

Neue Methoden der Proteinanalytik zur Identifikation von diagnostisch relevanten Molekülen für das Harnblasen- und Prostatakarzinom

Von der Medizinischen Fakultät
der Rheinisch-Westfälischen Technischen Hochschule Aachen
zur Erlangung des akademischen Grades einer Doktorin der
naturwissenschaftlichen Medizin genehmigte Dissertation

vorgelegt von

Dr. med.
Kristina Schwamborn

aus Wuppertal

Berichter: Universitätsprofessorin Dr. med. R. Knüchel-Clarke
Universitätsprofessor Dr. med. G. Jakse

Tag der mündlichen Prüfung: 08.10.2007

Diese Dissertation ist auf den Internetseiten der Hochschulbibliothek online verfügbar.

1	Einleitung.....	1
1.1	Das Harnblasenkarzinom	1
1.1.1	Epidemiologie des Harnblasenkarzinoms.....	1
1.1.2	Ätiologie und Risikofaktoren des Harnblasenkarzinom	1
1.1.3	Pathogenese und Genetik des Harnblasenkarzinoms.....	2
1.1.4	Symptomatik und Diagnostik des Harnblasenkarzinom.....	4
1.1.5	Staging des Harnblasenkarzinoms	7
1.1.6	Prognose und Therapie des Harnblasenkarzinoms.....	8
1.2	Das Prostatakarzinom	10
1.2.1	Epidemiologie des Prostatakarzinoms.....	10
1.2.2	Ätiologie und Risikofaktoren des Prostatakarzinoms.....	10
1.2.3	Pathogenese und Genetik des Prostatakarzinoms.....	12
1.2.4	Symptomatik und Diagnostik des Prostatakarzinoms.....	14
1.2.5	Staging und Grading des Prostatakarzinoms	16
1.2.6	Prognose und Therapie des Prostatakarzinoms.....	18
1.3	Proteomics.....	19
1.3.1	Allgemeines	19
1.3.2	Zweidimensionale Gelelektrophorese	20
1.3.3	Massenspektrometrie	21
1.3.3	Proteomics in der klinischen Forschung	23
1.4	Zielsetzung	24
2	Material und Methoden.....	25
2.1	Probengewinnung.....	25
2.1.1	Tumorbank.....	25
2.1.2	Referenzproben	26
2.2	Zellkultur	27
2.3	Probenvorbereitung	27
2.3.1	Mikrodissektion	27
2.3.2	Probenfraktionierung mittels magnetischer Beads	31
2.3.2	Fraktionierung der Zellsedimente bzw. des Serum	33
2.3.4	Proteinbestimmung aus Urin	38
2.3.5	Proteinfällung aus Urin	38
2.3.6	Vorbehandlung des formalin-fixierten und paraffin-eingebetteten Gewebes ..	42
2.4	Zweidimensionale Gelelektrophorese	44
2.4.1	Probenvorbereitung des Gewebes und der Zellen	44
2.4.2	Isoelektrische Fokussierung („Erste Dimension“)	46
2.4.3	SDS-PAGE („Zweite Dimension“).....	48
2.5	Massenspektrometrie	53
2.5.1	MALDI-TOF-MS.....	53
2.5.2	SELDI-TOF-MS	53
2.5.3	MALDI imaging	56
2.6	Auswertestrategien.....	58
3	Ergebnisse	61
3.1	Zweidimensionale Gelelektrophorese	61
3.1.1	Zellzahlbestimmung.....	61
3.1.2	Mikrodissektiertes Urothel	61
3.1.3	Fraktionierte Proben	66
3.1.4	Urin	67
3.2	MALDI-TOF-MS.....	72
3.2.1	Serumfraktionierung mit WCX-Beads	72
3.2.2	Serumfraktionierung mit WAX-Beads	82
3.3	SELDI-TOF-MS	85

3.3.1	Matrixsubstanzen.....	85
3.3.2	Serumfraktionierung mit CM10 ProteinChips.....	87
3.3.3	Urinfraktionierung mit CM10 Protein.....	89
3.4	Vergleich MALDI- versus SELDI-TOF-MS.....	90
3.5	MALDI imaging	92
3.5.1	Harnblasenbiopsien	92
3.5.2	Prostatagewebeblöcke	99
3.5.3	Prostatastanzen.....	101
3.5.4	Formalin-fixiertes und paraffin-eingebettetes Gewebe	101
4	Diskussion	102
4.1	Zweidimensionale Gelelektrophorese	105
4.1.1	Mikrodisseziertes Gewebe.....	105
4.1.2	Fraktionierte Proben	108
4.1.3	Urin	109
4.2	MALDI-TOF-MS.....	109
4.2.1	Serumfraktionierung mit WCX-Beads.....	109
4.2.2	Serumfraktionierung mit WAX-Beads	113
4.3	SELDI-TOF-MS	114
4.3.1	Serumfraktionierung mit CM10 ProteinChip	114
4.3.2	Urinfraktionierung mit CM10 ProteinChips	115
4.4	Vergleich der Ergebnisse aus MALDI- und SELDI-TOF-MS	115
4.5	MALDI imaging	116
4.5.1	Harnblasenbiopsien	116
4.5.2	Prostatagewebeblöcke	117
4.5.3	Prostatastanzen.....	119
4.5.4	Formalin-fixiertes und paraffin-eingebettetes Gewebe	120
5	Zusammenfassung und Ausblick.....	122
6	Literaturverzeichnis	123
7	Danksagung	139
8	Abkürzungsverzeichnis.....	139
9	Publikationen.....	140
10	Lebenslauf.....	141

1 Einleitung

1.1 Das Harnblasenkarzinom

1.1.1 Epidemiologie des Harnblasenkarzinoms

Das Harnblasenkarzinom rangiert weltweit bezogen auf seine Inzidenz an neunter Stelle in der Tumorstatistik [Steward et al., 2003] mit den höchsten Inzidenzraten in Europa, Nordamerika und Australien [Parkin et al., 2003]. In Deutschland erkranken jedes Jahr etwa 25.950 Menschen, und im Jahre 2002 verstarben etwa 5.450 Menschen an einer bösartigen Neubildung der Harnblase [Krebs in Deutschland 2006]. Weltweit liegt die Verteilung zwischen Männern und Frauen bei 3,5:1 [Parkin et al., 1999]. Da die Inzidenzrate mit zunehmendem Alter deutlich ansteigt, sind in etwa zwei Drittel der Fälle Menschen über 65 Jahren betroffen [Steward et al., 2003]. In mehr als 90% der Fälle handelt es sich bei einem Harnblasenkarzinom um ein Urothel- oder Transitionalzellkarzinom (TCC), wohingegen andere Entitäten wie Adenokarzinome (6%), Plattenepithelkarzinome (2%) und kleinzellige Karzinome (weniger als 1 %) deutlich seltener vorkommen [Steward et al., 2003, Oosterlinck et al., 2002]. Zum Zeitpunkt der Erstdiagnose weisen etwa 80% der Patienten einen nicht muskelinvasiven Tumor (pTa, pTis oder pT1) auf [Black et al., 2006; Knowels, 2002]. Zwar zeigen nur ca. 15-20% dieser Patienten eine Progression zu einem muskelinvasiven Tumor [Al-Sukhun et al., 2003], aber 50-75% erleiden ein Rezidiv [Heney et al., 1983]. Daher übersteigt die Prävalenz des Harnblasenkarzinoms seine primäre Inzidenzrate um ein Vielfaches [Droller, 1998] und stellt damit große Herausforderungen an das Gesundheitssystem. Etwa 20% der Patienten weisen zum Zeitpunkt der Erstdiagnose einen muskelinvasiven Tumor auf [Al-Sukhun et al., 2003]. Mindestens die Hälfte dieser Patienten haben bereits Metastasen und werden tumorbedingt versterben [Prout et al., 1979]. Zudem entwickeln Patienten mit Harnblasenkarzinom am häufigsten von allen Krebserkrankungen (in 16% der Fälle) zusätzliche maligne Tumoren in anderen Organen [Hayat et al., 2007].

1.1.2 Ätiologie und Risikofaktoren des Harnblasenkarzinom

Die meisten Karzinogene des Harnblasenkarzinoms entfalten ihre Wirkung über den direkten Kontakt mit dem Epithel der Harnblase. Nach der Aufnahme in den Körper werden sie entweder direkt oder nach Umwandlung in karzinogene Abbauprodukte mit dem Urin ausgeschieden und gelangen auf diese Weise in die Harnblase [Cohen, 1995].

Der bedeutendste Risikofaktor für die Entstehung eines Harnblasenkarzinoms ist das Rauchen. In Industrienationen sind bei Männern etwa 65% und bei Frauen etwa 30% der Fälle durch Rauchen bedingt [Brennan et al., 2000]. Bei Rauchern ist das Risiko, ein Harnblasenkarzinom zu entwickeln, gegenüber Nichtrauchern um den Faktor 2-6 erhöht [Castelao et al., 2001; Negri et al., 2001; Brennan et al., 2000; Clavel et al., 1989]. Einfluß haben hierbei die Anzahl der gerauchten Zigaretten, der Grad der Inhalation, die Art des Tabaks (höheres Risiko bei schwarzem, luftgetrocknetem gegenüber hellem, rauchgetrocknetem Tabak), der Gebrauch eines Filters und das Einstellen des Rauchens [Brennan et al., 2000; Vineis et al., 1998; Clavel et al., 1989].

Der zweite wichtige Risikofaktor ist die Exposition mit aromatischen Aminen (v.a. 2-Naphthylamin und Benzidin, aber auch 4-Aminobiphenyl, 4-Chlor-o-toluidin und o-Toluidin) [Eble et al., 2004; Golka et al., 2007], die bereits 1895 als eine der ersten Karzinogene beschrieben wurden [Rehn, 1895]. Hierbei sind vor allem Arbeiter in der Farb-, Leder- und Gummiindustrie sowie Kokereiarbeiter betroffen, die Gefahr für Friseur ist nicht sicher geklärt [Negri et al., 2001].

Die durch *Schistosoma haematobium* verursachte chronische Zystitis stellt ebenfalls einen Risikofaktor für das Harnblasenkarzinom dar, wobei hierbei vor allem Plattenepithelkarzinome auftreten [Bedwani et al., 1993]. Auch andere Harnwegsinfektionen sowie Urolithiasis werden als mögliche Risikofaktoren angesehen [Kantor et al., 1984], aber ein eindeutiger Zusammenhang konnte bis heute nicht belegt werden [Negri et al., 2001].

Als weitere anerkannte Risikofaktoren gelten Medikamente wie Phenacetin, Chlornaphazin und Cyclophosphamid [Eble et al., 2004; Negri et al., 2001] sowie Arsen im Trinkwasser [Hopenhayn-Rich et al., 1996]. Kontrovers hingegen wird der Zusammenhang zwischen dem Konsum von Kaffee sowie Süßstoffen und dem Harnblasenkarzinom gesehen [Negri et al., 2001].

1.1.3 Pathogenese und Genetik des Harnblasenkarzinoms

Das Urothelkarzinom stellt bezüglich seiner Pathogenese eine Besonderheit unter den epithelialen Tumoren dar. Während man bei den meisten epithelialen Tumoren davon ausgeht, daß die Tumorentstehung entlang eines singulären Signalweges von benignen Vorläuferläsionen bis hin zum Karzinom durch sukzessive Mutationen von Genen, die das Wachstum und den Zellzyklus regeln, bedingt ist [Hanahan et al., 2000], gibt es in der

Tumorenstehung des Urothelkarzinoms mindestens zwei verschiedene Signalwege [Wu, 2005]. Eine Übersicht über die zwei verschiedenen Signalwege zeigt

Abbildung 1.

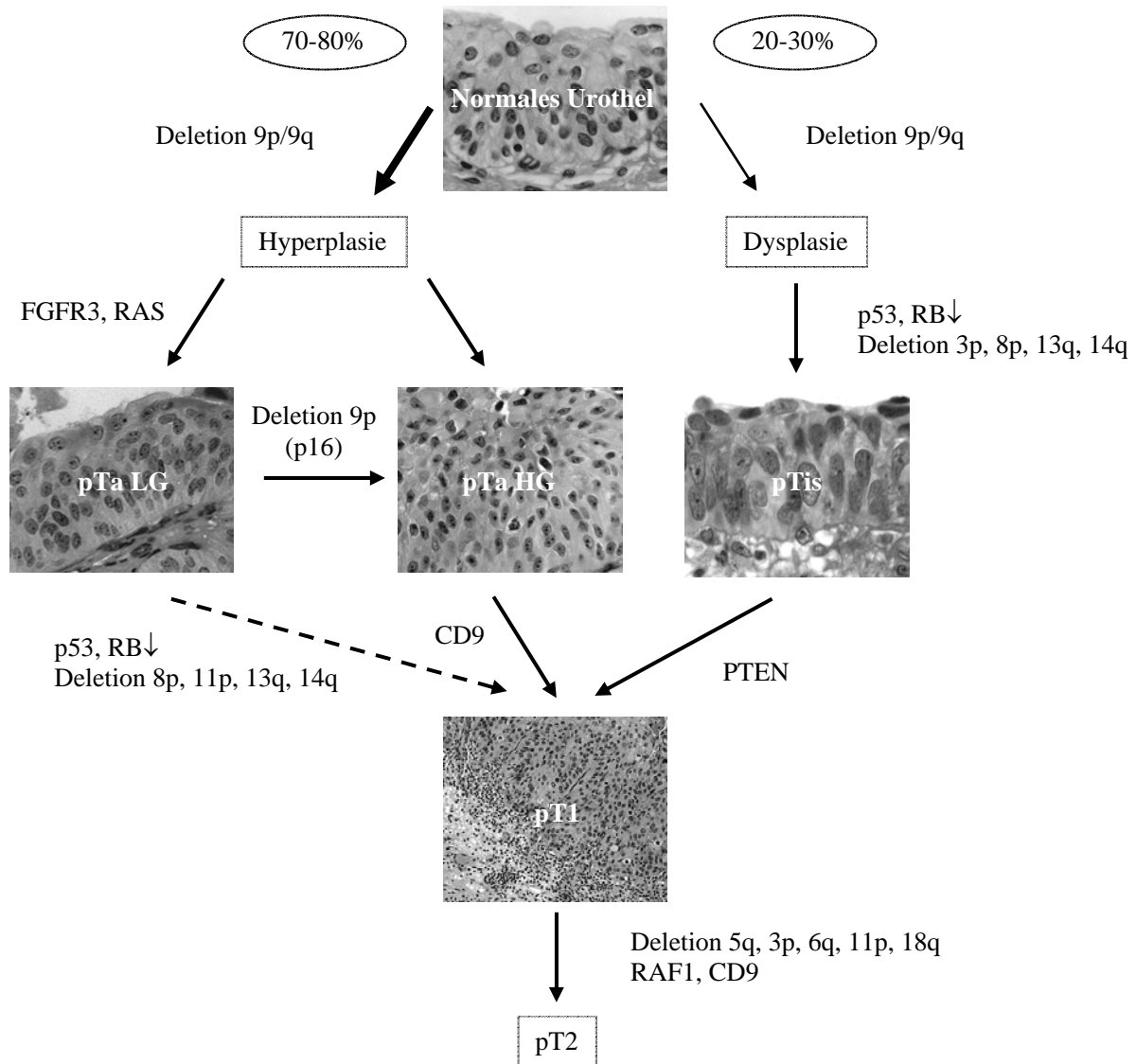


Abbildung 1: Schematische Übersicht über die Pathogenese des Harnblasenkarzinoms, modifiziert nach Sanchez-Carbayo et al., 2007; Mhawech-Fauceglia et al., 2006; Wu, 2005; Knowles 2002, Bilder: AFIP Atlas of Tumor Pathology.

Der mit 70-80% häufigere Signalweg von beiden verläuft über die einfache Hyperplasie und das papilläre Urothelkarzinom. Diese Karzinome weisen in 30-40% Mutationen des HRAS-Gens und in bis zu 75% Mutationen des FGFR3-Gens (*fibroblast growth factor receptor 3*) auf [Sanchez-Carbayo et al., 2007; Wu, 2005; Dinney et al., 2004]. Der mit 20-30% seltenerer Signalweg ist durch die Dysplasie und das Carcinoma in situ charakterisiert [Mhawech-Fauceglia et al., 2006;

Wu, 2005]. Mehr als die Hälfte dieser Karzinome zeigen strukturelle oder funktionelle Defekte des Tumorsuppressorgens p53 und / oder des Retinoblastom-Proteins (RB) [Wu, 2005; Hartmann et al., 2002]. Deletionen beider Arme des Chromosom 9 treten früh bei der Tumorenstehung auf, scheinen aber nicht für einen der beiden Signalwege charakteristisch zu sein [Mitra et al., 2005; Wu, 2005].

1.1.4 Symptomatik und Diagnostik des Harnblasenkarzinom

Das häufigste Symptom bei bestehendem Harnblasenkarzinom ist die Hämaturie [Messing et al., 1990], wobei 85% der Patienten eine schmerzlose Makrohämaturie zeigen [Varkarakis et al., 1974]. Jedoch ist die Hämaturie nicht pathognomonisch für das Vorliegen eines Harnblasenkarzinoms, sondern kann auch bei anderen urologischen Erkrankungen wie Infektionen und Urolithiasis oder im Falle der Mikrohämaturie auch bei Gesunden auftreten [Droller, 1998]. Daneben ist die Schwere der Hämaturie nicht unbedingt mit dem Stadium des Harnblasenkarzinoms korreliert [Oosterlinck et al., 2002]. Etwa 30% der Patienten zeigen zudem zystitische Beschwerden wie Dysurie, Pollakisurie, Urge und suprapubische Schmerzen, wobei es sich in diesen Fällen oft um Tumoren im Bereich des Blasenhalses oder um ausgedehnte Tumoren handelt. Fortgeschrittene oder metastasierte Tumoren können durch Rückenschmerzen bei Hydronephrose, Lymphödeme der Beine, Fisteln, Knochenschmerzen und Gewichtsverlust auffallen [Eble et al., 2004; Eichenauer et al., 2003].

Derzeit stützt sich die Diagnostik des Harnblasenkarzinoms auf zwei sich ergänzende Untersuchungen: die Zystoskopie und die Zytologie des Urins oder der Harnblasenspülflüssigkeit [Oosterlinck et al., 2002]. Die Zystoskopie wird von den Patienten nicht nur als unangenehm empfunden, sondern zeichnet sich auch durch eine nicht ausreichende Sensitivität und Spezifität aus [Konety, 2006], die in der Literatur mit lediglich 73% bzw. 37% angegeben werden [Sarosdy et al., 2002; Kriegmair et al., 1996]. Die Rate der falsch-negativen Zystoskopien wird zudem mit bis zu 50% beschrieben [Witjes, 2004; Zaak et al., 2002; Zaak et al., 2001; Schneeweis et al., 1999]. Durch den Einsatz der photodynamischen Diagnostik kann jedoch eine deutliche Verbesserung der Sensitivität und Spezifität (insbesondere für das Carcinoma in situ) erzielt werden [Jocham et al., 2005; Zaak et al., 2002]. Hierbei wird vor der zystoskopischen Untersuchung intravesikal 5-Aminolävulinsäure (5-ALA), ein Substrat für die Hämoglobinsynthese, oder ein 5-ALA-Derivat appliziert, welches sich selektiv in den Tumorzellen anreichert. Dort wird es zu Protoporphyrin IX (PPIX) umgewandelt, das unter blauem Licht (375-440 nm) eine rote Fluoreszenz zeigt [Jocham et al., 2005; Zaak et al., 2002]. Auf diese Weise werden insbesondere flache Tumoren wie Carcinomata in situ leichter

detektierbar [Zaak et al, 2002]. Hierdurch kann die Sensitivität auf bis zu 97% und die Spezifität auf bis zu 65% verbessert werden [König et al., 1999; Kriegmair et al., 1996].

Auch in der Nachsorge des Blasenkarzinoms ist die Zystoskopie von großer Bedeutung. In Abhängigkeit vom Differenzierungsgrad des Tumors sollten regelmäßige zystoskopische Untersuchungen über einen Zeitraum von 5 Jahren bei rezidivfreien, solitären pTa, G1 Tumoren, bzw. von 10 Jahren bei Patienten mit niedrigem und mäßigem Risiko bzw. lebenslang bei Hochrisikopatienten erfolgen [Oosterlinck et al., 2002].

Die Zytologie weist zwar mit Raten von bis zu 94% eine hohe Spezifität auf [Boman et al., 2002], jedoch sind die Ergebnisse zum einen stark abhängig vom diagnostizierenden Pathologen [Karakiewicz et al., 2006; Raitanen et al., 2002] und zum anderen variieren sie deutlich in Abhängigkeit vom Differenzierungsgrad des Tumors. In der Diagnostik von „high-grade“-Tumoren zeigt die Zytologie konsistent eine hohe Genauigkeit mit einer Sensitivität von etwa 67%, dagegen fällt die Sensitivität deutlich bei „low-grade“-Tumoren auf etwa 35% [Karakiewicz et al., 2006; Curry et al., 2002; Hughes et al., 2000].

