 55(3): 659-667.
- van Oers JM, Adam C, Denzinger S, Stoehr R, Bertz S, Zaak D, Stief C, Hofstaedter F, Zwarthoff EC, van der Kwast TH, Knuechel R, Hartmann A. Chromosome 9 deletions are more frequent than FGFR3 mutations in flat urothelial hyperplasias of the bladder. *Int J Cancer* (2006), 119(5):1212-1215.
- van Rhin G, van der Kwast TH, Vis AN, et al. FGFR3 and p53 characterize alternative genetic pathways in the pathogenesis of urothelial cell carcinoma. *Cancer Res* (2004), 64:1911-1914.
- van Rhijn BW, Lurkin I, Kirkels WJ, van der Kwast TH, Zwarthoff EC. Microsatellite analysis – DNA test in urine competes with cystoscopy in follow-up of superficial bladder carcinomas: a phase II trial. *Cancer* (2001), 92: 768-775.
- Van Rhijn BW, van der Poel HG, van der Kwast TH. Urine markers for bladder cancer surveillance: a systematic review. *Eur.Urol.* (2005), 47(6): 736-748.
- Vasioukhin V, Anker P, Maurice P, Lyautey J, Ledderrey C und Stroun M. Point mutations of the N-ras gene in the blood plasma DNA of patients with myelodysplastic syndrome or acute myelogenous leukaemia. *Br.J.Haematol.* (1994), 86: 774-779.
- Veeramachaneni R, Nordberg ML, Shi R et al. Evaluation of fluorescence in situ hybridization as an ancillary tool to urine cytology in diagnosing urothelial carcinoma. *Diagn.Cytopathol.* (2003), 28:301-307.
- Verkaik NS, van Steenbrugge GJ, van Weerden WM, Bussemakers MJ und van der Kwast TH. Silencing of CD44 expression in prostate cancer by hypermethylation of the CD44 promoter region. *Lab Invest* (2000), 80: 1291-1298.
- Volinia S, Calin GA, Liu CG et al. A microRNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets. *Proc.Natl.Acad.Sci Usa* (2006), 103: 2257-2261.
- vom Dorp F. Combined cytology/cytometry for preventing misinterpretations of urine cytology. *Urologe A* (2007), 46(9): 1140-1141.

- vom Dorp F, Kausch I, Jocham D. Diagnosis and treatment of non invasive urothelial carcinomas. *Dtsch Arztebl* (2007), 104(12):797-802.
- von Kleist SU. Diagnostic significance if tumor markers. *Cancer Res.* (1980), 40: 2977-2978.
- von Knobloch R, Bugert P, Jauch A, Kälble T und Kovacs G. Allelic changes at multiple regions of chromosome 5 are associated with progression of urinary bladder cancer. *J.Pathol.* (2000), 190: 163-168.
- von Knobloch R, Hegele A, Brandt H, Olbert P, Heidenreich A und Hofmann R. Serum DNA and urine DNA alterations of urinary transitional cell bladder carcinoma detected by flourescent microsatellite analysis. *Int.J.Cancer* (2001), Oct 1; 94(1): 67-72.
- von Knobloch R. Molekulare Diagnostik der Tumoren des Harntraktes anhand der Mikrosatellitenanalyse (2002).
- von Knobloch R, Hegele A, Brandt H, Varga Z, Wille S, Kälble T, Heidenreich A, Hofmann R. High frequency of Serum DNA alterations in renal cell carcinoma detected by fluorescent microsatellite analysis. *Int J Cancer* (2002), 98(6):889-894.
- von Knobloch R, Konrad L, Barth PJ, Brandt H, Wille S, Heidenreich A, Moll R, Hofmann R. Genetic pathways and new progression markers for prostate cancer defined by microsatellite allelotyping. *Clin.Cancer Res.* (2004) Feb, 1; 10(3):1064-1073.
- von Knobloch R, Brandt H, Schrader AJ, Heidenreich A, Hofmann R. Molecular serological detection of DNA alterations in 82 transitional cell carcinoma is highly sensitive and stage independent. *Clin Cancer Res* (2004): 10(3):988-93.
- Vrooman OP, Witjes JA. Urinary markers in bladder cancer. *Eur.Urol.* (2008), 53(5): 909-916.
- Wagner U, Sauter G, Moch H, Novotna H, Epper R, Mihatsch MJ, Waldman FM. Patterns of p53, erbB-2, and EGF-r expression in premalignant lesions of the urinary bladder. *Hum Pathol.* (1995) Sep;26(9): 970-978.
- Wakabayashi T, Sawabu N, Watanabe H, Morimoto H, Sugioka G und Takita Y. Detection of K-ras point mutation at codon 12 in pure pancreatic juice collected 3 years and 6 months before the clinical diagnosis of pancreatic cancer. *Am.J.Gastroenterol.* (1996), 91: 1848-1851.
- Weinstein RS, Coon JS, Schwartz D, Miller AW, III und Pauli BU. Pathology of superficial bladder cancer with emphasis on carcinoma in situ. *Urology* (1985), 26: 2-10.