Andere diagnostische Verfahren wie die Sonographie, die Computertomographie (CT), die Magnetresonanztomographie (MRT) und die Positronenemissionstomographie (PET) verfügen nicht über eine ausreichende Sensitivität und Spezifität, um in der Diagnostik des Primärtumors eine Rolle zu spielen [Datta et al., 2002; Paik et al., 2000; Sohn et al., 1990; Letocha et al., 1994]. Jedoch finden Sonographie, CT und MRT Einsatz bei der Suche nach Metastasen des Tumors.

Eine genaue und sichere Diagnose kann letztendlich nur durch die histologische Untersuchung von transurethral gewonnenen Biopsien gestellt werden. Hierzu muß sich der Patient jedoch einer Narkose unterziehen.

Aufgrund der unzureichenden Sicherheit nicht-invasiver Untersuchungsverfahren gibt es seit mehreren Jahren zunehmende Bemühungen, neue und zuverlässige Markermoleküle für das Harnblasenkarzinom zu identifizieren. Derzeit gibt es eine Reihe von zum Teil kommerziell erhältlichen Tests für in erster Linie uringebundene Biomarker. Eine Übersicht gibt Tabelle 1. Alle bisher bekannten Tests weisen jedoch im Allgemeinen eine höhere Sensitivität aber eine niedrigere Spezifität als die Urinzytologie auf [Lokeshwar et al., 2006; Dinney et al., 2004; Boman et al., 2002], wobei die Ergebnisse zum Teil erheblich zwischen den Studien variieren. Daher kann bis heute keiner dieser Tests die Zystoskopie weder in der Erstdiagnose noch in der Nachsorge ablösen [Borden et al., 2005]. Markermoleküle im Serum sind bisher noch nicht identifiziert worden.

Tabelle 1: Tabellarische Übersicht über die verschiedenen, teils kommerziell erhältlichen Urintests des Harnblasenkarzinoms, modifiziert nach Black et al., 2006; Konety 2006; Svatek et al., 2006; van Le et al., 2005; van Rhijn et al., 2005; Lokeshwar et al., 2001.

Test	Marker	Probe	Verfahren	Sensitivität [%]	Spezifität [%]
Hemastix	Hämoglobin	Urin	Teststreifen	41-95	68-93
BTA	Degradationskom- plexe der BM	Urin	Agglutinations- assay	28-80	66-95
BTastat	<i>Human complement factor H related protein</i>	Urin	<i>point-of-care assay</i>	24-89	52-93
BTAttrak	<i>Human complement factor H related protein</i>	Urin	ELISA	57-79	48-95
NMP22	<i>Nuclear matrix protein 22</i>	Urin	ELISA / <i>point-of- care assay</i>	47-100	56-95
FDP	Fibrin/Fibrinogen Degradationsprodukte	Urin	Teststreifen	52-81	75-96
ImmunoCyt	Muzine, CEA	Urin (Zellen)	Immunzytologie	50-100	69-90
Telomerase	Telomerase	Urin (Zellen)	PCR	7-100	24-93
HA-HAase	Hyaluronsäure, Hyaluronidase	Urin	wie ELISA	92	84
UroVysion	9p21	Urin (Zellen)	FISH	73-92	92-100
UBC	CK8 und CK18	Urin	ELISA	66-87	80-97
Lewis X	Lewis X Antigen	Urin (Zellen)	Immunzytologie	80-89	80-86
TPS	CK18	Urin	ELISA	64-88	55-95
Mikrosatelliten	Mikrosatelliten	Urin (Zellen)	MSI	83-95	89-100
CK 20	CK20	Urin	RT-PCR, Immunzytologie	82-96	67-97
CYFRA21-1	Fragmente von CK19	Urin	ELISA	74-99	67-100
BLCA4	<i>Bladder cancer antigen 4</i>	Urin	Sandwich immunoassay	95	89
sFas	<i>soluble Fas</i>	Urin			
Survivin	Survivin	Urin		64-100	78-100
Quanticyt	Form und DNA-Gehalt des Zellkerns	Zellen	Bildanalyse	45-69	70-93
Zytometrie		Zellen	<i>Flow cytometry</i>	45-83	36-87

1.1.5 Staging des Harnblasenkarzinoms

Das Staging des Harnblasenkarzinoms erfolgt nach der aktuellen UICC-Klassifikation [Wittekind et al., 2002], wobei Tumorausdehnung (T), Lymphknotenbefall (Nodalstatus N) und Metastasen (M) berücksichtigt werden. Eine Übersicht gibt Tabelle 2.

Tabelle 2: TNM-Klassifikation des Harnblasenkarzinoms nach Wittekind et al., 2002.

Stadium	
T	Primärtumor
TX	keine Beurteilung möglich
Ta	nicht-invasives, papilläres Karzinom, begrenzt auf Mucosa
Tis	Carcinoma in situ
T1	Tumor infiltriert subepitheliales Bindegewebe
T2	Tumor infiltriert Muskulatur
T2a	Tumor infiltriert innere Hälfte der Muskulatur
T2b	Tumor infiltriert äußere Hälfte der Muskulatur
T3	Tumor infiltriert perivesikuläres Fettgewebe
T3a	mikroskopische Infiltration
T3b	makroskopische Infiltration
T4	Tumor infiltriert Prostata, Uterus, Vagina, Becken- oder Bauchwand
T4a	Tumor infiltriert Prostata, Uterus oder Vagina
T4b	Tumor infiltriert Becken- oder Bauchwand
N	Nodalstatus
NX	keine Beurteilung möglich
N0	keine regionalen Lymphknotenmetastasen
N1	Metastasen in einem solitären Lymphknoten max. 2 cm im Durchmesser
N2	Metastasen in einem solitären Lymphknoten über 2 cm und unter 5 cm im Durchmesser oder in multiplen Lymphknoten, keiner mehr als 5 cm
N3	Metastasen in einem Lymphknoten über 5 cm im Durchmesser
M	Fernmetastasen
MX	keine Beurteilung möglich
M0	keine Fernmetastasen
M1	Fernmetastasen

1.1.6 Prognose und Therapie des Harnblasenkarzinoms

Die Prognose und Therapie des Harnblasenkarzinoms hängt im Wesentlichen von der Infiltrationstiefe (T-Stadium) und seinem Differenzierungsgrad („low- oder high-grade“) ab [vom Dorp et al., 2007]. Hinzu kommen andere prognostische Faktoren wie die Art der Infiltration (grob oder feinsträngig), begleitendes Carcinoma in situ, Blut- und Lymphgefäßinvasion sowie verschiedene genetische Veränderungen (z.B. RB-Deletion, Ki67-Rate oder p53-, EGFR- und E-cadherin-Expression) [Droller, 1998]. Patienten mit Harnblasenkarzinom bedürfen zudem einer engmaschigen Nachsorge mittels Zystoskopie, die im Falle von Hochrisikopatienten ein Leben lang erfolgen sollte [Oosterlinck et al., 2002].

Papilläre Tumoren, die auf die Mucosa begrenzt sind (pTa), zeigen lediglich in 2-4% eine Progression [Droller, 1998], jedoch zeichnen sie sich durch hohe Rezidivraten mit bis zu 75% aus [Heney et al., 1983]. Der Differenzierungsgrad ist in der überwiegenden Mehrzahl der Fälle hoch. Unabhängig vom Differenzierungsgrad entwickeln die Patienten aber in 0,7% der Fälle Metastasen [vom Dorp et al., 2007]. Das Risiko eines Rezidives steigt mit der Anzahl der vorliegenden Tumoren, mit dem Vorhandensein von vorangegangenen Rezidiven, mit der Tumorgöße und mit dem Grad der Dysplasien [Oosterlinck et al., 2002]. Tumoren mit einem geringen Rezidivrisiko bedürfen neben der transurethralen Resektion keiner weiteren Behandlung, bei Tumoren mit einem hohen Rezidivrisiko oder bereits rezidivierten Tumoren schließt sich der Resektion eine intravesikale Therapie mit Immun- (Bacillus Calmette-Guérin (BCG) oder α -Interferon) oder Chemotherapeutika (Thiotepa, Mitomycin, Doxorubicin und Epodyl) an [vom Dorp et al., 2007, Oosterlinck et al., 2002]. Dadurch kann im Falle der Instillation mit BCG die Rezidivrate um bis zu 56% gesenkt werden [Shelley et al., 2001] und das progressionsfreie Überleben innerhalb von zehn Jahren liegt dann bei 77% [Davis et al., 2002].

Das Carcinoma in situ (Cis, pTis) als nicht invasives, „high-grade“ Urothelkarzinom zeigt unbehandelt eine 5-Jahres Progressionsrate von über 50% und eine noch höhere Rezidivrate [Witjes, 2004]. Patienten mit einem Cis der Harnblase haben zudem ein erhöhtes Risiko, ein Cis auch an anderen Lokalisationen des Urogenitaltraktes aufzuweisen bzw. zu entwickeln [Witjes, 2004]. Die Therapie der Wahl des Cis ist die intravesikale Instillation von BCG über einen Zeitraum von sechs Wochen, wobei eine Remission in bis zu 70% der Fälle beobachtet werden kann [Oosterlinck et al., 2002]. Das progressionsfreie Überleben innerhalb von zehn Jahren liegt bei 55% [Davis et al., 2002]. Im Falle eines fehlenden Therapieansprechens, eines frühen Rezidives oder schwerer Nebenwirkungen der BCG-Therapie ist eine Zystektomie indiziert [Witjes, 2004; Oosterlinck et al., 2002].

Die Tumoren, die bis in das subepitheliale Bindegewebe, die Lamina propria, infiltrieren (pT1), zeigen eine Progressionsrate von 20-50% [Jakse et al., 1987; Heney et al., 1983] und in 7-23%

der Fälle Metastasen [vom Dorp et al. 2007; Stein et al., 2001]. In 30-50% der pT1 Tumoren handelt es sich um schlecht differenzierte Karzinome. Häufig findet sich zudem ein begleitendes Carcinoma in situ [Birch et al., 1986; Heney et al., 1983]. Insbesondere die schlecht differenzierten Karzinome (pT1, G3) weisen eine hohe Progressionsrate auf, wobei 36% der Patienten innerhalb von fünf Jahren tumorbedingt versterben [Kaubisch et al., 1991]. Patienten mit pT1, G1-2 Tumoren erhalten möglichst früh nach der Resektion eine intravesikale BCG-Instillation [Oosterlinck et al., 2002]. Insbesondere bei Vorliegen eines pT1, G3 Tumors ist eine erneute Resektion bzw. Biopsie 2-4 Wochen nach der ersten Resektion für die Therapieentscheidung wichtig, da in 30-40% in der ersten Probe die Tiefenausdehnung des Tumors zu niedrig eingestuft wird [Jakse et al, 2004; Dutta et al., 2001]. Die Therapieoptionen für Patienten mit pT1, G3 Tumoren sind eine frühzeitige Zystektomie oder eine intravesikale Instillationstherapie mit BCG, wobei bisher nicht genau bekannt ist, welcher Patient von welchem Vorgehen mehr profitiert [vom Dorp et al., 2007; Oosterlinck et al., 2002].

Muskelinvasive Tumoren (ab pT2) liegen bei etwa 20% der Patienten zum Zeitpunkt der Erstdiagnose vor (vergl. auch 1.1.1) [Al-Sukhun et al., 2003]. Unbehandelt überleben weniger als 15% der Betroffenen zwei Jahre [Prout et al., 1956]. Die Behandlung der Wahl ist die radikale Zystektomie zusammen mit der bilateralen pelvinen Lymphadenektomie [Borden et al., 2003]. Im Falle einer fehlenden oder limitierten Organüberschreitung sowie bei begrenztem Lymphknotenbefall kann diese Therapie kurativ sein [Vieweg et al., 1999], wobei die 5- und 10-Jahresraten für das rezidivfreie Überleben bei lokal begrenztem Karzinom bis zu 70% erreichen [Stein et al., 2001]. Bei fehlenden Lymphknotenmetastasen kann alternativ auch eine Radiotherapie durchgeführt werden, jedoch zeigen etwa 50% der Patienten ein lokales Rezidiv [Oosterlinck et al., 2002]. Eine neoadjuvante Chemotherapie bei fortgeschrittenem Karzinom wird aufgrund des nur geringen 5-Jahres-Überlebensvorteils von 5% nicht empfohlen [Frohneberg, 2007]. Auch die adjuvante Chemotherapie wird derzeit noch nicht als Standard angesehen, da entsprechende Studien nicht ausreichend groß sind oder vorzeitig beendet wurden. Der 3-Jahres-Überlebensvorteil wird zwischen 1-16% angegeben [ABC Meta-analysis Collaboration, 2005].

1.2 Das Prostatakarzinom

1.2.1 Epidemiologie des Prostatakarzinoms

Das Prostatakarzinom (PCa) stellt mit einer Rate von 22,3% (im Jahr 2000) die häufigste Krebsneuerkrankung beim Mann in Deutschland dar. Weltweit rangiert das PCa mit 543.000 Neuerkrankungen an dritter Stelle der Tumorstatistik [Steward et al., 2003]. In Deutschland werden jährlich etwa 48.650 Neuerkrankungen diagnostiziert und 10,4% der Krebssterbefälle bei Männern sind durch das Prostatakarzinom bedingt [Krebs in Deutschland, 2006]. Die Inzidenzraten variieren zum Teil erheblich zwischen verschiedenen ethnischen Gruppen. So zeigen in den USA die Afroamerikaner um 70% höhere Raten als Kaukasier. Amerikaner mit asiatischer Abstammung weisen hingegen mit Abstand die niedrigsten Raten auf [Eble et al., 2004]. Vor allem bedingt durch die Zunahme der Bestimmung des prostataspezifischen Antigens (PSA) im Serum hat in den letzten Jahren die Rate der Neuerkrankungen stark zugenommen, wobei vermehrt latente Karzinome entdeckt werden [Krebs in Deutschland, 2006; Steward et al., 2003]. Das Risiko für Männer in ihrem Leben an einem PCa zu erkranken beträgt 1:6 [Hayat MJ et al., 2007]. Die Prävalenz des PCa steigt steil mit zunehmendem Alter an [Breslow et al., 1977]. In Deutschland liegt das mittlere Erkrankungsalter bei etwas über 70 Jahren und damit etwa zwei Jahre über dem für Krebs insgesamt [Krebs in Deutschland, 2006]. Vor dem 50. Lebensjahr treten Erkrankungsfälle selten auf [Krebs in Deutschland, 2006; Eble et al., 2004]. Die relative 5-Jahres-Überlebensrate liegt in Deutschland bei 82% [Krebs in Deutschland, 2006]. In der überwiegenden Mehrzahl der Fälle handelt es sich bei einem PCa um ein Adenokarzinom, andere Tumorentitäten (wie z.B. Sarkome) sind eher eine Seltenheit [Eble et al., 2004] und in über 85% liegt das PCa multifokal vor [Byar et al., 1972].

1.2.2 Ätiologie und Risikofaktoren des Prostatakarzinoms

Die Entstehung des PCa ist ein lang andauernder Prozeß mit vielen Schritten. Der größte Risikofaktor hierbei ist das Alter [Aus et al., 2005; von Eschenbach 1996]. Deutliche Unterschiede in den Inzidenzraten in Abhängigkeit von der ethnischen Abstammung (vergl. auch 1.2.1) legen zudem genetische Faktoren als eine Ursache nahe [Eble et al., 2004; Steward et al., 2003]. Männer, bei denen ein Verwandter ersten Grades an einem PCa erkrankt ist, haben ein mindestens zweifach erhöhtes Risiko, ein PCa zu entwickeln, bei zwei oder mehr betroffenen Verwandten ersten Grades ist das Risiko 5- bis 11-fach erhöht [Gronberg et al., 1996; Steinberg et al., 1990]. Jedoch finden sich auch Veränderungen der Inzidenzraten nach Migration, so daß zudem Umwelteinflüsse als Ursache für das PCa in Betracht gezogen werden

müssen [Eble et al., 2004; Steward et al., 2003; Nelson et al., 2001]. Im Allgemeinen sind jedoch trotz eingehender Forschung die Risikofaktoren des PCa bisher nur wenig verstanden.

Als gesichert gilt der Einfluß der Sexualhormone, insbesondere des Testosteron, auf die Entstehung und das Wachstum des PCa [Eble et al., 2004; Steward et al., 2003]. Jedoch ist die endokrine Basis der Karzinogenese noch nicht genau verstanden [Steward et al., 2003]. Hierbei scheinen eher Polymorphismen des Androgenrezeptor und des Enzyms 5-alpha-reduktase Typ II eine Rolle zu spielen als ein Ungleichgewicht der Hormone selbst [Eble et al., 2004; Steward et al., 2003]. Die unterschiedliche Verteilung dieser Polymorphismen in den verschiedenen ethnischen Gruppen kann hierbei auch zum Teil das unterschiedliche Risiko der Entstehung eines PCa erklären [Shibata et al., 1997].

Andere Polymorphismen, die im Verdacht stehen, mit einem erhöhten PCa-Risiko einherzugehen, sind Polymorphismen im Gen des Vitamin-D-Rezeptors und im Signalweg des *insulin-like growth factors* [Chan et al., 1998; Ingles et al., 1997]. In über 90% der Karzinome kann eine Inaktivierung des Gens der Glutathion-S-Transferase P1 (GSTP1) durch Methylierung der CpG-Inseln nachgewiesen werden [Nelson et al., 2001]. GST ist in der Lage, Oxidantien und elektrophile Karzinogene mittels Konjugation an Glutathion zu inaktivieren [Hayes et al., 1995]. Bedingt durch die Inaktivierung des Gens wird die DNA der Zellen vulnerabel gegenüber Oxidantien und elektrophilen Karzinogenen [Nelson et al., 2001].

Ob Adipositas einen Risikofaktor für die Entstehung eines PCa darstellt, wird kontrovers gesehen, da es sowohl Studien gibt, die einen engen Zusammenhang zeigen konnten, als auch Studien, die das Gegenteil aufzeigen [Giovannucci et al., 2007]. Jedoch belegt die Mehrzahl der Studien einen Zusammenhang zwischen Adipositas und einer schlechteren Prognose des PCa. So ist Adipositas mit einem höheren Tumorstadium und mit fortgeschrittenen Tumoren zum Zeitpunkt der Diagnose assoziiert [Baillargeon et al., 2006; Gong et al., 2006]. Dies legt die Vermutung nahe, daß Adipositas nicht die Entstehung des PCa selbst, sondern die Entwicklung eines prognostisch ungünstigen Phenotyps begünstigt [Baillargeon et al., 2006].

Nahrungsgebundene Risikofaktoren (Fleisch und Fett) und protektive Faktoren (Obst und Gemüse) werden ebenfalls kontrovers diskutiert. Park et al. konnten keinen Einfluß des Verzehrs von Fett und Fleisch auf das Risiko eines PCa nachweisen [Park et al., 2007], wobei andere Studien wiederum einen Zusammenhang postulieren [Giovannucci et al., 1993]. Nicht sicher belegt ist der protektive Effekt von Obst und Gemüse, bzw. Vitamin A, E und D, Selen, Kalzium und Lycopenen [Nelson et al., 2003; Steward et al., 2003; Denis et al., 1999].

Andere Faktoren wie umwelt-, verhaltens- und berufsbedingte Risikofaktoren (z.B. sexuelle Aktivität oder agrarwirtschaftlicher Beruf) scheinen keinen eindeutigen Einfluß auf die Entstehung eines PCa zu haben [Sass-Kortsak et al., 2007; Eble et al., 2004; Steward et al., 2003].

Gegenstand der aktuellen Forschung und bisher nicht sicher geklärt ist der Zusammenhang zwischen chronischer Entzündung der Prostata und der Entstehung eines PCa, eine Hypothese, die für etwa 20% aller Karzinome (u.a. des Magens, der Leber und des Kolon) belegt werden konnte (vergleiche auch 1.2.3) [De Marzo et al., 2007].

1.2.3 Pathogenese und Genetik des Prostatakarzinoms

Zum Zeitpunkt der Diagnose weisen PCa-Zellen eine Vielzahl somatischer Mutationen, Deletionen, Amplifikationen, chromosomaler Rearrangements sowie Veränderungen des Methylierungszustandes der DNA auf, wobei sich diese Veränderungen wahrscheinlich über einen Zeitraum von mehreren Jahrzehnten akkumulieren [Nelson et al., 2003]. Die häufigsten chromosomalen Veränderungen sind Zugewinne bei 7p, 7q, 8q und Xq sowie Verluste bei 8p, 10q, 13q und 16q [Elo et al., 2001]. Auffällig sind jedoch die Unterschiede in Bezug auf die Art der Veränderungen in verschiedenen Tumorherden eines Patienten oder in verschiedenen Bereichen eines Tumorherdes [Nelson et al., 2003]. Eine schematische Übersicht über die molekulare Pathogenese des PCa gibt

Abbildung 2.

Das Stadium der proliferativen inflammatorischen Atrophie (PIA), erstmalig 1999 beschrieben von De Marzo et al., wird hierbei als Vorläuferläsion des PCa angesehen [De Marzo et al., 1999]. Die PIA zeichnet sich histologisch durch Drüsen mit zweireihigem Epithel, Entzündungszellen in Epithel und Stroma sowie Stromaatrophie aus. Auffällig im Gegensatz zu normalem Epithel der Prostata ist die erhöhte Expression von GSTP1 sowie von Bcl-2 in den luminalen Epithelzellen und eine erniedrigte Expression von p27^{Kip1} [De Marzo et al., 1999].

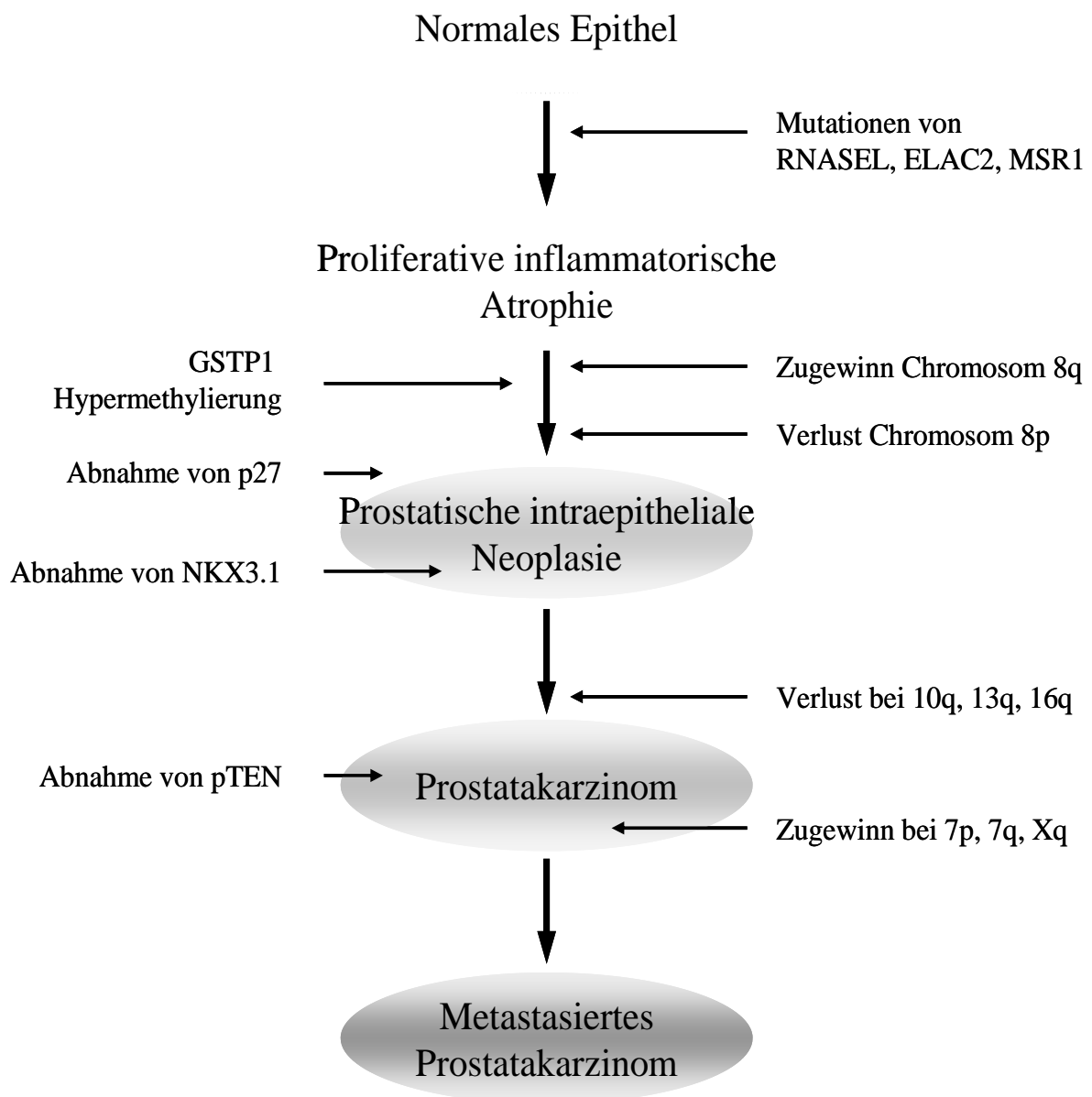


Abbildung 2: Schematische Übersicht über die Pathogenese des PCa modifiziert nach Nelson et al., 2003.

Ein Schlüssel für die extraprostatiche Ausbreitung des Prostatakarzinoms ist das Wachstum von Tumorzellen entlang der Nervenbahnen im Bereich des angrenzenden Bindegewebes, die sogenannte Perineuralscheideninfiltration (PNI). Bis heute ist über die Biologie der PNI wenig bekannt und die Mechanismen sind weitestgehend unverstanden. Neuere Studien postulieren eine Interaktion zwischen Nerven und Tumor und einen daraus resultierenden Wachstumsvorteil der Tumorzellen [Ayala et al., 2006].

Einen immer größeren Stellenwert in der Prostatakarzinomforschung nimmt neben den Tumordrüsen auch das Tumorstroma ein, bzw. die Interaktion zwischen Tumorstroma und Tumordrüsen. So wird dem Tumorstroma unter anderem eine entscheidende Rolle in der Progression sowie Metastasierung des Prostatakarzinoms zugeschrieben [Alberti, 2006]. Jedoch sind die Interaktionsmechanismen derzeit noch weitestgehend ungeklärt [Condon, 2005].

1.2.4 Symptomatik und Diagnostik des Prostatakarzinoms

In Frühstadium ist das PCa in der Mehrzahl der Fälle symptomlos [Eble et al., 2004; Eichenauer et al., 2003]. Die meisten Karzinome (über 70%) sind im peripher-dorsalen Anteil der Prostata lokalisiert, so daß obstruktive Beschwerden selten vorliegen und eher durch eine Hyperplasie der Prostata bedingt sind [Eble et al., 2004; Eichenauer et al., 2003]. Lediglich 10-15% der Karzinome sind im periurethralen Anteil (Transitionalzone) der Prostata lokalisiert und 15-20% im zentralen Anteil [Eichenauer et al., 2003; McNeal et al., 1988]. Lokal fortgeschrittene Karzinome können durch Schmerzen im Becken, Blutung aus dem Rektum oder der Harnröhre und Obstruktion auffallen [Eichenauer et al., 2003; Scott et al., 1969;]. Bei Vorliegen von Metastasen können ferner Knochenschmerzen, vor allem in den Beckenknochen und der Wirbelsäule, auftreten [Eble et al., 2004].

Die Diagnostik des Prostatakarzinoms basiert im Wesentlichen auf drei Standpfeilern: der Bestimmung des Prostata-spezifischen Antigens (PSA) im Serum, der digital-rektalen Untersuchung (DRE), ggf. der transrektalen Sonographie (TRUS) und letztendlich der histopathologischen Beurteilung von stanzbioptisch gewonnenem Prostatagewebe [Eichenauer et al., 2003].

Das PSA ist ein Glykoprotein aus 237 Aminosäuren mit einer Größe von 28.430 Da [Belanger et al., 1995] und gehört der humanen Kallikrein-Familie (hK) an, von der bislang neben dem PSA (hK3) zwei weitere Vertreter bekannt sind [Bangma et al., 2000]. Gebildet wird das PSA von den Drüsenepithelien der Prostata [Stenman et al., 1999]. Als physiologisches Sekretionsprodukt der Prostata dient es der Verflüssigung des Samenkoagulums mittels Proteolyse aufgrund seiner Serin-Protease-Aktivität [Ward et al., 2001]. Im Serum liegt das PSA zum einen in freier Form (fPSA) und zum anderen komplexiert (cPSA) an Proteaseinhibitoren (vor allem α 1-Antichymotrypsin, aber auch α 1-Antitrypsin, α 2-Makroglobulin und Protein C Inhibitor) vor [Naya et al., 2005; Chu et al., 1999; Wu et al., 1995], wobei der Anteil der komplexierten Formen mit 80-95% überwiegt [Mikolajczyk et al., 1997].

Mit dem PSA steht dem Urologen zwar ein Markermolekül zur Verfügung, das hoch sensitiv sowie weitestgehend spezifisch für die Prostata ist, jedoch nicht spezifisch für das Prostatakarzinom [Reynolds et al., 2007; Black et al., 2000; Polascik et al., 1999]. Da sowohl normale und hyperplastische als auch neoplastische Epithelien PSA produzieren, kann ein erhöhter PSA-Wert ebenso durch ein Karzinom wie auch die „benigne (knotige) Prostatahyperplasie“ (BPH) oder eine Prostatitis bedingt sein [Nadler et al., 1995]. Insbesondere PSA-Werte <15 ng/ml eignen sich daher nicht zur Unterscheidung zwischen einer BPH und einem Karzinom [Peter et al., 2000]. Aufgrund von Schwankungen im PSA-Wert von bis zu $\pm 30\%$ in einem Zeitraum von 3 Monaten liegt der positive prädiktive Wert des PSA bei nur 47% [Brawer, 1999]. Die Bestimmungen von cPSA, fPSA und den Verhältnissen von fPSA zum Gesamt-PSA können zwar die Rate der unnötigen Biopsien verbessern, die Karzinom-Detektionsrate bleibt jedoch unverändert [Roddam et al., 2005]. Neuere Untersuchungen hingegen zeigen, dass der PSA-Wert mittlerweile lediglich mit der Größe der Prostata korreliert ist und nicht mehr mit der Größe des Karzinoms [Stamey et al., 2004]. Daher wurde der Wert der PSA-Density (PSAD) eingeführt, bei dem die Konzentration des PSA durch das Volumen der Prostata dividiert wird [Stenman et al., 1999]. Jedoch haben klinische Studien keine Verbesserung der Sensitivität durch Bestimmung der PSAD beweisen können [Ward et al., 2001]. Ein weiterer Wert, der eine Verbesserung der Detektionsrate erbringen sollte, ist die PSA-Velocity (PSAV), der Anstieg der PSA-Konzentration in einem Zeitabschnitt [Stenman et al., 1999]. Hierfür werden mindestens drei PSA-Werte mit einem zeitlichen Abstand zueinander von 12-18 Monaten benötigt [Ward et al., 2001]. Allerdings erfordert die PSAV eine hohe Stabilität der Bestimmungsmethode der PSA-Konzentration und eine sorgfältige Auswahl des Zeitpunktes der Bestimmung, um andere Ursachen einer PSA-Erhöhung auszuschließen [Ward et al., 2001]. So können z.B. DRE, TRUS, Prostatamassage, Ejakulation und Fahrradfahren den PSA-Wert erhöhen und die Einnahme von 5-alpha-Reduktase-Hemmern den PSA-Wert erniedrigen [Ward et al., 2001; Stenman et al., 1999].

Zudem zeigt sich das Prostatakarzinom sehr inhomogen in Bezug auf seinen Verlauf. In vielen Fällen werden klinisch nicht signifikante Karzinome entdeckt, d.h. Karzinome, die keine prognostische Bedeutung für den Patienten haben und ohne PSA-Test zu Lebzeiten des Patienten nicht entdeckt worden wären. Diese Karzinome zeichnen sich durch eine langsame Progressionsrate aus, so dass der Patient aufgrund anderer Erkrankungen verstirbt [Melia, 2005]. In Abhängigkeit vom Alter des Patienten und dem Abstand der PSA-Wert-Bestimmungen werden die Raten dieser Überdiagnostizierung mit 27-56% angegeben [Draisma et al., 2003].

Bei erhöhtem PSA-Wert (> 4 ng/ml) und/oder suspekter DRE bzw. suspektem TRUS wird zur Sicherung der Diagnose eine Sextantenbiopsie der Prostata durchgeführt, wobei aus beiden Lappen jeweils 3-6 ultraschallgeführte Biopsien entnommen werden, die histopathologisch untersucht werden [Eichenauer et al., 2003]. Vor allem bei jüngeren Patienten (unter 50 Jahre)

wird jedoch aufgrund der Unsicherheiten des PSA-Wertes empfohlen, auch gegebenenfalls schon bei PSA-Werten unter 2,5-3 ng/ml Biopsien durchzuführen [Aus et al., 2005]. Letztendlich kann nur die Biopsie die Diagnose eines PCa sichern, jedoch kann sie das Vorliegen eines PCa nicht mit hundertprozentiger Sicherheit ausschließen. Letzteres liegt allerdings in der Art der Probengewinnung begründet, da die Biopsien lediglich einen kleinen Teil der gesamten Prostata widerspiegeln.

Bei Patienten mit PSA-Werten über 20 ng/ml oder mit bestehenden Knochenschmerzen ist zusätzlich ein Knochenszintigramm zur Auffindung von Knochenmetastasen indiziert [Aus et al., 2005].

Aufgrund der unzureichenden diagnostischen Sicherheit des PSA-Wertes (insbesondere im Bereich zwischen 2-10 ng/ml [Stamey et al., 2004]) gibt es auch beim PCa Bestrebungen, neue und zuverlässige Markermoleküle zu identifizieren. Die meisten Marker bzw. Tests zeichnen sich jedoch nicht durch eine ausreichende Spezifität aus [Reynolds et al., 2007].

1.2.5 Staging und Grading des Prostatakarzinoms

Das Staging des PCa erfolgt nach der aktuellen UICC-Klassifikation [Wittekind et al., 2002], wobei Tumorausdehnung (T), Lymphknotenbefall (Nodalstatus N) und Metastasen (M) berücksichtigt werden. Eine Übersicht gibt

Tabelle 3.

Tabelle 3: TNM-Klassifikation des PCa nach [Wittekind et al., 2002].

Stadium	
T	Primärtumor
TX	keine Beurteilung möglich
T1	klinisch inapparenter Tumor
T1a	inzidenteller Tumor in $\leq 5\%$ des rezierten Gewebes
T1b	inzidenteller Tumor in $>5\%$ des rezierten Gewebes
T1c	Tumor identifiziert durch Biopsie
T2	Tumor auf die Prostata begrenzt
T2a	Tumor in einer Hälfte eines Lappens oder weniger
T2b	Tumor in mehr als einer Hälfte eines Lappens
T2c	Tumor in beiden Lappen
T3	Tumor organüberschreitend
T3a	Tumor durchbricht die Kapsel (uni- oder bilateral)
T3b	Tumor infiltriert die Samenblase(n)
T4	Tumor ist fixiert oder infiltriert Blasen Hals, äußeren Sphinkter, Rektum, Levatormuskeln oder Beckenwand
N	Nodalstatus
NX	keine Beurteilung möglich
N0	keine regionalen Lymphknotenmetastasen
N1	regionale Lymphknotenmetastasen
M	Fernmetastasen
MX	keine Beurteilung möglich
M0	keine Fernmetastasen
M1	Fernmetastasen
M1a	nicht-regionale Lymphknotenmetastasen
M1b	Knochenmetastase(n)
M1c	andere Fernmetastasen

Für das PCa existieren eine Vielzahl an verschiedenen Systemen für das histopathologische Grading, am gebräuchlichsten ist jedoch das Gleason Grading oder der Gleason-Score [Eble et al., 2004; Gleason et al., 1974]. Dieses stützt sich auf die Architektur der Drüsen, wohingegen nukleäre Atypien keinen Einfluß haben [Gleason, 1966]. Hierbei werden fünf verschiedene histologische Wachstumsmuster / *pattern* (1-5) mit abnehmender Differenzierung unterschieden. Eine Übersicht gibt Abbildung 3.

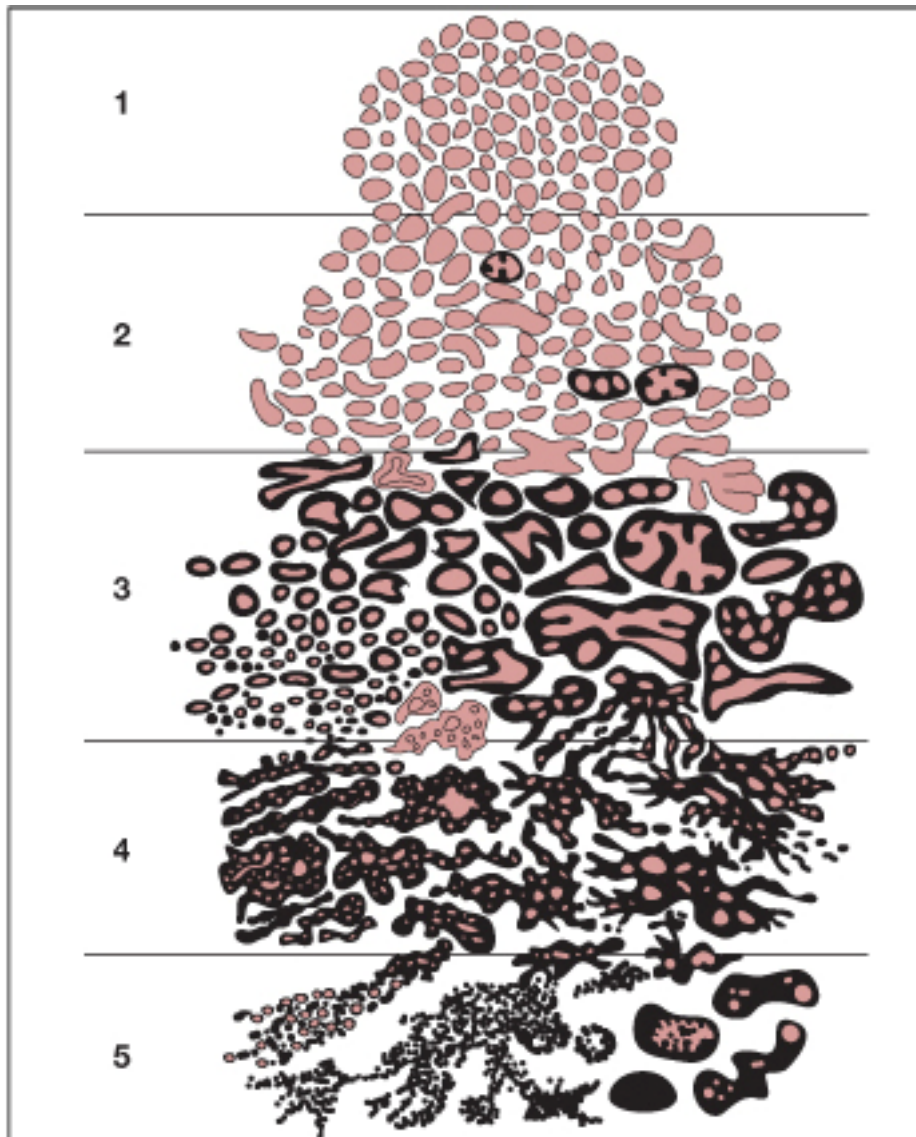


Abbildung 3: Schematische graphische Darstellung der Gleason *pattern* (1-5) nach Böcker et al., 2004.

Der Wert der beiden prädominanten *pattern* wird addiert und ergibt den Gleason-Score (Gesamtpunktzahl 2-10), der immer als Summe angegeben wird. Dabei steht an erster Stelle immer das vorherrschende Wachstumsmuster und an zweiter Stelle das zweithäufigste (z.B. 3+4=7).

1.2.6 Prognose und Therapie des Prostatakarzinoms

Die Therapie des PCa richtet sich nach dem klinischen Stadium, dem Gleason-Score und dem PSA-Wert [Eichenauer et al., 2003]. Gesicherten Einfluß auf die Prognose des PCa haben der

präoperative PSA-Wert, der Gleason-Score, das TNM-Stadium und der Resektionsstatus. Das Tumolvolumen, der histologische Typ und die DNA-Ploidie stellen nicht gesicherte Prognosefaktoren dar [Eble et al., 2004].

Die Standardtherapie für Patienten mit einem lokal begrenzten Tumor und einer Lebenserwartung von über zehn Jahren ist die radikale Prostatektomie. Im Falle eines sehr kleinen Tumors und einer Lebenserwartung von unter zehn Jahren kann auch eine abwartende Strategie, das sogenannte *watchful waiting* indiziert sein. Für Patienten mit lokal fortgeschrittenen Tumoren wird entweder eine Radiotherapie oder eine Hormontherapie empfohlen [Aus et al., 2005]. Die Hormontherapie, d.h. die Androgenblockade oder der Androgenentzug, kann auf verschiedene Weisen erfolgen: Orchiektomie, antiandrogene Therapie, Östrogene, LH-RH-Agonisten oder eine komplette Androgenblockade durch eine Kombination aus Orchiektomie bzw. LH-RH-Agonist und Antiandrogen [Eichenauer et al., 2003]. Die Therapie der Wahl für Patienten mit Lymphknoten- oder Fernmetastasen ist die Hormontherapie [Aus et al., 2005].