- Wiener HG, Vooijs GP, Hof-Grootenboer BV. Accuracy of urinary cytology in the diagnosis of primary and recurrent bladder cancer. *Acta Cytol* (1993) Mar-Apr;37(2): 163–169.
- Wiener HG, Mian C, Haitel A, Pycha A, Schatzl G und Marberger M. Can urine bound diagnostic tests replace cystoscopy in the management of bladder cancer? *J.Urol.* (1998), 159: 1876-1880.
- Wild PJ, Fuchs T, Stoehr R, Zimmermann D, Frigerio S, Padberg B, Steiner I, Zwarthoff EC et al. Detection of urothelial bladder cancer cells in voided urine can be improved by a combination of cytology and standardized microsatellite analysis. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention: a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology* (2009), 18(6): 1798-1806.
- Wilhelm M, Burgert P, Kenck C, Staehler G und Kovacs G. Terminal deletion of chromosome 3p sequences in nonpapillary renal cell carcinomas: a breakpoint cluster between loci D3S1285 and D3S1603. *Cancer Res.* (1995), 55: 5383-5385.
- Williamson MP, Elder PA, Shaw ME, Devlin J und Knowles MA. P16 (CDKN2) is a major deletion target at 9p21 in bladder cancer. *Hum.Mol.Genet.* (1995a), 4: 1569-1577.
- Williamson MP, Elder PA, Shaw ME, Devlin J und Knowles MA. P16 (CDKN2) is a major deletion target at 9p21 in bladder cancer. *Hum.Mol.Genet.* (1995b), 4: 1569-1577.
- Willman CL. Acute leukemias: a paradigm for the integration of new technologies in diagnosis and classification. *Mod.Pathol.* (1999), 12: 218-228.
- Wyld DK, Selby P, Perren TJ, Jonas SK, Allen-Mersh TG, Wheeldon J und Burchill SA. Detection of colorectal cancer cells in peripheral blood by reverse- transcriptase polymerase chain reaction for cytokeratin 20. *Int.J.Cancer* (1998), 79: 288-293.
- Xu HJ, Cairns P, Hu SX, Knowles MA und Benedict WF. Loss of RB protein expression in primary bladder cancer correlates with loss of heterozygosity at the RB locus and tumor progression. *Int.J.Cancer* (1993), 53: 781-784.
- Yu SL, Chen HY, Chang GC et al. MicroRNA signature predicts survival and relapse in lung cancer. *Cancer Cell* (2008), 13: 48-57.
- Yuasa T, Yoshiki T, Isono T et al. Expression of transitional cell-specific genes, uroplakin Ia and II, in bladder cancer : detection of circulating cancer cells in the peripheral blood of metastatic patients. *Int.J.Urol.* (1999), 6(6): 286-292.

- Zaak D, Karl A, Stepp H, Tritschler S, Tilki D, Bugert M, Knuechel R, Stief C. [Fluorescence cystoscopy at bladder cancer: Present trials.] *Urologe A* (2007), 46(11):1519-527.
- Zwarthoff EC. Detection of tumours of the urinary tract in voided urine. *Scand.J.Urol.Nephrol.Suppl.* (2008), (218): 147-153.