Die Nachsorge der Patienten mittels PSA-Bestimmung und DRE sollte lebenslang erfolgen bzw. solange das Lebensalter bzw. der Zustand des Patienten es sinnvoll erscheinen läßt. Dabei gibt es keine eindeutig definierten oder etablierten Nachsorgeintervalle, empfohlen wird jedoch folgendes Schema: zunächst drei, sechs und zwölf Monate nach initialer Therapie, innerhalb der nächsten drei Jahre alle sechs Monate und danach jährlich [Aus et al., 2005].

1.3 Proteomics

1.3.1 Allgemeines

Mit Proteomics bezeichnet man die Erforschung des Proteoms. Der Begriff des Proteoms wurde 1995 erstmalig durch Marc Wilkins geprägt und bezeichnet das gesamte Proteinäquivalent eines Genoms, d.h. die Gesamtheit aller in einer Zelle, einem Organismus, oder einer komplexen Körperflüssigkeit gleichzeitig exprimierten Proteine [van der Merwe et al., 2007; Lottspeich et al., 2006]. Neben fundamentalen bzw. ubiquitären Proteinen der Zellarchitektur sind auch Enzyme, Signaltransduktoren und Rezeptoren darin enthalten. Da das Proteom die Proteinexpression reflektiert, ist es sehr dynamisch und kann durch eine Vielzahl an Parametern beeinflusst werden. Es stellt daher ein exaktes und sensitives Abbild zellulärer Vitalitätsparameter dar. Aufgrund seiner im Vergleich zum Genom deutlich höheren Komplexität und Flexibilität kann das Proteom als sensitive Sonde für Veränderungen im

Gesundheitszustand der Zelle verwendet werden [Celis et al., 2003; Hanash, 2003]. Beim Menschen stehen einer Anzahl von etwa 40.000 Genen mehr als 500.000 Proteine gegenüber [Banks et al., 2000]. Die Korrelation zwischen Protein und RNA ist gering [Ideker et al., 2001]. Im Gegensatz zur Analyse der DNA oder der RNA können mittels Proteomics zum einen die aktuelle Menge und zum anderen posttranslationale Modifikationen jedes Proteins dargestellt werden [Lottspeich et al., 2006]. Die Komplexität und der erhebliche dynamische Bereich der Proteinkonzentrationen stellen große Herausforderungen an die Untersuchungstechniken. So erstreckt sich der Konzentrationsbereich von Plasmaproteinen beispielsweise über einen Bereich von zehn bis zwölf Zehnerpotenzen [Anderson et al., 2002]. Zur Reduktion der Probenkomplexität und des dynamischen Bereichs werden der eigentlichen Analyse daher Verfahren vorgeschaltet, die das Proteom auf ein leichter zu analysierendes Subproteom reduzieren. Im Falle des Plasmas werden hierbei z.B. die sechs oder zwölf häufigsten Proteine, die etwa 90% der Gesamtproteinmenge ausmachen, spezifisch entfernt [Lottspeich et al., 2006; Bjorhall et al., 2004] oder Fraktionierungen der Probe durchgeführt.

In den letzten Jahren und Jahrzehnten wurden Methoden entwickelt, die es ermöglichen, Proteome differentiell zu charakterisieren. Hierbei ist zum einen die 1975 erstmalig von Klose und O'Farrel unabhängig voneinander beschriebene zweidimensionale Gelelektrophorese zu nennen [Klose, 1975; O'Farrel, 1975], welche in neuerer Zeit hinsichtlich Trennleistung und vereinfachter Handhabung signifikant verbessert werden konnte [Görg et al., 2000]. Eine weitere wichtige Methode stellt die Massenspektrometrie (MS) dar, die mit der Einführung der MALDI-Technik (*matrix assisted laser desorption ionization*) 1987 ihre Tauglichkeit auch für komplexe biologische Proben beweisen konnte [Marvin et al., 2003]. Die Entwicklung neuer Protein-Chip Technologien, als Kombination von MALDI mit chromatographisch aktiven Oberflächen (SELDI-TOF-MS, *surface enhanced laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry*) [Kuwata et al., 1998] hat erstmals die bis dato bestehenden apparativen Grenzen der Miniaturisierung, der Empfindlichkeit und Sensitivität überwinden können [Wulfschlegel et al., 2003].

1.3.2 Zweidimensionale Gelelektrophorese

Die zweidimensionale Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (2D-SDS-PAGE), kurz auch zweidimensionale Gelelektrophorese genannt, ist die klassische Trenntechnik der Proteomanalyse, die eine hochauflösende Trennung von bis zu etwa 10.000 Komponenten in einem Gel ermöglicht, entsprechend in etwa der Gesamtzahl der Proteine in einfachen Zellen [Lottspeich et al., 2006].

Elektrophorese bezeichnet die Wanderung geladener Teilchen in einem elektrischen Feld. Sie stellt damit ein leistungsfähiges, hochauflösendes Verfahren zur Trennung von Substanzgemischen dar, basierend auf der unterschiedlichen elektrophoretischen Beweglichkeit der Partikel in Abhängigkeit von ihrer Größe und Ladung. Im Falle der gelbasierten Elektrophorese erfolgt die Auftrennung im elektrischen Feld durch eine stabilisierende Matrix, ein Gel, hindurch [Lottspeich et al., 2006].

Den Grundstein der elektrophoretischen Trennverfahren legte Arne Tiselius in den dreißiger Jahren des letzten Jahrhunderts [Tiselius, 1937]. Svensson entwickelte 1966 ein weiteres hochauflösendes Trenn- und Meßprinzip, die sogenannte isoelektrische Fokussierung, basierend auf der Nutzung des natürlichen pH-Gradienten zur Trennung von Substanzgemischen. Die Proteine wandern so lange in einem pH-Gradienten bis sie ihren isoelektrischen Punkt (IP) erreicht haben, an dem ihre Nettoladung null ist [Vesterberg et al. 1966]. Es folgte 1967 die erste Elektrophorese unter Verwendung von Natriumdodecylsulfat (SDS) durch Shapiro, Vinuela und Maizel, die es ermöglicht, eine Auftrennung der Substanzen nach dem Molekulargewicht durchzuführen [Shapiro et al, 1967].

Die Kombination der isoelektrischen Fokussierung und der SDS- Polyacrylamidelektrophorese zur 2D-SDS-PAGE wurde 1975 durch O'Farrell und Klose entwickelt [O'Farrell 1975]. Durch diese Entwicklung konnten erstmals ganze Zell- und Gewebelysate in ihre Bestandteile aufgetrennt werden. Durch die Einführung von immobilisierten pH-Gradienten (IPG) in der isoelektrischen Fokussierung 1982 konnte sowohl die Reproduzierbarkeit als auch das Auflösungsvermögen deutlich verbessert werden [Bjellqvist et al., 1982]. Durch die Arbeiten von A. Görg ist die 2D-SDS-PAGE mit IPG seit 1988 eine in der Analyse von Proteingemischen etablierte Methode [Görg et al., 1988]. Sie zeichnet sich durch hohe Reproduzierbarkeit, hohe Beladungskapazität (für präparative Gele) und hohes Auflösungsvermögen aus [Blomberg et al., 1995; Corbett et al., 1994; Hanash et al., 1991]. Zudem lassen sich nun auch basische Proteine (IP > 7,5) zuverlässig auftrennen [Görg et al., 1997; Görg et al., 1991]. Die 2D-SDS-PAGE wurde Mitte der 90er Jahre zum Mittelpunkt proteomischer Forschung und hat bis heute einen festen Platz neben weiteren proteomischen Techniken [Cordingley et al., 2003; Wilkins et al., 1997].

1.3.3 Massenspektrometrie

Der Begriff Massenspektrometrie bezeichnet eine Analysetechnik zur Bestimmung der Molekülmasse freier Ionen im Hochvakuum [Lottspeich et al., 2006]. Ein Massenspektrometer

setzt sich aus drei Komponenten zusammen: einer Ionenquelle, einem Massenanalysator und einem Detektor [Aebersold et al., 2003]. In der Ionenquelle wird aus einer Probe ein Strahl gasförmiger, einzelner Ionen erzeugt, die im Massenanalysator hinsichtlich des Masse-zu-Ladungsverhältnisses (m/z) aufgetrennt werden. Der Detektor dient der Messung des Ionenstroms. Das Ergebnis der Analyse ist das Massenspektrum, in dem die relativen Häufigkeiten der Ionen auf der y-Achse und die m/z -Verhältnisse auf der x-Achse aufgetragen sind [Lottspeich et al., 2006]. Bei der sogenannten *time-of-flight* (TOF)-Analyse werden im elektrischen Feld der Meßeinheit die geladenen Moleküle auf einen Detektor beschleunigt und deren Flugzeit bis zum Auftreffen auf den Detektor bestimmt. Diese korreliert mit der Größe der Moleküle [Katz et al., 2005].

Mit der Erfindung der sogenannten MALDI-TOF-MS im Jahre 1987 durch Koichi Tanaka sowie 1988 durch Michael Karas und Franz Hillenkamp gewann die MS auch für die Bioanalytik Bedeutung [Karas et al., 1988; Tanaka et al., 1987]. Hierbei wird die zu untersuchende Probe mit einem Überschuss an geeigneter Matrix auf einen metallischen Probenträger aufgebracht, wodurch Probe und Matrix kokristallisieren [Karas et al., 1988]. Die organischen Matrixmoleküle haben die Eigenschaft, die Laserenergie zu absorbieren. Dadurch schützt die Matrix zum einen die in ihr eingebetteten Moleküle vor der Fragmentierung durch den Laser, zum anderen bedingt sie eine Übertragung eines Protons auf die Moleküle. Mit der auftreffenden Laserenergie verdampft die Matrix und ermöglicht positiv geladenen Proteinen und Peptiden einen Flug in der Gasphase im Hochvakuum der Messeinheit [Lottspeich et al., 2006].

Die SELDI-TOF-MS ist eine Weiterentwicklung oder Variante der MALDI-TOF-MS. An Stelle eines metallischen Probenträgers bedient sich die SELDI-TOF-MS eines Chips, der „spots“ mit chromatographisch aktiven Oberflächen aufweist [Vorderwülbecke et al., 2005; Hutchens et al., 1995]. Nach dem Auftragen der Probe auf den *spot* binden nur Proteine, die den Oberflächeneigenschaften des *spots* entsprechen, die übrigen Proteine sowie Salze und andere störende Substanzen werden durch Waschschriffe entfernt [Vorderwülbecke et al., 2005]. Auf diese Weise werden eine Verringerung der Probenkomplexität und eine reproduzierbare Fraktionierung erreicht.

Beiden bisher genannten proteomischen Methoden ist gemeinsam, daß Gewebe und Zellen vor der eigentlichen Analyse lysiert werden müssen. Im Falle der Anwendung an Gewebe müssen die Zellen von Interesse gegebenenfalls durch manuelle oder lasergestützte Mikrodisektion von anderen Zellen isoliert werden. Hierfür sind in Abhängigkeit von der Methode unterschiedlich hohe Zellzahlen nötig (2D-SDS-PAGE ca. 50.000 Einzelzellen, MS ca. 15.000 Zellen (Erfahrungswerte der Proteomics Core Facility des Instituts für Pathologie, UKA; diese Werte variieren in der Literatur z.T. erheblich)). Neben dem damit verbundenen Arbeitsaufwand ist aber auch eine biologische Limitierung gegeben. Gewisse tumorbiologisch relevante Entitäten (z.B. Carcinomata *in situ* und Zellen aus dem Bereich einer

Perineuralscheideninvasion) weisen im vorhandenen Material nicht immer eine für die obigen Untersuchungen ausreichende Zellmenge auf.

Das sogenannte MALDI imaging (*imaging mass spectrometry* = IMS) ist eine vergleichsweise neue Technik. Erstmals 1997 durch Richard M. Caprioli et al. beschrieben [Caprioli et al., 1997], stellt sie eine Weiterentwicklung der MALDI-TOF-MS dar, wobei die Analytik direkt anhand eines Gefrierschnittes durchgeführt wird [Chaurand et al., 1999]. Diese neuartige MS-Technik basiert auf der sog. single cell detection. Damit konnten z.B. erfolgreich intakte Bakterien klassifiziert werden [Holland et al., 1996]. Die Verknüpfung dieser Meßmethode mit der Integration von geographischen Details der Probe (Histologie) bzw. mit der Ortsauflösung der erhobenen Daten ergibt das MALDI imaging. Neben der damit elegant ausgeschalteten Limitierung der notwendigen Proteinmenge können ferner die generierten MS-Daten unmittelbar und exakt mit der histologischen Information desselben Schnittes korreliert und verschiedene Gewebeentitäten parallel untersucht werden [Chaurand et al., 2004]. Diese beiden Punkte können insbesondere für klinisch-diagnostische Fragestellungen sehr interessante Anwendungen erschließen [Chaurand et al., 2006]. Die Auflösung in x-y-Richtung, welche hierbei erzielt werden kann, liegt für neuere Massenspektrometer typischerweise unter 50 µm [Chaurand et al., 2005], womit die Größenordnung von Einzelzellen erreicht wird. Die Arbeitsgruppe von Prof. Caprioli konnte bereits am Beispiel des Lungenkarzinoms zeigen, dass mittels MALDI imaging sowohl eine genaue Klassifikation als auch eine Differenzierung zwischen Patienten mit guter und schlechter Prognose gelingt [Yanagisawa et al., 2003].

1.3.4 Proteomics in der klinischen Forschung

Seit Beginn dieses Jahrtausends nimmt die Zahl der Veröffentlichungen auf dem Gebiet der klinischen Proteomforschung exponentiell zu. Besonders in der Suche nach neuen Markermolekülen für die Diagnose verschiedenster Erkrankungen erhofft man sich durch die Anwendung proteomischer Techniken Erfolg. Hierbei ist vor allem ein neuer Ansatz, das sogenannte „pattern profiling“, zu nennen. Es bezeichnet das Erkennen von spezifischen Mustern in der Proteinexpression im Vergleich zwischen zwei Gruppen von Patienten. Der Vorteil gegenüber einem singulären Markerprotein liegt in der im Allgemeinen geringeren Anfälligkeit gegenüber anderen Einflüssen und der damit verbundenen höheren Sensitivität und Spezifität begründet. Diese Technik fand als erstes in der Arbeitsgruppe um Drs. E. F. Petricoin und L.A. Liotta Anwendung, denen es im Jahre 2002 gelang, spezifische Muster der Proteinexpression in Seren von Patientinnen mit Ovarialkarzinomen zu identifizieren [Petricoin et al. 2002]. Die Verwendung von Körperflüssigkeiten, insbesondere Serum, bei der Suche nach

Biomarkern basiert auf der Hypothese einer komplexen Interaktion zwischen Tumorgewebe und dem umgebenden Mikromilieu sowie einer daraus resultierenden Veränderung des Proteinprofils des Serum [Liotta, et al., 2001].

1.4 Zielsetzung

In Rahmen dieser Arbeit sollte am Beispiel des Harnblasenkarzinoms und des Prostatakarzinoms versucht werden, mittels verschiedener proteomischer Techniken (2D-SDS-PAGE, MALDI- und SELDI-TOF-MS sowie MALDI imaging) neue potentielle Markermoleküle bzw. *pattern* für diese beiden urologischen Tumorentitäten zu identifizieren. Diese sollten in der Lage sein, die Diagnostik beider Karzinome zu vereinfachen und zu verbessern.

2 Material und Methoden

4.1 Probengewinnung

4.1.1 Tumorbank

In Kooperation mit der Urologischen Klinik des Universitätsklinikum Aachen (UKA) konnte beginnend im Jahre 2004 am Institut für Pathologie eine urologische Tumorbank etabliert werden. In dieser wird jeweils nach Patienten korreliert Serum, Urin sowie Gewebe (unter anderem von Prostata und Harnblase) bei -80°C gelagert wird. Zu jeder Probe existieren neben der histopathologischen Diagnose auch klinische Angaben. Die Probengewinnung und -lagerung geschieht mit Genehmigung der zuständigen Ethikkommission (# EK 122/04).

Die Asservierung des klinischen Materials erfolgt nach einem standardisierten Protokoll, welches eine schonende Behandlung garantiert. Dies beinhaltet vor allem die Zeit zwischen Probenentnahme und endgültiger Lagerung bei -80°C zu minimieren.

Die Gewebeproben werden nativ und auf Eis in die Pathologie übersandt. Im Falle der Harnblasenbiopsien werden die Proben in sogenanntes OCT-Polymer (*optimal cutting temperature*; Tissue-Tek[®] (Sakura, #4583) im Kryostat (Microm HM 560) bei -20°C angefroren. Von jeder Biopsie wird ein Gefrierschnitt für die Diagnostik angefertigt und das übrige Material in die Tumorbank überführt. Die Zystektomiepräparate werden unmittelbar dem sogenannten Harnblasenmapping unterzogen. Hierbei wird die Harnblase durch die Urethra mittels eines Y-Schnittes von ventral eröffnet. Nach Darstellung der Ureteren wird die Harnblase in kranio-kaudaler Richtung in mindestens vier (in Abhängigkeit von der Größe der Harnblase auch mehr) gleich große Streifen geschnitten. Hierbei erfolgt der erste Schnitt in Verlängerung der Urethra und die übrigen zu beiden Seiten parallel. Danach werden die kompletten Ureteren sowie die komplette Harnblasenwand nach einem Schema eingebettet, wobei das Gewebe alternierend mit wenig OCT in flüssigem Stickstoff gefroren und in Formalin fixiert wird. Somit liegt die eine Hälfte des Gewebes für die Diagnostik als formalinfixiertes und in Paraffin eingebettetes Dauerpräparat vor, die andere Hälfte wird bei -80°C in der Tumorbank asserviert. Im Falle der Prostataktomiepräparate erfolgt zum einen die Entnahme von Gewebe standardisiert an der dorsalen Seite des Organs am Übergang zur Samenblase. Von jeder dieser Gewebeproben wird nach Anfrieren des Gewebes mit wenig OCT in Kohlendioxid ein Gefrierschnitt für die Diagnostik angefertigt und die Proben dann bei -80°C gelagert. Zusätzlich wird stanzbiopsisch Gewebe in Anlehnung an die Routinediagnostik des Prostatakarzinoms gewonnen. Hierzu wird eine Stanzpistole mit Trucut[®]-Nadeln (Bard[®] Magnum[®], 18g, #MN1820) verwendet. Die Biopsien werden von jeder Seite apikal, basal und aus der Mitte der Prostata jeweils von dorsal gewonnen. Die Biopsien werden in OCT im Kryostat angefroren und dann bei -80°C gelagert. Das übrige

Gewebematerial wird nach Fixierung in Formalin nach den sog. Stanford Kriterien makroskopisch vollständig aufgearbeitet und im Anschluß daran mikroskopisch diagnostiziert.

Die Entnahme des Serums erfolgt präoperativ unter Verwendung weißer Serummonovetten (Sarstedt, #02.1063). Nach Zentrifugation für 10 Minuten bei 1300 rpm (Rotordurchmesser 40 cm) wird das Serum in Kryoröhrchen überführt bzw. aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schock gefroren und bei -80°C gelagert.

Der Urin wird unmittelbar präoperativ über das Zystoskop (im Falle einer transurethralen Resektion) oder einen Katheter gewonnen. Ein Teil des Urins wird direkt in Kryoröhrchen aliquotiert, der andere Teil wird in ein Probenröhrchen (15 ml) überführt und für 10 Minuten bei 1300 rpm zentrifugiert. Der Überstand wird im Anschluß ebenfalls in Kryoröhrchen aliquotiert. Diese werden in flüssigem Stickstoff schock gefroren und bei -80°C gelagert.

4.1.2 Referenzproben

In der Poliklinik der Urologischen Klinik des UKA wurden von Patienten mit unterschiedlichen Erkrankungen (tumoröse und nicht-tumoröse urologische Erkrankungen) mit deren Einwilligung Serum und Urin gesammelt. Die Seren und der Urin wurde analog den Seren der Tumorbank gewonnen und verarbeitet (siehe 4.1.1).

In Zusammenarbeit mit der Blutbank des UKA wurden Serumproben von gesunden, männlichen Blutspendern (Alter 50 Jahre und aufwärts) mit deren Einverständnis gesammelt. Bei allen Proben wurde der PSA-Wert bestimmt. Die Probanden erhielten zudem einen Fragebogen, der das Vorhandensein eines Prostatakarzinoms sowie weiterer Tumorerkrankungen abfragte. Die Seren wurden analog den Seren der Tumorbank gewonnen und verarbeitet (siehe 4.1.1).

In Kooperation mit dem Institut für klinische Chemie und Pathobiochemie des UKA standen als weiteres Kontrollkollektiv Seren von gesunden Spendern (Männer und Frauen), die mit deren Einverständnis gesammelt wurden, zur Verfügung.

4.2 Zellkultur

Für die Abschätzung der benötigten Anzahl an Zellen für die 2D-SDS-PAGE wurden von UROtsa (immortalisierte, SV40 transfizierte Normalurothel-Zelllinie) und RT4 (Zelllinie eines papillär, hochdifferenziertes Urothelkarzinoms) unter standardisierten Kultivierungsbedingungen (37°C, 20% O₂ und 5% CO₂) Zellsedimente aus etwa 1 Millionen Zellen hergestellt. Die Zelllinie UROtsa wurde in RPMI-Medium mit 5% FKS (fötalem Käberserum) und die Zelllinie RT4 in McCoy-Medium mit 10% FKS kultiviert. Von den Zellsedimenten wurden mittels eines Kryostats (Microm HM 560) 5 µm dicke Schnitte angefertigt und bis zur weiteren Bearbeitung bei -80°C gelagert.

Zum anderen wurden für die Fraktionierungsversuche Zellsedimente à 1 Millionen Zellen unter standardisierten Kultivierungsbedingungen (37°C, 20% O₂ und 5% CO₂) von UROtsa, RT4, RT112 (Zelllinie eines gut differenzierten Urothelkarzinoms) und J82 (Zelllinie eines schlecht differenzierten Urothelkarzinoms) hergestellt. Die Zelllinien RT112 und J82 wurden in RPMI-Medium mit 5% FKS kultiviert. Die Zellsedimente wurden bis zu weiteren Verwendung bei -80°C eingefroren.

4.3 Probenvorbereitung

4.1.3 Mikrodissektion

Um die Zellpopulation von Interesse aus dem Gewebeverband und damit von den „störenden“ Zellpopulationen zu isolieren, bedarf es der sogenannten Mikrodissektion. Hierbei gibt es zwei verschiedene Ansätze: die manuelle Mikrodissektion und die lasergestützte Mikrodissektion (LCM). Beide Methoden beruhen auf dem gleichen Prinzip, bei dem unter direkter visueller Kontrolle bestimmte Zellen oder Zellgruppen aus dem Gewebeverband isoliert und angereichert werden. Zur Orientierungshilfe werden die Proben zuvor einer Kurzfärbung unterzogen.

4.1.3.1 Kurzfärbung

Von den Gewebeproben und Zellsedimente wurden mit Hilfe eines Kryostaten (Microm HM 560) 5 µm dicke Gefrierschnitte angefertigt. Diese wurden je nach Größe einzeln oder in Gruppen auf Objektträger appliziert und bei -80°C bis zur weiteren Verarbeitung aufbewahrt. Man erhielt somit von jeder Probe eine Schnittreihe, von der der erste und letzte Schnitt nach einem für die Pathologie üblichen Hämatoxylin & Eosin (H&E) Standardprotokoll (vergleiche

Abschnitt 4.1.10.4) gefärbt und zu einem Dauerpräparat umgewandelt wurde. Diese Schnitte dienten zum einen als Orientierungshilfe für die spätere Mikrodisektion der Kryoschnitte, die nur mit der Kurzfärbung angefärbt wurden, zum anderen der Kontrolle und Diagnosesicherung über die Schnittserie.

Der Grund für die Verwendung eines Kurzfärbeprotokolls, in welchem nur Hämatoxylin verwendet wird, liegt in der Modifikation der Proteine, die durch Eosin ausgelöst werden kann. Für die genaue Darstellung der Morphologie des Gewebes ist die H&E Färbung zwar deutlich besser geeignet, aber der Verlust an Informationen über die Proteine wäre zu groß und würde die Aussagekraft der anschließenden Analysen minimieren.

Für die Kurzfärbung wurden die Objektträger mit den Gefrierschnitten zunächst für 30 Sekunden in 70%igen Ethanol getaucht. Danach erfolgte ein Waschschrift für 10 Sekunden mit Aqua bidest. Im weiteren Verlauf wurden sie für 30 Sekunden mit Mayer's Hämatoxylin Lösung (Sigma) versetzt, wiederum für 10 Sekunden mit Aqua bidest. gewaschen und für weitere 10 Sekunden in 0,5%ige Natriumhydrogencarbonat-Lösung (NaHCO_3) getaucht. Als letzter Schritt folgte für 30 Sekunden eine Fixierung in 70%igem Ethanol.

Allen Lösungen wurden dabei zuvor Proteaseinhibitor-Cocktail-Tabletten (Complete, Roche, #1836145) zugesetzt. Die Proteaseinhibitoren sollen die Proteine im Gewebe vor Abbau- und Modifikationsprozessen durch Proteasen zuverlässig schützen, da die Mikrodisektion der Gefrierschnitte bei Raumtemperatur stattfindet. Diese Temperatursteigerung führt dazu, daß die proteolytischen Vorgänge nicht mehr deutlich verlangsamt ablaufen bzw. gehemmt werden, wie dies bei -80°C der Fall ist. Nach der Kurzfärbung mußte sich unmittelbar die Mikrodisektion anschließen, da die Gefrierschnitte an der Luft und bei Raumtemperatur lediglich für 30 Minuten „haltbar“ sind. Wird dieses Zeitfenster überschritten, kommt es zunehmend zu Verlust an Proteinen durch Modifikationen oder Abbau, wie in Vorversuchen bestätigt werden konnte.

4.1.3.2 Manuelle Mikrodisektion

Vor der eigentlichen Mikrodisektion wurden die H&E gefärbtem Dauerpräparate, welche als Orientierungshilfe dienten, unter dem Mikroskop begutachtet und die geeigneten Bereiche, die für die manuelle Mikrodisektion zugänglich sind, markiert. Hierbei handelte es sich um Bereiche, in denen die Tumorzellen oder normale Zellen in größeren Gruppen und möglichst homogen zusammen lagen, ohne von anderen Zellpopulationen durchsetzt zu werden.

Für die manuelle Mikrodisektion wurden ein Mikroskop mit 40-facher Vergrößerung, sterile Einmalnadeln (Microlance 3, 20G x 1 1/2), 1500 μl Reaktionsgefäße und ein Styroporbehälter mit Naßeis verwendet. Zu Beginn wurde jeweils ein Objektträger nach dem

Kurzfärbeprotokoll (siehe 4.1.10.1) angefärbt und unter dem Mikroskop begutachtet. Die zuvor im Dauerpräparat gekennzeichneten Bereiche wurden aufgesucht und mit Hilfe der sterilen Einmalnadeln vorsichtig abgekratzt. Beim Abkratzen der Zellen mußte darauf geachtet werden, gleichmäßige Bewegungen in eine Richtung auszuführen. Die Gefrierschnitte wurden während der Mikrodissektion immer wieder angefeuchtet, um den Vorgang zu erleichtern. Dazu wurde die sterile Einmalnadel in Aqua bidest. getaucht. Der anhaftende Tropfen wurde am Rande des Präparates aufgebracht und während des Abkratzvorgangs in das Gewebe eingebracht. Dadurch hafteten die Zellen besser aneinander, lösten sich leichter vom umgebenden Gewebe und konnten zu kleinen Zellaggregaten geformt werden. Diese wurden mit der sterilen Einmalnadel aufgenommen und in die Reaktionsgefäße überführt. In den Reaktionsgefäßen war eine geringe Menge an Aqua bidest. vorhanden, die die Überführung des Zellaggregates in das Reaktionsgefäß erleichterte. Auf diese Weise wurden so viele Gefrierschnitte bearbeitet, bis die benötigte Zellzahl erreicht war. Durch die Verwendung von Millimeterpapierfolie, die unter das Präparat gelegt wurde, konnte die Zählung der Zellen vereinfacht werden.

4.1.3.3 Lasergestützte Mikrodissektion

Die lasergestützte Mikrodissektion (LCM) wurde mit Hilfe des Mikrobeam-Gerätes (P.A.L.M.) durchgeführt. Dieses Gerät setzt sich aus einem hochauflösendem Fluoreszenzmikroskop, einem Stickstoff-Laser, einer LPC (*laser pressure catapulting*) Einheit mit Probengefäß-Halterung, einer Farbkamera und einem PC für die Software gesteuerte Kontrolle sowie Durchführung der LCM zusammen. Die LCM besteht aus verschiedenen Arbeitsschritten. Zunächst wurde der Deckel eines 500 µl Reaktionsgefäßes in die vorgesehene Halterung eingespannt. Ein mittels Kurzfärbung angefarbter Gefrierschnitt wurde auf dem Kreuztisch des Mikroskops fixiert, der Deckel des Reaktionsgefäß über den Schnitt geschwenkt und für die Mikrodissektion geeignete Bereiche gesucht. Diese wurden mit Hilfe des Computerprogramms markiert, indem sie komplett umrandet wurden. Diese Markierung entspricht der Linie, entlang derer der Laser das Gewebe schneidet und somit von der Umgebung abtrennt. Hierbei gibt es in Abhängigkeit von der Größe des auszuschneidenden Gewebeareals zwei verschiedene Möglichkeiten. Ist das Gewebeareal klein, wird es bis auf eine kleine Gewebebrücke komplett ausgeschnitten. Diese wird danach mittels eines gezielten Laserimpulses zerstört, wodurch das Gewebeareal in toto in den Deckel des Reaktionsgefäßes katapultiert wird. Dies ist das sogenannte *Laser Pressure Catapulting*. Ist das Gewebeareal groß, wird es komplett ausgeschnitten, bleibt aber aufgrund seiner Größe auf dem Objektträger haften. Danach wird das Areal in Teilen durch multiple, kurze Laserschüsse in den Deckel des Cups katapultiert. Diese zweite Methode nennt sich *Robo*

Laser Pressure Catapulting. Bei beiden Verfahren wird die Prozedur solange wiederholt, bis die benötigte Zellzahl erreicht ist.

Die LCM bietet jedoch für die hier untersuchte Fragestellung auch nach Austestung zu viele Nachteile. Zum einen ist sie sehr zeitaufwendig [Paweletz, 2001]. Bevor mit der Verarbeitung des eigentlichen Probenmaterials begonnen werden kann, muß der Laser zunächst auf das jeweilige Gewebe eingestellt werden. Die Laserstärke und der Fokus des Lasers müssen so gewählt werden, daß das Gewebe ohne Beschädigung geschnitten werden kann. Sind die Laserimpulse zu stark, erleidet nicht nur das Gewebe Hitzeschäden, sondern es kann ggf. auch der Objektträger beschädigt werden. Dies hat zur Folge, daß Glassplitter das Gewebe kontaminieren. Sind die Laserimpulse zu schwach, werden die Zellinseln nicht vom umgebenden Gewebe getrennt. Die benötigte Stärke und der Fokus der Laserimpulse hängen unter anderem auch von der Dicke des Gefrierschnittes ab, so daß bei jeder Schwankung in der Schnittdicke die Einstellungen des Lasers nicht mehr adäquat sind. Des Weiteren müssen verschiedene Parameter beachtet werden, damit die Schneidelinie mit der Markierungslinie übereinstimmt. Bei Abweichungen kann es zu Kontaminierung mit anderen Zellen kommen. Außerdem können immer nur vergleichsweise kleine Gewebeareale in dem zur Verfügung stehenden Zeitfenster von 30 Minuten markiert und dann gelasert werden. Daher wäre die Anzahl der Gefrierschnitte, die für diese Methode zur Verfügung stehen müßten, deutlich größer als bei der manuellen Mikrodissektion. Selbst wenn 500-1000 Zellen pro Gefrierschnitt gewonnen werden könnten, benötigte man etwa 45-90 Gefrierschnitte, um die notwendige Gesamtzellzahl für die 2D-SDS-PAGE zu erreichen. Die LCM ist daher eher geeignet für die Mikrodissektion von kleinen Zellzahlen oder für Untersuchungen mit ausreichend großem Materialbestand.

Jedoch auch die manuelle Mikrodissektion weist Nachteile auf, die vor allem in der limitierten Genauigkeit liegen. Die visuelle Kontrolle der Mikrodissektion erfolgt über ein Mikroskop, welches mit der 40-fachen Vergrößerung die Morphologie des Gewebes ungenauer darstellt als die bei höheren Vergrößerungen durchführbare LCM. Zudem schneidet der Laser im Idealfall genau auf der Markierungslinie, dagegen muß bei der manuellen Mikrodissektion mit der Nadelspitze versucht werden, per Hand eine Grenze zum umgebenden Gewebe einzuhalten. Die manuelle Mikrodissektion bietet aber auch wichtige Vorteile, wie Zeit- und Materialersparnis.

Aus diesen Gründen wurde für die Isolierung der benötigten Zellpopulationen aus dem Gewebeverband ausschließlich die manuelle Mikrodissektion eingesetzt.

4.1.4 Probenfraktionierung mittels magnetischer Beads

Für die Probenfraktionierung wurden Kits der Firma Bruker Daltonics (Bremen) mit WCX-Beads (*weak cation exchange*; Profiling Kit MB-WCX, #223983), WAX-Beads (*weak anion exchange*; Profiling Kit MB-WAX, #223990) und HIC 8 Beads (*hydrophobic interaction chromatography*; Profiling Kit MB-HIC C8, #219041) bezogen, die alle für die Fraktionierung benötigten Lösungen enthalten. Nach Durchführung der entsprechenden Trenn- und Waschschriffe erhält man letztlich die durch die verwendete Beadoberfläche definierte Fraktion der Proteine im organischen Lösungsmittelgemisch. Diese wird in Matrixlösung 1 zu 10 verdünnt (Matrixlösung: 0,3 mg/ml 4-Hydroxy-3,5-dimethoxizimtsäure in Aceton/Ethanol 1/2). Hiervon werden je 1 µl auf sogenannte AnchorChip targets (600 µm targets, Bruker Daltonics) aufgetragen. Die Auftragung erfolgt in Replikaten (n=3), um Variationen bei der AnchorChip-Präparation Rechnung zu tragen. Die AnchorChip targets stellen die Probenträger für das MALDI-TOF dar.

4.1.4.1 Fraktionierung mittels WCX-Beads

Zu Beginn wurde die Lösung mit den Beads für eine Minute gevortext, um eine homogene Suspension zu erhalten. In einem PCR-Reaktionsgefäß wurden 10 µl MB-WCX Bindungslösung und 10 µl Bead-Suspension mittels Auf- und Abpipettieren vermischt. Dieser Lösung wurden 5 µl Serum hinzu gegeben. Nach gründlichem Mischen und fünf Minuten Inkubationszeit, die allen Proteinen ermöglichte, mit den korrespondierenden chemischen Eigenschaften auf der funktionalen Beadoberfläche zu binden, wurde das Reaktionsgefäß in den sogenannten *magnetic bead separator* (MBS), einen Ständer, der an einer Seite einen starken Magneten enthält, gestellt. Auf diese Weise konnten sich die Beads vom Überstand lösen, der nach einer Minute von den an der Wand des Reaktionsgefäßes angelagerten Beads vorsichtig abpipettiert werden. Die folgenden Waschschriffe wurden dreimal durchgeführt. Dazu wurde 100 µl der Waschlösung hinzu gegeben, das Reaktionsgefäß 20 mal im MBS zwischen angrenzenden Plätzen hin und her bewegt und der Überstand wieder von den Beads vorsichtig abpipettiert. Im letzten Schritt wurden alle auf der Beadoberfläche gebundenen Proteine durch Zugabe von 5 µl Elutionslösung von den Beads entfernt. Für zwei Minuten wurde das Reaktionsgefäß wieder in den MBS gestellt, so daß sich die Beads an einer Seite sammeln konnten. Der Überstand wurde abpipettiert, in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und mit 5 µl Stabilisierungslösung versetzt. Eine vereinfachte und schematische Darstellung der Arbeitsschriffe ist in Abbildung 4 dargestellt.

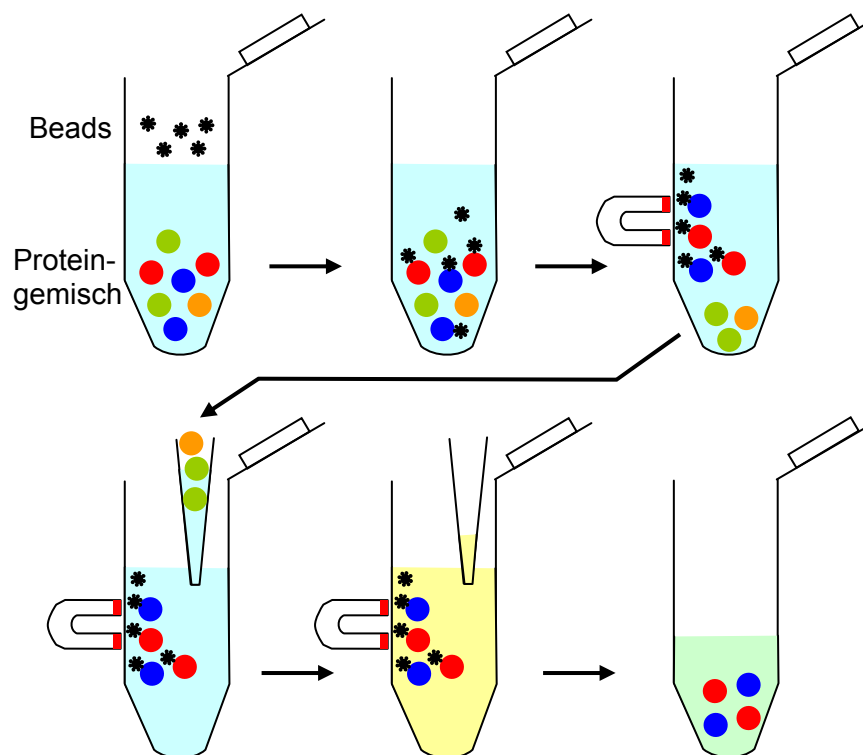


Abbildung 4: Vereinfachte schematische Darstellung der Probenaufarbeitung mittels magnetischer Beads.

4.1.4.2 Fraktionierung mittels WAX-Beads

Zu Beginn wurde die Lösung mit den Beads für eine Minute gevortext, um eine homogene Suspension zu erhalten. In einem PCR-Reaktionsgefäß wurden 20 µl MB-WAX Aktivierungslösung und 10 µl Bead-Suspension mittels Auf- und Abpipettieren vermischt. Das Gefäß wurde anschließend für 20 Sekunden in den MBS gestellt, so daß sich die Beads vom Überstand lösen konnten. Dieser Überstand wurde vorsichtig, ohne die Beads zu berühren, entfernt. Danach wurde das Reaktionsgefäß aus dem MBS entfernt und in einen regulären Ständer gesetzt. Zur Äquilibration der Beads wurden 100 µl Bindungspuffer (pH 9) hinzu pipettiert. Zur Durchmischung wurde das Reaktionsgefäß wieder in den MBS gestellt und 20 mal zwischen den angrenzenden Plätzen hin und her bewegt. Nach etwa 20 Sekunden konnten sich die Beads wieder an der Wand des Reaktionsgefäßes sammeln, so daß der Überstand vorsichtig abpipettiert werden konnte. Diese Äquilibrationsschritte wurden einmal wiederholt. Das Reaktionsgefäß wurde wieder in einen regulären Ständer gesetzt und die Beads in 20 µl Bindungslösung resuspendiert. Die auf diese Weise vorkonditionierten Beads wurden letztlich mit 5 µl Serum versetzt. Nach gründlichem Mischen und fünf Minuten Inkubationszeit, die allen Proteinen ermöglichte, mit den

korrespondieren chemischen Eigenschaften auf der funktionalen Beadoberfläche zu binden, wurde das Reaktionsgefäß in den MBS gestellt. Nach 20 Sekunden konnte der Überstand von den an der Wand des Reaktionsgefäßes angelagerten Beads abpipettiert werden. Die folgenden Waschschrte wurden dreimal durchgeführt. Dazu wurde 100 µl der Bindungslösung hinzu gegeben, das Reaktionsgefäß 20 mal im MBS zwischen angrenzenden Plätzen hin und her bewegt und nach 20 Sekunden der Überstand wieder von den Beads vorsichtig abpipettiert. Im letzten Schritt wurden alle auf der Beadoberfläche gebundenen Proteine durch Zugabe von 5 µl Elutionslösung von den Beads entfernt. Nach fünf Minuten Inkubation wurde das Reaktionsgefäß wieder in den MBS gestellt, so daß sich die Beads an einer Seite sammeln konnten. Der Überstand wurde abpipettiert und in ein frisches Reaktionsgefäß überführt. Diese Lösung mußte durch Verwendung der MB-HIC 8 Beads weiter aufgereinigt werden. Dazu wurde die Lösung mit 5 µl deionisiertem Wasser und 5 µl HIC 8 Beads versetzt. Nach einer Minute Inkubationszeit wurde das Reaktionsgefäß in den MBS gestellt. Der Überstand konnte nach 20 Sekunden von den an der Wand des Reaktionsgefäßes angelagerten Beads vorsichtig abpipettiert werden. Das Reaktionsgefäß wurde für die folgenden drei repetitiven Waschschrte aus dem MBS entfernt. Es wurde 100 µl der Waschlösung zu den Beads gegeben, das Reaktionsgefäß 20 Mal im MBS zwischen angrenzenden Plätzen hin und her bewegt und der Überstand wieder von den Beads vorsichtig abpipettiert. Im letzten Schritt wurden alle auf der Beadoberfläche gebundenen Proteine durch Zugabe von 5 µl Acetonitril (50%) von den Beads entfernt. Nach einer Minute wurde das Reaktionsgefäß wieder in den MBS gestellt, so daß sich die Beads an einer Seite sammeln konnten. Der Überstand wurde abpipettiert und in ein frisches Reaktionsgefäß überführt.