## 9. Abkürzungsverzeichnis

A	Adenosin
AI	allelische Imbalanz
BCG	Bacillus-Calmette-Guerin
C	Cytosin
CGH	komparative genomische Hybridisierung
CK-20	Zytokeratin 20
CR	complete Remission (engl.: Komplette Remission)
DBC1	<u>d</u> eleted in <u>b</u> ladder <u>c</u> ancer <u>1</u>
DCC	<u>D</u> eleted in <u>C</u> olon <u>C</u> ancer
DNA	Desoxyribonucleinsäure
G	Guanosin
LOH	Loss of heterozygosity (Allelverlust)
MIN	Minute
mRNA	Messenger Ribonukleinsäure
MSA	Mikrosatellitenanalyse
PCR	Polymerasekettenreaktion
PSA	prostataspezifisches Antigen
PSMA	prostataspezifisches Membranantigen
Rb	Retinoblastoma Gen
RNA	Ribonukleinsäure
RT-PCR	Reverse Transkriptase PCR
SDS	Natrium dodecy sulfat
Sek	Sekunde
T	Thymin
TCC	Transitional Cell Carcinoma
TNM	Tumour, node and metastasis (Tumorstadieneinteilung, UICC)
TRAP-Test	telomeric repeat amplification protocol-Test
TSG	Tumorsuppressorgen
TUR	transurethrale Resektion
UICC	Union International Contre Le Cancer
Upm	Umdrehungen pro Minute
W	Watt

**10. Abbildungen**

Abb. 01:	Knudson´sche „2-Treffer-Hypothese“ zur Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen	3
Abb. 02:	Häufigkeit der Urothelkarzinome in Korrelation zur urothelialen Oberfläche	5
Abb. 03:	Klassifikation des Tumorwachstums beim Harnblasenkarzinom	11
Abb. 04:	Modell zur Entstehung und Progression von Transitionalzellkarzinomen der Harnblase	22
Abb. 05:	Möglicher Weg der Karzinogenese des Urothelkarzinoms der Harnblase	29
Abb. 06:	Sequenzierungsergebnis des Exons 7 des Tumorsuppressorgens p53 mit einer Punktmutation	34
Abb. 07:	Graphische Darstellung der Verteilung der Tumorstadien	46
Abb. 08:	Graphische Darstellung der Verteilung der Kerndifferenzierung	46
Abb. 09:	Lasersequenzierer ALFexpressII®	54
Abb. 10:	Mikrosatellitenanalyse mit Laserdetektion fluoreszierender PCR-Produkte	56
Abb. 11:	Inzidenz von Alterationen bei n = 117 Harnblasenkarzinomen	61
Abb. 12:	Inzidenz von genetischen Alterationen an 10 chromosomalen Regionen gruppiert nach gut und mässig-schlecht differenzierten Tumoren	63
Abb. 13:	Inzidenz von genetischen Alterationen an 10 chromosomalen Regionen gruppiert nach nicht-invasiven und invasiven Tumoren	63
Abb. 14:	Inzidenz von DNA-Alterationen in Tumor, Serum und Urin untersucht an 8 verschiedenen chromosomalen Regionen mit insgesamt 10 Mikro-Satellitenmarkern	66
Abb. 15:	Abhängigkeit des Nachweises von Serum- und Urin-DNA-Alterationen vom Tumorstadium des Primärtumors	67
Abb. 16:	Abhängigkeit des Nachweises von Serum- und Urin-DNA-Alterationen vom Kerndifferenzierungsgrad des Primärtumors	67

Abb. 17:	Exemplarisches Ergebnis der Fluoreszenz-mikro-satellitenanalyse für Normal-, Serum-, Urinsediment- und Tumor-DNA beim Harnblasenkarzinom (Probe 239) (pT1G3)	70
Abb. 18:	Exemplarisches Ergebnis der Fluoreszenz-mikro-satellitenanalyse für Normal-, Serum-, Urin- und Tumor-DNA beim Harnblasenkarzinom (Probe 205) (pTa G2)	70
Abb. 19:	Exemplarisches Ergebnis der Fluoreszenz-mikro-satellitenanalyse für Normal-, Serum-, Urin- und Tumor-DNA beim Harnblasenkarzinom (Probe 72) (urotheliale Dysplasie)	71

**11. Tabellen**

Tab. 01:	Kanzerogene beim Harnblasenkarzinom	6
Tab. 02:	TNM-Stadien nach UICC	10
Tab. 03:	Therapieschemata für topische Installationstherapeutika	17
Tab. 04:	Einteilung der Harnblasenkarzinome anhand der TNM-Klassifikation der UICC ( <i>Sobin, Wittekind, 2002</i> )	45
Tab. 05:	Ablauf der PCR via PTC 100 Thermocycler	52
Tab. 06:	Mikrosatellitenmarker für die Tumor-, Serum- und Urinsanalyse der Harnblasenkarzinome	53
Tab. 07:	Allelotypisierung von n = 117 Harnblasenkarzinomen sortiert nach Stadien	58
Tab. 08:	Assoziation einer DNA-Alteration verschiedener chromosomaler Regionen mit Differenzierungsgrad, lokalem Tumorstadium und Lymphknotenmetastasierung	62
Tab. 09:	Inzidenz von DNA-Alterationen in Tumor, Serum und Urin stratifiziert nach einzelnen Mikrosatellitenmarkern	68