2.3.2 Fraktionierung der Zellsedimente bzw. des Serum

2.3.3.1 ProteoEnrich™ CAT-X-Kit

Hierzu wurde das ProteoEnrich™ CAT-X-Kit (Novagen, #71532-3) zum einen nach den Angaben des Herstellers, zum anderen mit Modifikationen bezüglich der Waschpuffer verwendet. In einem Reaktionsgefäß wurden 100 µl Serum mit 100 µl 10x CAT-X-Buffer und 400 µl deionisiertem Wasser gemischt. In eine Einmalspritze wurden 5 ml 1x CAT-X-Buffer gefüllt, jegliche Luft entfernt und die Kartusche mit der Spritze verbunden. Die Kartusche wurde äquilibriert, indem 2 ml des Puffers vorsichtig mit leichtem Druck hindurchgepreßt wurden. Der Durchfluß wurde verworfen und die Spritze wieder entfernt und verschlossen. Die zuvor verdünnte Probenlösung wurde in eine frische Spritze überführt, jegliche Luft

entfernt und die Kartusche wurde mit der Spritze verbunden. Durch leichtes Drücken des Stempels wurde die Probe durch die Kartusche gepreßt, so daß die Durchflußrate bei 15-20 Tropfen pro Minute lag. Der Durchfluß wurde in einem frischen Reaktionsgefäß aufgefangen und bildete die erste Fraktion (ungebundene Proteine). Die Kartusche wurde wieder auf die Spritze, die den 1x CAT-X-Buffer enthielt, geschraubt und mit 3 ml 1x CAT-X-Buffer vorsichtig durchgespült (Durchflußrate 15-20 Tropfen pro Minute). In einem frischen Reaktionsgefäß wurde der Durchfluß aufgefangen. Nach diesem Punkt wurden zwei verschiedene Waschprotokolle angewandt. Das eine entsprach den Angaben des Herstellers. Hierbei wurde die Kartusche jeweils mit 3 ml 1x CAT-X-Buffer gewaschen, der eine zunehmende Natriumchloridkonzentration enthielt (250 mM, 500 mM, 750 mM und 1M). Jeder Durchfluß wurde getrennt aufgefangen. Beim zweiten Waschprotokoll kamen jeweils 3 ml verschiedener Pufferlösungen mit aufsteigender Stringenz zum Einsatz (0,15 M Natriumchlorid, 3 M Urea, 6 M Urea, 50 mM Tris-HCl (0,1 % OPG, pH9), 100 mM Natriumphosphat (0,1% OPG, pH7), 0,1% Tween 20, 1 M Natriumchlorid). Auch hier wurde jeder Durchfluß getrennt gesammelt. Vor der 2D-SDS-PAGE mußte jede Fraktion mittels der Methanolfällung aufgereinigt werden (vergleiche hierzu Abschnitt 2.3.5.3). Unmittelbar nach der Benutzung wurde die Kartusche gereinigt und regeneriert, so daß sie für weitere Fraktionierungen verwendet werden konnte. Hierzu wurde die Kartusche zunächst mit 3 ml 1x CAT-X-Buffer mit 2 M Natriumchlorid, dann mit 3 ml 0,5 M Natriumhydroxid und zum Schluß mit 3 ml 1x CAT-X-Buffer gewaschen. Zur Überprüfung der Reinigung wurde der pH-Wert des Durchflusses gemessen, welcher 5,5 oder niedriger sein sollte.

2.3.3.2 Vivapure® C18 Micro spin columns

Für die Probenfraktionierung wurden die Vivapure® C18 Micro *spin columns* (Vivasciences #VS-RP218L24) nach den Angaben des Herstellers mit Modifikationen verwendet. Zunächst wurde die Membran mit 200 µl 100%igem Acetonitril (ACN) und 0,1% Trifluoressigsäure (TFA) durch Zentrifugation für eine Minute bei 400 x g gewaschen. Der Durchfluß wurde verworfen. Danach wurde die Membran zweimal mit je 200 µl 0,1%igem TFA durch Zentrifugation für jeweils zwei Minuten bei 400 x g äquilibriert. Der Durchfluß wurde jeweils verworfen. Im Falle der Zellsedimente wurden diese in 200 µl 0,1 %igem TFA aufgenommen, suspendiert und die Lösung in das Reaktionsgefäß mit der Membran überführt. Im Falle des Serums wurden 100 µl Serum mit 100 µl 0,1%igem TFA gemischt und in das Reaktionsgefäß mit der Membran überführt. Dieses wurde für 2 Minuten bei 400 x g zentrifugiert, der Durchfluß wurde in ein frisches Reaktionsgefäß überführt. Dann wurde mit 200 µl 0,1%igem TFA durch Zentrifugation für zwei Minuten bei 400 x g gewaschen und der Durchfluß verworfen. Um die letzten Flüssigkeitsreste zu entfernen, wurde das Reaktionsgefäß danach

für 30 Sekunden bei 13.000 x g zentrifugiert und der Durchfluß verworfen. Am unteren Ende des *spin column* wurde ein kleines Reaktionsgefäß angebracht und beide zusammen in ein größeres Reaktionsgefäß (2 ml) überführt. Im Anschluß erfolgte schrittweise die Elution der an die Membran gebundenen Proteine. Hierbei kamen nacheinander sieben, in ihrer Stringenz zunehmende Puffer zum Einsatz: 0,15 M Natriumchlorid, 1 M Natriumchlorid, 50 mM Tris-HCl (0,1 % OPG, pH9), 100 mM Natriumphosphat (0,1% OPG, pH7), 3 M Urea, 6 M Urea und 0,1% Tween 20. Es erfolgte jeweils die Zugabe von 50 µl Puffer. Anschließend wurde zunächst für 30 Sekunden bei 400 x g und dann für 30 Sekunden bei 13.000 x g zentrifugiert. Der Durchfluß wurde jeweils in ein frisches Reaktionsgefäß überführt. Vor der 2D-SDS-PAGE mußte jede der Fraktionen noch mittels Methanolfällung aufgereinigt werden (vergleiche hierzu Abschnitt 2.3.5.3).

2.3.3.3 ProteinChip® Biomarker Profiling Fractionation Kit

Für die Probenfraktionierung wurde das ProteinChip® Biomarker Profiling Fractionation Kit (CIPHERGEN Biosystems, #K100-0002) verwendet. Als erstes wurden 20 µl Probe (Serum oder in 0,1%iges PBS aufgenommenes Zellsediment) in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß pipettiert, 30 µl Puffer U9 hinzu gegeben und das Gefäß bei 4°C für 20 Minuten geschüttelt. In der Zwischenzeit wurde Puffer U9 neunfach mit 50 mM Tris (pH 9,0) verdünnt, um Puffer U1 zu erhalten. In das Reaktionsgefäß wurden 50 µl Puffer U1 zugefügt, das Gefäß kurz gevortext und für 30 Minuten bei 4°C geschüttelt. Währenddessen wurden die *spin columns* vorbereitet, indem zunächst leicht gegen das untere Ende geklopft wurde, um den Inhalt sedimentieren zu lassen. Die *spin column* wurde, nach Entfernung beider Deckel, in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß gestellt und für 30 Sekunden bei etwa 80 x g zentrifugiert, um den enthaltenen Puffer zu entfernen. Der untere Deckel wurde wieder auf die *spin column* gesetzt, 125 µl 50 mM Tris-Puffer (pH 9,0) zugefügt, der obere Deckel geschlossen und das Gefäß für zehn Minuten geschüttelt. Beide Deckel wurden wieder entfernt und die *spin column* im Reaktionsgefäß für 30 Sekunden bei etwa 80 x g zentrifugiert, um den Puffer zu entfernen. Diese Waschschrte mit Tris-Puffer wurden noch zweimal wiederholt. Der untere Deckel wurde wieder geschlossen, 125 µl Puffer U1 hinzugefügt, der obere Deckel verschlossen und das Gefäß für zehn Minuten gevortext. Beide Deckel wurden wieder entfernt und die *spin column* im Reaktionsgefäß für 30 Sekunden bei etwa 80 x g zentrifugiert, um den Puffer zu entfernen. Auch diese Waschschrte mit Puffer U1 wurden noch zweimal wiederholt. Nachdem der untere Deckel wieder geschlossen wurde, wurden 100 µl der verdünnten Probenlösung zugegeben, der obere Deckel verschlossen und das Gefäß für 20 Minuten gevortext. Beide Deckel wurden wieder entfernt und die *spin column* in einem neuen Reaktionsgefäß für 30 Sekunden bei etwa 80 x g zentrifugiert. Der Durchfluß

entsprach einem Teil der ersten Fraktion. Der untere Deckel wurde wieder geschlossen, 100 µl Waschpuffer 1 wurden hinzu gegeben, der obere Deckel verschlossen und das Gefäß für zehn Minuten gevortext. Beide Deckel wurden wieder entfernt und die *spin column* in einem neuen Reaktionsgefäß für 30 Sekunden bei etwa 80 x g zentrifugiert. Der Durchfluß wurde mit dem vorherigen vereint und ergab zusammen Fraktion 1 (pH 9). Nachdem der untere Deckel wieder verschlossen wurde, wurden 100 µl Waschpuffer 2 hinzugefügt, der obere Deckel geschlossen und das Gefäß für zehn Minuten gevortext. Beide Deckel wurden wieder entfernt und die *spin column* in einem neuen Reaktionsgefäß für 30 Sekunden bei etwa 80 x g zentrifugiert. Diese Vorgänge wurden noch einmal mit Waschpuffer 2 wiederholt und die Durchflüsse beider Waschschrte zur Fraktion 2 (pH 8) vereint. Diese beiden Waschschrte wurden jeweils mit den übrigen Waschpuffern 3-6 (pH 7, pH 5, pH 3 und organischer Waschpuffer) wiederholt und die Durchflüsse jeweils für die entsprechenden Fraktionen 3-6 vereint. Die Fraktionen mußten vor der 2D-SDS-PAGE noch mittels Methanolfällung aufgereinigt werden (vergleiche hierzu Abschnitt 2.3.5.3).

2.3.3.4 2-D Fractionation Kit

Für die Fraktionierung wurde das 2-D Fractionation Kit (Amersham Biosciences/ GE Healthcare, #80-6501-04) weitestgehend nach den Angaben des Herstellers verwendet. Vor Beginn wurde der Lysepuffer auf Eis gelagert und der *Solubilizer* Buffer frisch angesetzt. Hierzu wurde das Gefäß mit dem *Solubilizer* Pulver 10-15 Sekunden lang geschüttelt. Um 2 ml Puffer zu erhalten, wurden 1g Pulver abgewogen und 1,1 ml Diluent zugefügt. Die Lösung wurde immer wieder gevortext bis sie klar erschien. Zwei Zellsedimente wurden zunächst in 500 µl Lysepuffer aufgenommen und für zehn Minuten bei 4°C gevortext. Für das Serum wurden zunächst zweimal je 100 µl mittels Methanolfällung (vergleiche Abschnitt 2.3.5.3) aufkonzentriert, die Sedimente in je 250 µl Lysepuffer aufgenommen, für 45 Minuten bei 4°C gevortext und dann vereint. Das Reaktionsgefäß mit dem Lysat wurde für 30 Minuten mit 20.000 x g bei 4°C zentrifugiert und der Überstand vorsichtig in ein frisches Reaktionsgefäß überführt. Das Pellet wurde in 125 µl Lysepuffer resuspendiert, für 30 Sekunden gevortext und erneut für 30 Minuten mit 20.000 x g bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abpipettiert, mit dem ersten Überstand zur Fraktion der löslichen Proteine vereinigt und bis zur weiteren Verarbeitung auf Eis gelagert. Das Sediment wurde in 500 µl Lysepuffer aufgenommen, für 60 Sekunden gevortext und dann für 15 Minuten mit 20.000 x g bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen und verworfen, das Pellet (unlösliche Proteine) wurde auf Eis bis zur weiteren Verarbeitung gelagert. Von der Fraktion der löslichen Proteine wurden 500 µl in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und 100 µl *Fraction Precipitant* Reagenz tropfenweise zugegeben. Das Reaktionsgefäß wurde verschlossen, mehrmals invertiert, für fünf Minuten auf Eis inkubiert und dann für zehn

Minuten mit 15.000 x g bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde abpipettiert und in ein frisches Reaktionsgefäß gefüllt. Das Pellet wurde erneut für 5-10 Sekunden mit 10.000 x g zentrifugiert und der restliche Überstand mit dem vorherigen vereinigt. Das Sediment stellte die erste Fraktion dar und wurde auf Eis bis zur weiteren Verarbeitung gelagert. Zu dem Überstand wurden jeweils in aufeinander folgenden Schritten zuerst 100 µl, 200 µl, 300 µl und dann 800 µl *Fraction Precipitant* Reagenz gegeben, das Gefäß wurde verschlossen, mehrfach invertiert und für fünf Minuten auf Eis inkubiert. Es folgte zunächst eine Zentrifugation für zehn Minuten bei 4°C mit 15.000 x g. Der Überstand wurde jeweils in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und das Sediment erneut für 5-10 Sekunden mit 10.000 x g zentrifugiert. Der verbliebene Überstand wurde jeweils mit dem Überstand des ersten Zentrifugationsschrittes vereinigt. Die jeweiligen Sedimente ergaben die Fraktionen 2-5, welche bis zu weiteren Verarbeitung auf Eis gelagert wurden, mit dem jeweiligen Überstand wurde weitergearbeitet. Der letzte Überstand wurde in ein Falcon Röhrchen überführt, und es wurden 6 ml *Precipitant* hinzu gegeben. Das Röhrchen wurde verschlossen, mehrmals invertiert und für zehn Minuten auf Eis inkubiert. Danach wurden 3 ml *Co-Precipitant* zugefügt, das Röhrchen wieder geschlossen und gevortext. Nach einer Inkubationszeit von einer Minute wurde das Röhrchen für zehn Minuten bei 4°C mit 8.000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Röhrchen erneut kurz zentrifugiert und der verbliebene Überstand ebenfalls abgenommen und verworfen. Ohne das Sediment zu zerstören wurden 200 µl *Co-Precipitant* zugefügt und das Röhrchen für zehn Minuten bei 4°C mit 8.000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde erneut vorsichtig abpipettiert und verworfen. Dem Pellet wurden 100 µl steriles Wasser zugegeben und das Röhrchen für 30 Sekunden gevortext. Danach wurden 5 ml vorgekühlter Waschpuffer zugefügt und das Röhrchen vier bis fünf Mal für jeweils 30 Sekunden gevortext. Während der anschließenden Inkubationszeit von 30 Minuten bei -20°C wurde das Röhrchen mehrmals gevortext, um das Sediment aufzubrechen. Das Röhrchen wurde dann für zehn Minuten bei 4°C mit 8.000 x g zentrifugiert und der Überstand verworfen. Um das Sediment (Fraktion 6) zu trocknen, wurde das Röhrchen umgekehrt auf ein sauberes Papiertuch gestellt, so daß der restliche Waschpuffer ablaufen konnte. Alle Sedimente der löslichen Proteine (Fraktionen 1-6) sowie das Sediment der unlöslichen Proteine konnten entweder im Anschluß weiter verarbeitet werden oder bei -20°C vorerst gelagert werden. Die Sedimente der löslichen Proteine (Fraktionen 1-6) wurden in 100 µl frisch angesetztem (siehe oben) *Solubilizer* Buffer suspendiert und fünf bis sechs Mal für jeweils 30 Sekunden gevortext. Das Pellet der unlöslichen Proteine wurde in 400 µl *Solubilizer* Buffer aufgenommen, vier bis fünf Mal für je 60 Sekunden gevortext und dann für 15 Minuten bei 15°C mit 20.000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und das verbleibende Sediment mit 100 µl *Solubilizer* Buffer resuspendiert. Nach einer Zentrifugation von 15 Minuten bei

15°C mit 20.000 x g wurde der Überstand mit dem vorherigen vereinigt. Alle sieben Fraktionen mußten vor der 2D-SDS-PAGE mittels Methanolfällung (vergleiche Abschnitt 2.3.5.3) aufgereinigt werden.

2.3.4 Proteinbestimmung aus Urin

Zur Proteinbestimmung aus Urin wurden zunächst verschiedene Standardmethoden der Proteinbestimmung (z.B. BCA-Assay) ausgetestet, die sich jedoch für die Bestimmung des Proteingehaltes im Urin nicht eignen. Dies liegt in der Zusammensetzung des Urins begründet, der Substanzen wie Harnsäure und Kreatinin enthält, die sich störend auf den BCA-Assay auswirken. Daher wurde der Fluitest® (Biocon® Diagnostik, #915) verwendet. Dieser ist speziell für quantitative Bestimmung von Protein in Urin und Cerebrospinalflüssigkeit geeignet. Als Kontrolle diente die Lyphochek® Quantitative Urine Control (Bio-Rad, #375X).

Für die Bestimmung des Proteingehaltes wurde im Photometer ($\lambda = 600 \text{ nm}$) bei Raumtemperatur die Extinktion gegen den Reagenzienleerwert (ΔE) gemessen. Der Reagenzienleerwert entsprach der Extinktion von 1000 μl Reagenz R1. Für die Bestimmung der Extinktion der Probe und des Standards wurden jeweils 20 μl Probe bzw. Standard mit 1000 μl Reagenz R1 in den Küvetten gemischt und nach zehn Minuten im Photometer gemessen. Die Proteinkonzentration des Standards beträgt 100 mg/dl. Somit ließ sich die Proteinkonzentration der Probe nach folgender Formel berechnen:

$$\text{Proteinkonzentration [mg/dl]} = (\Delta E \text{ Probe} / \Delta E \text{ Standard}) \times \text{Standardkonzentration [mg/dl]}$$

2.3.5 Proteinfällung aus Urin

Urin enthält im Normalfall weniger als 150 mg Protein pro Liter [Pschyrembel, 2002] sowie reichlich Störfaktoren wie z.B. Salze, Harnstoff und Harnsäure. Die Anteile der unterschiedlichen organischen Urinbestandteile sind vereinfacht in Grafik 2 (siehe Abbildung 5) zusammengefaßt. Außerdem bestehen nicht nur große Unterschiede im Proteingehalt des Urins zwischen verschiedenen Individuen (interindividuell), sondern auch in Abhängigkeit von Faktoren wie z.B. der Trinkmenge erhebliche Unterschiede bei einem Individuum

(intraindividuell). Um den Proteingehalt auf eine einheitliche Gesamtkonzentration einzustellen sowie die Störfaktoren zu eliminieren, wurde vor der eigentlichen proteomischen Analyse eine Fällung bzw. Aufkonzentrierung der Proteine durchgeführt. Hierzu wurden verschiedene Methoden ausgetestet.

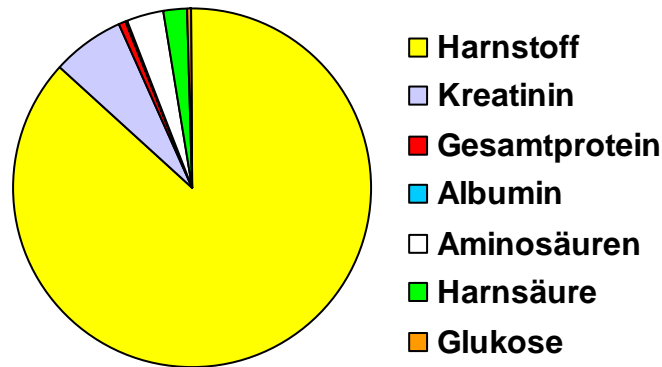


Abbildung 5: Vereinfachte Darstellung der Anteile der unterschiedlichen organischen Urinbestandteile.

2.3.5.1 Zentrifugation

Die zuvor bestimmte Menge an Urin wurde in ein Reaktionsgefäß überführt und für 15 Minuten bei 4°C mit 13.000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde unmittelbar nach der Zentrifugation vorsichtig abgenommen und mit IEF-Probenpuffer (siehe Tabelle 6) sowie Pharmalytes auf die entsprechende Menge aufgefüllt. Das Sediment wurde ebenfalls in der entsprechenden Menge IEF-Probenpuffer (siehe Tabelle 6) und Pharmalytes aufgenommen und durch Schütteln wieder in Lösung gebracht. Die fertigen Proben wurden dann entweder direkt der 2D-SDS-PAGE zugeführt oder bei -20°C eingefroren und gelagert.

2.3.5.2 Acetonfällung

Die zuvor bestimmte Menge an Urin wurde mit dem fünffachen Volumen an Aceton versetzt und gemischt. Zur Präzipitation der Proteine wurde die Probe für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Danach wurde die Probe für 20 Minuten bei 4°C mit 16.000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde unmittelbar nach der Zentrifugation vorsichtig abgenommen und verworfen. Das Sediment wurde unter dem Abzug getrocknet, damit das verbliebene Aceton verdampfen konnte. Im Anschluß wurde das Sediment in der entsprechenden Menge IEF-Probenpuffer (siehe Tabelle 6) und Pharmalytes aufgenommen und durch Schütteln wieder

in Lösung gebracht. Die fertige Probe wurde dann entweder direkt der 2D-SDS-PAGE zugeführt oder bei -20°C eingefroren und gelagert.

2.3.5.3 Methanolfällung

Zur Vorbereitung wurde das Methanol im Gefrierschrank auf -20°C gekühlt. Die zuvor bestimmte Menge an Urin wurde mit dem zehnfachen Volumen an eiskaltem Methanol versetzt und gemischt. Dann wurde die Probe für 30 Minuten bei -20°C inkubiert. Zur Sedimentierung der gefällten Proteine wurde die Probe für 20 Minuten bei 4°C mit $16.000 \times g$ zentrifugiert. Der Überstand wurde unmittelbar nach der Zentrifugation vorsichtig abgenommen und verworfen. Das Sediment wurde an der Luft kurz getrocknet, damit das verbliebene Methanol verdampfen konnte. Im Anschluß wurde das Sediment in der entsprechenden Menge IEF-Probenpuffer (siehe Tabelle 6) und Pharmalytes aufgenommen und durch Schütteln wieder in Lösung gebracht. Die fertige Probe wurde dann entweder direkt der 2D-SDS-PAGE zugeführt oder bei -20°C eingefroren und gelagert.

2.3.5.4 Trichloressigsäure-Fällung

Die zuvor bestimmte Menge an Urin wurde mit dem fünffachen Volumen an 50%iger Trichloressigsäure (TCA) versetzt und gut durchmischt. Dann wurde die Probe für 30 Minuten bei -20°C inkubiert. Zur Sedimentierung der gefällten Proteine wurde die Probe für 20 Minuten bei 4°C mit $16.000 \times g$ zentrifugiert. Der Überstand wurde unmittelbar nach der Zentrifugation vorsichtig abgenommen und verworfen. Das Sediment wurde mit einem Milliliter Aceton überschichtet, erneut für fünf Minuten zentrifugiert und der Überstand verworfen. Dieser Vorgang wurde noch einmal wiederholt. Das nach der letzten Zentrifugation entstandene Sediment wurde unter dem Abzug getrocknet, mit der entsprechenden Menge IEF-Probenpuffer (siehe Tabelle 6) und Pharmalytes versetzt und durch Schütteln wieder in Lösung gebracht. Die fertige Probe wurde dann entweder direkt der 2D-SDS-PAGE zugeführt oder bei -20°C eingefroren und gelagert.

2.3.5.5 2-D Clean-Up Kit

Zur Fällung der Proteine aus dem Urin wurde das 2-D Clean-Up Kit (Amersham Biosciences/ GE Healthcare, #80-6484-51) weitestgehend entsprechend den Angaben des Herstellers verwendet. Die Prozessierung der Proben wurde auf Eis durchgeführt. Zu Beginn wurde die zuvor bestimmte Menge an Urin in ein oder mehrere 1,5 Milliliter Reaktionsgefäße überführt, wobei die Menge pro Gefäß $300 \mu\text{l}$ nicht überschreiten sollte. In das Reaktionsgefäß wurden $300 \mu\text{l}$ *Precipitant* hinzugegeben. Die Probe wurde mittels Vortexen durchmischt und für 15

Minuten auf Eis inkubiert. Danach wurden 300 µl *Co-precipitant* zugefügt, das Gefäß kurz gevortext und für fünf Minuten bei 4°C mit 12.000 x g zentrifugiert. Unmittelbar nach Beendigung der Zentrifugation wurde der Überstand vorsichtig abgenommen. Das Reaktionsgefäß wurde mit dem Sediment nach außen in die Zentrifuge zurückgestellt und erneut kurz zentrifugiert. Die verbliebene Flüssigkeit wurde vorsichtig und komplett abpipettiert. Ohne das Sediment, zu berühren wurde dieses vorsichtig mit 40 µl „co-precipitant“ überschichtet und für fünf Minuten auf Eis inkubiert. Das Reaktionsgefäß wurde mit dem Sediment nach außen in die Zentrifuge überführt und erneut für fünf Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abpipettiert und verworfen. Dem Sediment wurden 25 µl deionisiertes Wasser zugegeben. Durch Vortexen wurde das Sediment vom Rand des Gefäßes gelöst, sollte sich aber nicht vollständig lösen. Danach wurde 1 ml eiskalter Waschpuffer (-20°C) und 5 µl Waschadditiv zugefügt. Es wurde erneut gevortext, wobei sich das Sediment nicht komplett lösen sollte. Das Reaktionsgefäß wurde für mindestens 30 Minuten bei -20°C inkubiert und zwischenzeitlich alle zehn Minuten für 20-30 Sekunden gevortext. Im Anschluß wurde das Gefäß für fünf Minuten bei 4°C mit 12.000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abpipettiert und verworfen. Das Sediment wurde kurz an der Luft getrocknet, mit der entsprechenden Menge IEF-Probenpuffer (siehe Tabelle 6) und Pharmalytes versetzt und durch Schütteln wieder in Lösung gebracht. Die fertige Probe wurde dann entweder direkt der 2D-SDS-PAGE zugeführt oder bei -20°C eingefroren und gelagert.

2.3.5.6 Centrifugal Filter Devices

Zur Fällung der Proteine aus dem Urin wurden die Amicon® Ultra Centrifugal Filter Devices (Millipore, 15 ml, 5K, UFC900524) verwendet. Die entsprechende Menge Urin wurde mit destilliertem Wasser auf insgesamt 15 ml aufgefüllt bzw. mit der gleichen Menge IEF-Probenpuffer (siehe Tabelle 6) versetzt und in die Filtereinheit überführt. Diese wurde dann für 90 Minuten bei 12°C mit 13.000 rpm (Rotordurchmesser 40cm) zentrifugiert. Der konzentrierte Überstand wurde aus der Filtereinheit vorsichtig abpipettiert und mit IEF-Probenpuffer (siehe Tabelle 6) sowie Pharmalytes auf die entsprechende Menge aufgefüllt. Die fertige Probe wurde dann entweder direkt der 2D-SDS-PAGE zugeführt oder bei -20°C eingefroren und gelagert.

2.3.6 Vorbehandlung des formalin-fixierten und paraffin-eingebetteten Gewebes

Von dem in Formalin fixierten und in Paraffin eingebetteten papillär-invasiven Harnblasentumor wurden mit Hilfe eines Mikrotoms ca. 2 µm dicke Schnitte angefertigt und auf spezielle, elektrisch leitfähige Objektträger (*conductive glass slides*, Bruker Daltonics, #237001) aufgezogen und bei Raumtemperatur aufbewahrt.

Vor der weiteren Verarbeitung mußten die Schnittpräparate entparaffiniert werden. Dazu wurden die Paraffinschnitte für ca. 15 Minuten bei 70°C inkubiert, um das Paraffin zu schmelzen und ablaufen zu lassen. Im Anschluß wurden die verbliebenen Reste des Paraffins in einer absteigenden Xylol-Alkohol-Reihe entfernt. Der Objektträger wurde zweimal für zehn Minuten in Xylol und dann für zehn Minuten in 100%igem Ethanol (HPLC *grade*) inkubiert. Danach folgte eine jeweils fünfminütige Inkubation mit 100%igem, 96%igem und 70%igem Ethanol (jeweils HPLC *grade*).

Um die Proteinquervernetzung durch das Formalin soweit wie möglich aufzuheben, wurden im Anschluß an die Entparaffinierung verschiedene Antigendemaskierungstechniken getestet, um auch formalin-fixiertes und paraffin-eingebettetes Gewebe mittels MALDI imaging untersuchen zu können.

2.3.6.1 Xylol

Für die Antigendemaskierung wurde das zuvor beschriebene Entparaffinierungsprotokoll (siehe 2.3.6) abgewandelt. Nach dem ersten Schritt wurde der Objektträger in einem mit Xylol gefülltem 80 ml Schottglas plaziert und für 24 Stunden in einem Wärmeschrank bei 50°C inkubiert. Anschließend wurde die absteigende Alkohol-Reihe fortgesetzt. Zunächst wurde zehn und dann fünf Minuten mit 100%igem Ethanol (HPLC *grade*) inkubiert. Es folgte jeweils eine fünfminütige Inkubation mit 96%igem und 70%igen Ethanol (beides HPLC *grade*).

2.3.6.2 Dampfdrucktopf

Nach Entparaffinierung des Schnittes wurde der Objektträger in eine Plastikkuvette gestellt, welche mit einer Citratpufferlösung (pH 6, siehe Tabelle 4) aufgefüllt wurde.

Tabelle 4: Zusammensetzung des Citratpuffers (pH 6).

Stammlösung A		Stammlösung B	
Zitronensäure	21,01 g	Natrium-Citrat	29,41 g
Aqua bidest. ad	1000 ml	Aqua bidest. Ad	1000 ml

Citratpufferlösung		
Stammlösung A	18	ml
Stammlösung B	82	ml
Aqua bidest. ad	1000	ml
Natronlauge ad pH 6		

In den Dampfdrucktopf wurde soviel Wasser gefüllt, bis der Boden bedeckt war, die Küvette mit dem Objektträger hineingestellt und für ca. 15 Minuten gekocht. Nach dem Abkühlen wurde der Schnitt mit destilliertem Wasser abgespült, um Reste des Citratpuffers zu entfernen.

2.3.6.3 Mikrowelle

Nach der Entparaffinierung wurde der Objektträger in eine mit Citratpuffer (pH 6, siehe 2.3.6.2; Tabelle 4) gefüllte Plastikkuvette platziert. Die Plastikkuvette wurde neben drei weiteren, nur mit Wasser gefüllten Plastikkuvetten in einer Mikrowelle bei 600 Watt für 30 Minuten erhitzt. Es wurde darauf geachtet, daß der Schnitt aufgrund der starken Verdunstung nicht austrocknete. Daher mußte nach spätestens 15 Minuten die Küvette mit dem Objektträger mit Aqua bidest. erneut bis zum Rand aufgefüllt werden. Der Objektträger wurde nach dem Abkühlen mit destilliertem Wasser abgespült.

2.3.6.4 Proteinase K

Der Schnitt wurde nach der Entparaffinierung vollständig mit ca. 250 µl Proteinase K (gebrauchsfertige Lösung, Dako #S 3020) bedeckt und für 6 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde der Objektträger mit destilliertem Wasser abgespült, um die Reaktion zu stoppen.

2.3.6.5 Trypsin

Hierzu wurde eine 0,1%ige Trypsin-Lösung (siehe Tabelle 5) benutzt.

Tabelle 5: Zusammensetzung der 0,1% Trypsinlösung.

0,1% Trypsin-Lösung		
NaCl	800	mg
Tris	600	mg
Aqua bidest. ad	100	ml
Trypsin	100	mg
CaCl ₂	100	mg

Auf den entparaffinierten Schnitt wurden 300 µl dieser 0,1%igen Trypsinlösung verteilt und für acht Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Reaktion wurde gestoppt, indem der Objektträger mit destilliertem Wasser abgespült wurde.

2.3.6.6 Antigen retrieval Kit

Zur Antigendemaskierung wurde das Antigen retrieval kit (abcam #8212) entsprechend den Empfehlungen des Herstellers verwendet. Zuerst wurden 2 ml der Verdünnungslösung in ein Reagenzglas pipettiert, sechs Tropfen des Enzymkonzentrats mit einer Einmalpipette hinzugegeben und gemischt. Auf dem entparaffinierten Schnitt wurde diese Lösung verteilt, so dass der Schnitt vollständig bedeckt war. Nach 15 minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde der Objektträger zunächst mit PBS Puffer und danach mit destillierten Wasser gewaschen.

4.4 Zweidimensionale Gelelektrophorese

4.1.5 Probenvorbereitung des Gewebes und der Zellen

Direkt im Anschluss an die Mikrodissektion bzw. die Fraktionierung der Zellsedimente wurden die gesammelten Proben mit dem Probenpuffer für die isoelektrische Fokussierung (IEF-Probenpuffer) versetzt. Die Zusammensetzung des Puffers zeigt Tabelle 6.

Tabelle 6: Zusammensetzung des IEF-Probenpuffers.

IEF Probenpuffer		
Mengenangaben für:		100 ml
Urea	7M	42 g
aqua bidest		40 ml
Auflösen		
Thiourea	2M	15,2 g
CHAPS	4%	4 g
MEGA10	1%	1 g
OBG	1%	1 g
Triton X100	0,50%	500 µl
DTT	50mM	0,8 g
b-Mercaptoethanol	0,50%	500 µl
Tributylphosphin	2mM	20 µl
etwas Bromphenolblau		
auffüllen auf		100 ml

Der IEF-Probenpuffer wurde zuvor in großen Mengen vorbereitet, in Kryoröhrchen à 2000 µl aliquotiert und bei -20°C aufbewahrt. Die benötigte Menge an IEF-Probenpuffer wurde nach Bedarf aufgetaut. Dabei war darauf zu achten, daß dem IEF-Probenpuffer keine Wärme zugeführt wurde. Der im Puffer enthaltene Harnstoff steht mit Ammoniumisocyanat im Gleichgewicht. Durch Wärmezufuhr über 37°C wird dieses Gleichgewicht zu Gunsten des Ammoniumisocyanates verschoben. Das Ammoniumisocyanat ist in der Lage Proteinmodifikationen zu verursachen und störend auf die Trennung der Proteine einzuwirken. Jeder Probe wurden 130 µl bzw. 1450 µl IEF- Probenpuffer und 0,65 µl bzw. 2,5 µl Pharmalytes (Amersham Biosciences/ GE Healthcare, #17-6004-40) zugefügt.

Fundamentale Schritte der Probenvorbereitung von mikrodisssektierten Gewebeproben, die durch die Zugabe von einer geringen Menge Glassperlen und dem IEF-Probenpuffer erreicht werden, bestehen aus der Rupturierung, der Inaktivierung sowie Entfernung störender Substanzen und der Proteindenaturierung sowie Solubilisierung.

Zur Rupturierung der Zellen wurden kleine Glassperlen, die der Probe mit dem IEF-Probenpuffer zugefügt wurden, verwendet. Das Proben-Puffer-Glassperlen-Gemisch wurde dann für ca. zwei Stunden bei 4°C geschüttelt. Durch das Schütteln werden die Glassperlen gegeneinander gerieben und funktionieren wie Mahlsteine, die das Zellmaterial zerkleinern. Alle Bestandteile und somit auch die Proteine der Zelle wurden durch diesen Prozess freigesetzt und mit dem Probenpuffer gut durchmischt. Ein minimaler Abrieb der Glasperlen ist hierbei zu vernachlässigen, da dieser chemisch inert und im Puffer unlöslich ist.

Während und nach der Ruptur der Zellen müssen störende und die Proteintrennung beeinflussende Substanzen inaktiviert oder entfernt werden. Neben den zwei wichtigsten Störfaktoren, Salzen und proteolytischen Enzymen, werden bei der Ruptur auch Nukleinsäuren und Polysaccharide freigesetzt. Um die störenden Einflüsse zu minimieren, wurde das Lysat stark zentrifugiert und nur der Überstand weiter verwendet.

Die Probe enthält eine Vielzahl unterschiedlichster Proteine. Jedes Protein ist durch seine individuelle Konformation gekennzeichnet. Sie liegen meist in Form von wasserunlöslichen, kugelförmigen Konformationen vor. Für die 2D-Gelelektrophorese ist es notwendig, dass die Proteine in denaturierter Form vorliegen. Um die Proteine in Lösung bringen zu können, müssen die verschiedenen Kräfte, die die Raumstruktur der Proteine bedingen, zuvor überwunden werden. Diese Raumstruktur wird durch das Zusammenspiel von Wasserstoffbrückenbindungen, hydrophoben Wechselwirkungen, Ionenbindungen und Disulfidbindungen gebildet. Die Überwindung dieser Kräfte ist die Aufgabe der im Probenpuffer enthaltenen Reduktionsmittel und Detergenzien. Störende intramolekulare und intermolekulare Proteininteraktionen werden durch die Lyse aufgehoben. Im Idealfall liegen nach der Lyse alle Proteine vollständig gelöst und denaturiert vor.

Nach Abschluss der Probenvorbereitung wurden die Zelllysate direkt für die Erste Dimension (=isoelektrische Fokussierung) verwendet oder bei -20°C bis zur Weiterverarbeitung aufbewahrt.

4.1.6 Isoelektrische Fokussierung („Erste Dimension“)

Die „Erste Dimension“ der 2D-SDS-PAGE ist die sogenannte isoelektrische Fokussierung (IEF). Sie ist ein elektrophoretisches Trennverfahren, bei dem die einzelnen Proteine basierend auf Unterschieden in ihren isoelektrischen Punkten (IP) getrennt werden. Dieser ist für jedes Protein charakteristisch und wird durch seine Struktur bedingt. Durch die Einwirkung eines elektrischen Feldes wandern die Proteine gemäß ihrer Ladung durch einen pH-Gradienten im Gel. Dabei verändert sich die Ladung der Proteine in Abhängigkeit des umgebenden pH-Wertes. Hat ein Protein den pH-Wert erreicht, der seinem IP entspricht, ist die Nettoladung des Proteins und somit auch ihre Wanderungsgeschwindigkeit Null. Die IEF ist im Gegensatz zu anderen elektrophoretischen Trennverfahren eine sogenannte Endpunkt-Methode. Die Wanderungsstrecke ist nur vom isoelektrischen Punkt und nicht von der Zeit abhängig. Des Weiteren kommt es bei der IEF zu einem Konzentrierungseffekt der Proteine an ihrem isoelektrischen Punkt. Diffundiert ein Protein von seinem IP, erhält es

sofort eine Ladung und wird durch die Einwirkung des elektrischen Feldes zu seinem isoelektrischen Punkt zurücktransportiert.

Zur Durchführung der „Ersten Dimension“ wurde die IPG-Phor Einheit (Amersham Biosciences/ GE Healthcare) verwendet. Der erste Schritt der IEF ist die Rehydrierung, bei der die gefriergetrockneten Gelstreifen (Immobiline DryStrip 7 bzw. 24 cm; pH 3-11 NL; Amersham Biosciences/ GE Healthcare, #17-6003-73 bzw. #17-6003-77) rehydriert werden. Hierzu wurde die sogenannte *sample in gel rehydratation* Methode verwendet, bei der die Gelstreifen mit Probe und Pufferlösung gleichzeitig rehydriert wurden. Zur Vorbereitung der Rehydrierung wurde der Gelstreifenhalter (Plastik, 12 Vertiefungen) zunächst mit einer Reinigungsflüssigkeit gründlich gereinigt und dann an der Luft getrocknet. Die Proben und Gelstreifen wurden aus dem Gefrierschrank (-20°C) genommen und bei Raumtemperatur aufgetaut. Nach vollständigem Trocknen der Gelstreifenhalter wurden 130 µl (für die 7 cm Streifen) bzw. 450 µl (für die 24 cm Streifen) der in IEF-Puffer gelösten Probe über die jeweilige Länge einer Vertiefung des Gelstreifenhalters pipettiert. Dabei wurde darauf geachtet, daß die Lösung sich möglichst homogen verteilte. Nachdem von den aufgetauten Gelstreifen die Schutzfolie entfernt wurde, wurden diese mit der Gelseite nach unten und ohne Einschluss von Luftblasen in den Gelstreifenhaltern platziert. Um einen Luftabschluss zu erreichen und so die Gelstreifen vor dem Austrocknen zu bewahren, wurden sie mit IEF-Öl (Dry Strip Cover Fluid, Amersham Biosciences/ GE Healthcare, #17-1335-01) beschichtet und der Gelstreifenhalter mit dem Schutzdeckel verschlossen. Während einer Rehydrierungszeit von 12-16 Stunden wurde die Lösung komplett vom Gelstreifen aufgenommen. Im Anschluß folgte die eigentliche IEF unter Benutzung des Ettan IPGphor Manifold (Amersham Biosciences/ GE Healthcare). Dieser besteht aus einem keramischen Gelstreifenhalter für zwölf Gelstreifen. Die rehydrierten Gelstreifen wurden mit der Gelseite nach oben und orientiert in die Vertiefungen des Manifold gelegt und mit Öl überschichtet. Auf jeden Gelstreifen wurden an deren Enden kleine, befeuchtete Papiertupfer (*Paper bridge pads*, Amersham Biosciences/ GE Healthcare, #80-6499-33) gelegt, die den Kontakt zwischen Gel und Elektroden sicherstellen sollten. In Höhe der Papiertupfer wurden die Elektroden angebracht. Die Klappe des IPG-Phor wurde geschlossen und das ausgewählte Programm gestartet. Die Programmdetails zeigt Tabelle 7, pro Streifen wurden 50 µA appliziert und die Streifen bei 21°C gehalten.