## Akademische Lehrende

Meine akademischen Lehrerinnen und Lehrer in Marburg waren die nachfolgenden Damen und Herren, denen ich an dieser Stelle herzlich danke:

Adamkiewicz	Arnold	Aumüller	Bals
Barth	Bartsch	Basler	Baum
Baumann	Becker	Behr	Berger
Bertalanffy	Bette	Bien	Bolm
Cetin	Christiansen	Czubayko	Daut
Dietz	Dohrmann	Domínguez	Dünne
Eilers	Feuser	Geks	Gerdes
Görg, C.	Görg, K.	Gotzen	Grau
Gress	Grimm	Grundmann	Grzeschik
Gudermann	Happel	Hasilik	Hermann-Lingen
Hertl	Hofbauer	Hoffmann	Hofmann
Hoyer	Jaques	Jungclas	Kalder
Kalinowski	Kann	Kanngießer	Kill
Kim-Berger	Klaus	Klenk	Klose
Köhler	König	Koolman	Kretschmer
Kroh	Kroll	Kühnert	Kuhlmann
Kuhn	Lang	Langer	Lill
Liss	Löffler	Lohoff	Lüers
Maisch	Maier	Mandrek	Max
Mittag	Moll	Mossdorf	Mueller
Müller	Mutters	Neubauer	Oertel
Olbert	Petz	Radsak	Renschmidt
Renz	Richter	Roelke	Röhm
Roeper	Rothmund	Schäfer	Schmidt
Schnabel	Schneider	Schrader	Schulz
Seitz	Sekundo	Sesterhenn	Steiniger
Stiletto	Stiller	Teymoortash	Vogelmeier

Voigt	von Knobloch	Wagner	Waldegger
Weihe	Wennemuth	Werner	Westermann
Wirth	Wulf	Wündisch	Zemlin

Die akademischen Lehrerinnen und Lehrer während des Praktischen Jahres waren die nachfolgenden Damen und Herren, denen ich an dieser Stelle herzlich danke:

Christian Hamilton-Craig MD (The Prince Charles Hospital, Brisbane, Australien)

Dr.med. Jürg Gresser und Dr.med. Thomas Lindenfeld (Kantonales Spital Walenstadt, Walenstadt, Schweiz)

## **DANKSAGUNG**

Ich danke Herrn Professor Dr. Rainer Hofmann für die Möglichkeit der Promotion an seiner Klinik. Herrn Professor Dr. med. Rolf von Knobloch danke ich für die Überlassung des Themas sowie der Möglichkeit der Mitarbeit in seiner Arbeitsgruppe.

Herzlicher Dank gilt Frau Heidrun Brandt für die Einarbeitung und Einweisung im Labor sowie für ihre großartige Unterstützung und Geduld während der praktischen Phase meiner Arbeit dort. Ihre Unterstützung hat zum Gelingen des experimentellen Teils erheblich beigetragen.

Des Weiteren bedanke ich mich bei allen Mitarbeitern des urologischen Labors, des Archivs sowie der Klinik für Urologie und Kinderurologie für ihre Hilfe, die nette Arbeitsatmosphäre und die Bereitstellung von Räumlichkeiten und Logistik.

Großen Dank richte ich an meine Eltern Rüdiger und Manuela Petra Götzky, die mich in allen Phasen meines Lebens unterstützt haben und mir die Grundlagen für diese Arbeit und vieles mehr mit auf den Weg gegeben haben. Danke für jede Hilfestellung und Anregung.

Bei meiner Frau Kristina möchte ich mich ganz herzlich für ihre Liebe und Unterstützung bedanken, die mir Motivation und Ansporn war, die Energie zur Fertigstellung der vorliegenden Dissertation aufzubringen.

Meiner Tochter Louisa Marlene danke ich für ihre motivierende Fröhlichkeit.

Darüber hinaus danke ich allen, die direkt oder indirekt zum Gelingen der Arbeit beitrugen, indem sie mir mit Rat und Unterstützung behilflich waren.