Tabelle 7: Programmdetails der Isoelektrischen Fokussierung.

Programm der IEF		
	Dauer [h]	
350 V	2	
500 V	0,5	Gradient
3500 V	6	Gradient
3500 V	30	Step and hold

Nach Beendigung des IEF-Programms wurden mit einer Pinzette die Gelstreifen am freien Ende aus dem Gelstreifenhalter gehoben. Das überschüssige IEF-Öl wurde durch Abspritzen mit deionisiertem Wasser entfernt. Die Gelstreifen wurden entweder direkt weiter verwendet oder bis zu ihrem Gebrauch bei -80°C gelagert.

4.1.7 SDS-PAGE („Zweite Dimension“)

In der „Zweiten Dimension“ der 2D-Gelelektrophorese werden die Proteine nach ihrem Molekulargewicht in einem Natriumdodecylsulfat (SDS) haltigen Polyacrylamidgel (PAGE) getrennt. SDS ist ein anionisches Detergenz, welches die Proteine vollständig durch die Ausbildung negativ geladener SDS-Protein-Micellen umhüllt. Das Ausmaß der negativen Ladung ist von der Molekülmasse des Proteins abhängig, wobei ein konstantes Verhältnis zwischen dem bindendem SDS und der Molekülmasse des Proteins besteht. Die Wanderungsgeschwindigkeit und -strecke des SDS-Protein-Komplexes ist abhängig von deren Größe. Sie wird aber auch von der Porengröße des Gels beeinflusst. Da Polyacrylamidgele mit Gradienten verwendet wurden, nahm die Polyacrylamid-Konzentration in Laufrichtung von 9% auf 18% zu und die Porengröße konsekutiv ab. Es wurde ein Elektrophorese-System in vertikaler Anordnung verwendet (für die kleinen Gele: X-Cell Surelock, Invitrogen; für die großen Gele: Ettan Dalt twelve vertical, Amersham Biosciences/ GE Healthcare).

Die kleinen Gele (10 x 10 cm) wurden von der Firma Invitrogen (Novex[®] 4-20% Tris-Glycine ZOOM[®] Gel, #NP00330BOX) bezogen, die großen Gele (20 x 24 cm) wurden selbst hergestellt. Hierfür wurden als erstes 12 Glasplattenpaare (Amersham Biosciences/ GE Healthcare; jeweils eine Glasplatte mit Abstandhalter und eine normale Glasplatte) mit Reinigungslösung und einem Schwamm gründlich gereinigt. Danach wurden sie zum entfernen von Seifenresten mit destilliertem Wasser abgespült und zum Trocknen an der Luft auf Ständern positioniert. Die getrockneten Glasplatten wurden unter dem Abzug mit

PlusOne Repel-Silan ES (Amersham Biosciences/ GE Healthcare, #17-1332-01) benetzt und erneut luftgetrocknet. Als nächstes wurden sie zuerst mit 70% Ethanol und danach mit Wasser abgespült, um einem Ankleben der Gele am Glas entgegenzuwirken. Die Glasplattenpaare wurden zusammengesetzt, und am rechten unteren Rand zwischen beiden Platten wurde ein Label zur Kennzeichnung der einzelnen Gele geklebt. Alle 12 Glasplattenpaare wurden zusammen in die Gelgießkassette (Amersham Biosciences/ GE Healthcare; später Prototyp der Proteomics Core Facility in Zusammenarbeit mit den wissenschaftlichen Werkstätten des UKA) gelegt, wobei zwischen zwei Glasplattenpaaren jeweils eine Trennscheibe aus Plastik positioniert wurde. Nach Beendigung des Befüllens wurde die Gelgießkassette fest verschlossen, so daß alle Platten dicht aneinander gedrückt wurden.

Für die Herstellung der Polyacrylamid-Lösung wurde zunächst eine 30%ige Polyacrylamid-Lösung frisch angesetzt. Dazu wurden unter dem Abzug und unter Benutzung einer Schutzbrille 146g Acrylamid-Trockenpulver (BioRad) und 4g PDA (Piperazin Diacrylamid, BioRad) in ein Becherglas gegeben und bis 500ml mit Aqua bidest. aufgefüllt. Unter ständigem Rühren mittels eines Magnetrührers wurde das Pulver aufgelöst. Im Anschluß wurde die Lösung mit einer sterilen Filtrationseinheit (Nunc) filtriert (Filterporen: 0,45 µm). Für die 10%ige Ammoniumpersulfat-(APS)-Lösung wurden 0,4g APS-Trockenmasse mit 3600 µl Aqua bidest. gemischt. Die Zusammensetzung der 9%igen und 18%igen Polyacrylamid-Lösung zeigt Tabelle 8.

Tabelle 8: Zusammensetzung der Polyacrylamid-Lösung.

PAA-Lösung		
Mengenangaben für 12 Gele:	9%	18%
1.5 M Tris, pH=8.8	119,2 ml	119,2 ml
SDS 20%	2,4 ml	2,4 ml
PAA stock, 30%	145,1 ml	290,2 ml
Aqua bidest.	207,3 ml	62,2 ml
TEMED	241,8 µl	0,0 ml
10% APS	1212,5 µl	606,3 µl

Im nächsten Schritt wurde die vorbereitete Gelgießkassette an den Gradientengießler (BioRad) und die Pumpe angeschlossen. Der Gradientengießler wurde zunächst mit Wasser gefüllt und die Pumpe eingeschaltet. Die Gelgießkassette wurde bis zum Markierungsstrich mit Isopropanol befüllt, welches einen Luftabschluß über den Gelen bildete und somit eine glatte Gelkante bewirkte. Der Rest des Wassers wurde verworfen und das Ventil zwischen den beiden Kammern des Gradientengießlers geschlossen. Die rechte Kammer des Gradientengießlers wurde mit der 18%igen, die linke mit der 9%igen Polyacrylamid-Lösung

befüllt. In die linke Kammer wurde ein Magnetfisch hinzugefügt und der Gradientengießler über einem Magnetrührer positioniert. Durch Einschalten der Pumpe wurde zunächst die 9%ige Polyacrylamid-Lösung in die Gelgießkassette gepumpt. Nach Abfließen von 1/10 der 9%igen Polyacrylamid-Lösung wurde das Ventil zwischen beiden Kammern geöffnet, so daß eine Durchmischung der beiden Lösungen stattfinden konnte. Am Ende des Befüllens wurde der Zufluß zwischen Gradientengießler und Gelgießkassette abgeklemmt, damit keine Luftblasen in die Gelgießkassette gepumpt wurden. Zum Schutz vor Verdunstung wurde die Gelgießkassette mit Frischhaltefolie abgedeckt und die Gele zur Polymerisation über Nacht bei Raumtemperatur ruhen gelassen.

Zur Vorbereitung der „Zweiten Dimension“ mussten die Gelstreifen zunächst mit zwei verschiedenen Äquilibrierungspuffern (siehe Tabelle 9) inkubiert werden.

Tabelle 9: Zusammensetzung der Äquilibrierungspuffer.

Äquilibrierungspuffer I		Äquilibrierungspuffer II	
Mengenangaben für:	50 ml	Mengenangaben für:	50 ml
Urea	18 g	Urea	18 g
TRIS, 0,5 M, pH=6,9	10 ml	TRIS, 0,5 M, pH=6,9	10 ml
auflösen		auflösen	
SDS, 20%ig	10 ml	SDS, 20%ig	10 ml
DTT	0,2 g	Iodoacetamid	5 g
Glycerin	15 ml	Glycerin	15 ml
etwas Bromphenolblau		etwas Bromphenolblau	

Diese wurden jeweils in größeren Mengen vorbereitet und à 50 ml eingefroren (-80°C). Je ein Gefäß mit Puffer I und II wurde aus dem Gefrierfach genommen und bei Raumtemperatur im Wasserbad aufgetaut. Die Glaszylinder bzw. Probenröhrchen mit den Gelstreifen wurden ebenfalls aus dem Gefrierfach genommen. Der obere Gummistopfen bzw. die Verschlusskappe wurde entfernt und die Glaszylinder bzw. Probenröhrchen jeweils mit 8 ml bzw. 4 ml des Äquilibrierungspuffers I gefüllt. Die Gefäße wurden wieder verschlossen, mit den Gelstreifen nach unten auf einen Schüttler gelegt und für 30 Minuten langsam geschwenkt, so daß der Gelstreifen vollständig benetzt wurde. Nach Ablauf der 30 Minuten wurden die Gefäße wieder geöffnet und der Äquilibrierungspuffer I dekantiert. Danach wurden jeweils 8 ml bzw. 4 ml des Äquilibrierungspuffer II zu den Gelstreifen hinzugefügt und wieder für 30 Minuten unter Schwenken inkubiert. Durch das Äquilibrieren wurde erstmals SDS zugefügt, welches den Übertritt der Proteine von den Gelstreifen in das Polyacrylamidgel verbessert.

Zwölf Reaktionsgefäße mit aliquotierter 0,5%iger Agarose (Amersham Biosciences/ GE Healthcare, #17-0554-02) wurden im Heizblock bei 95°C erhitzt und dadurch verflüssigt. In

der Zwischenzeit wurden im Falle der großen Streifen die fertig polymerisierten Gele aus der Gelgießkassette genommen, überflüssige Reste des Polyacrylamidgel mit Wasser entfernt und in einen Ständer gestellt. Im Falle der kleinen Streifen wurden die Gele aus der Verpackung entfernt, kurz mit Aqua dest. abgespült und in einen Ständer gestellt. Um einem Austrocknen der Gele entgegenzuwirken, wurde die Oberkante der Gele immer wieder mit dem vorher 1:10 verdünnten Elektrophoresepuffer (Zusammensetzung der 10x konzentrierten Lösung siehe Tabelle 10) benetzt. Auch die Elektrophoresekammer wurde mit Laufpuffer befüllt und dieser gut durchgemischt.

Tabelle 10: Zusammensetzung des konzentrierten (10x) Elektrophoresepuffers.

Elektrophoresepuffer (10x Stock)		
Mengenangaben für:		1 l
TRIS	0,25 M	30,25 g
Glycin	1,92 M	144 g
SDS	1 M	288 g

Nach der Inkubationszeit wurde der Äquilibrationpuffer II abgekippt und die Gelstreifen jeweils mit Hilfe einer Pinzette aus den Gefäßen genommen. Die Gelstreifen wurden dann jeweils mit der Gelseite nach vorne und dem Plus nach links auf die Oberkante der Polyacrylamidgele gelegt. Die Gelstreifen wurde dann mit flüssiger Agarose überschichtet. So wurden ein Luftabschluß und eine Fixierung der Gelstreifen gewährleistet. Die fertig vorbereiteten Polyacrylamidgele wurden in die Elektrophoresekammer überführt und der Deckel verschlossen. Die großen Gele wurden über Nacht bei 65 V und 90 mA laufen gelassen. Im Falle der kleinen Gele ging der Lauf über etwa 1,5 Stunden bei 125V und 25 mA pro Gel.

Wenn die Bromphenolblaufront die untere Kante des Polyacrylamidgels erreicht hatte, war die „Zweite Dimension“ beendet. Die Polyacrylamidgele wurden aus der Elektrophoresekammer genommen, aus den Glas- bzw. Plastikplatten herausgelöst und zur Fixierung in zwei Edelstahlwannen mit durchlöcherterem Edelstahlinsatz bzw. in Plastikwannen überführt. Diese Wannen wurden vorher mit je 1,5 Litern bzw. je 100 Millilitern Fixierungslösung (siehe Tabelle 11) gefüllt.

Tabelle 11: Zusammensetzung der Fixierungslösung.

Fixierungslösung			
Mengenangaben für:	100 ml	1 l	3 l
Ethanol	50 ml	500 ml	1500 ml
Essigsäure	10 ml	100 ml	300 ml
Aqua bidest.	40 ml	400 ml	1200 ml

Die Wannen mit den Polyacrylamidgelen wurden dann für eine halbe Stunde auf den Schüttler gestellt und unter leichtem Schwenken inkubiert.

Nach der Fixierung der Proteine im Polyacrylamidgel schloß sich die Visualisierung der Proteine mittels einer Fluoreszenzfärbung mit SYPRO Ruby Gel stain (Invitrogen, #S21900) an. Hierzu wurde die Färbelösung 1:3 mit Aqua bidest. verdünnt. Im Falle der großen Gele wurden je 1,5 Liter verdünnte Färbelösung in zwei frische Wannen gefüllt und die Gele mittels des Locheinsatzes in diese überführt. Im Falle der kleinen Gele wurde je Schale 100 Milliliter verdünnte Färbelösung benutzt. Die Gefäße über Nacht auf einen Schüttler gestellt und mit Alufolie abgedeckt, um ein Ausbleichen zu verhindern.

Vor dem Scannen am nächsten Tag wurden die Gele für eine Stunde in Aqua bidest. gewaschen, um die Hintergrundfluoreszenz zu reduzieren. Das Scannen erfolgte an einem konfokalen Fluoreszenzlaserscanner (Typhoon 9410 Variable Mode Imager, Amersham Biosciences/ GE Healthcare) mit einer Auflösung von 100 µm (große Gele) bzw. 50 µm (kleine Gele). Dafür wurde die Typhoon Software entsprechend den Angaben des Herstellers verwendet. Im Anschluß wurden die Gele entweder verworfen oder in mit Vorratslösung (siehe Tabelle 12) gefüllten Vorratsdosen überführt. Die Gele wurden auf diese Weise im Dunkeln bei 4°C bis zur weiteren Nutzung gelagert.

Tabelle 12: Zusammensetzung der Vorratslösung.

Vorratslösung	
Mengenangaben für:	1 l
Methanol, 10%ig	100 ml
Essigsäure, 10%ig	100 ml
Aqua bidest.	800 ml

4.5 Massenspektrometrie

Alle experimentellen Schritte wurden in einem Raum durchgeführt, welcher durch eine gesonderte Klimaanlage klimatisch feinreguliert (21 +/- 0,5°C, 40 +/-1% Luftfeuchtigkeit) wurde. Neben der thermischen Konstanz der MS-Flugröhre bewirkte dies eine konstante Inkubation der Lösungen auf den chromatographisch aktiven Oberflächen und insbesondere eine reproduzierbare Kristallisation der Matrix. Für alle Reaktionsschritte wurden generell nur hochreine Chemikalien verwendet, für Flüssigkeiten entsprechend ausschließlich HPLC-grade.

4.1.8 MALDI-TOF-MS

Von dem mittels magnetischen Beads fraktionierten Serum (vergleiche 4.1.4) wurde pro Spot 1 µl Probe auf das *target* aufgetragen. Dabei wurden die Proben in technischen Replikaten aufgetragen, um Ergebnisfehler bedingt durch Fehler in der kritischen Präparation des *targets* zu vermeiden bzw. zu minimieren. Nach dem Trocknen der Probe wurde 1µl Matrix-Lösung auf jeden Spot pipettiert. Als Matrix wurde eine gesättigte Lösung aus 4-Hydroxy-3,5-dimethoxycinnamic acid (CHCA, Sigma, nach spezieller Aufreinigung) in 50% Acetonitril und 0,5% TFA benutzt. Nach dem Trocknen des *targets* erfolgte die Messung an einem MALDI-TOF-MS (Reflex IV, Bruker Daltonics) unter Verwendung der Software FlexControl 2.4 (Bruker Daltonics). Die Parameter des Meßprotokolls lauteten: Ionenquelle 1: 20,00 kV; Ionenquelle 2: 17,70 kV; Linse 9.80; *linear mode*; *pulsed ion extraction* 200 ns; *matrix suppression* bis zu 1.000 Da; *mass range* 1.000 – 20.000 Da; *electronic gain* 100 mV; *sample rate* 1,00 GS/s; Laserintensität 34%; *warming positions* mit Laserintensität 37%. Pro Spot wurden jeweils 400 zufrieden stellende Schüsse zu einem Spektrum addiert.

4.1.9 SELDI-TOF-MS

Mittels der SELDI-TOF-MS wurden zum einen Serumproben und zum anderen Urinproben analysiert. Für beide Probenarten fanden ProteinChips mit einer anionischen Oberflächenchemie (ProteinChip CM10 Arrays, CIPHERGEN/ BioRad, #C57-30075) Anwendung. An dieser Oberfläche binden vor allem Proteine mit positiven Ladungen z.B. über Lysin-, Arginin- und Histidinreste. Aufgrund der deutlichen Unterschiede beider

Probenarten wurden jedoch zwei verschiedene Protokolle für die Präparation der ProteinChips verwendet. Die Präparation der Proteinchips erfolgte unter Einbeziehung des sogenannten Bioprozessors. Dieser bildet um jeden einzelnen Spot auf der Chipoberfläche einen flüssigkeitsdichten Verschluss, so daß mit größeren Volumina pro Spot gearbeitet werden kann.

4.1.9.1 ProteinChip-Präparation für Serum

Vor der Probenapplikation mußte der ProteinChip zunächst vorbehandelt werden. Dazu wurde dieser in ein 15 ml Probenröhrchen überführt, welches mit etwa 6 ml 10 mM HCl gefüllt und für fünf Minuten auf einem rotierenden Schüttler inkubiert wurde. Danach folgten zwei Waschvorgänge mit je etwa 6 ml autoklaviertem Wasser für jeweils eine Minute und zwei Waschvorgänge mit je etwa 6 ml 10 mM Ammoniumacetat (0,1% Triton X100) für jeweils fünf Minuten. Der ProteinChip wurde aus dem Gefäß genommen und an der Luft getrocknet. Der vollständig getrocknete ProteinChip wurde in den Bioprozessor eingespannt. Von jeder Serumprobe wurden 5 µl mit 45 µl 10 mM Ammoniumacetat verdünnt und dann auf den Spot aufgetragen. Der Bioprozessor wurde in einer feuchten Kammer für 20 Minuten auf einem Thermomixer (600 rpm) inkubiert. Danach wurde der Inhalt verworfen und jeder Spot bzw. jede Kavität dreimal mit jeweils 50 µl PBS und im Anschluß dreimal mit jeweils 50 µl Wasser gewaschen. Zwischen den einzelnen Waschschritten wurde der Inhalt jeweils verworfen und der Bioprozessor durch Ausklopfen auf einen Stapel Papiertücher von Flüssigkeitsresten befreit. Nach Beendigung der Waschschriffe wurde jede Kavität zudem vorsichtig, ohne den Spot direkt zu berühren, mit einer Pipettenspitze, die an eine Vakuumpumpe angeschlossen war, vollständig getrocknet. Der Bioprozessor wurde entfernt und der ProteinChip an der Luft weiter getrocknet. In der Zwischenzeit wurden die EAM- (*energy absorbing molecule*) und die Matrix-Lösung angesetzt. Für die EAM-Lösung wurden 2500 µl Wasser und 25 µl TFA gemischt. Die Lösung wurde kurz gevortext, es wurden 2475 µl Acetonitril zugegeben und erneut kurz gevortext. Die EAM-Lösung konnte im Dunkeln bei Raumtemperatur stabil für eine Woche aufbewahrt werden. Für die Matrixlösung wurden zunächst etwa 7 mg Matrixpulver abgewogen, dieses in 200 µl EAM-Lösung aufgenommen, gevortext und für drei Minuten bei 14.000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abpipettiert und in ein frisches Reaktionsgefäß überführt. Pro Spot wurden zweimal je 0,8 µl Matrix-Lösung aufgetragen, wobei zwischen beiden Applikationen die Matrix-Lösung erst trocknen mußte bevor mit der zweiten Applikation begonnen werden konnte. Die Spotoberfläche durfte dabei nicht mit der Pipettenspitze berührt werden. Der ProteinChip konnte nach dem endgültigen Trocknen der Matrix im SELDI-Massenspektrometer analysiert werden.

4.1.9.2 ProteinChip-Präparation für Urin

Aufgrund der bereits beschriebenen deutlichen Unterschiede in der Proteinkonzentration des Urins (vergleiche auch 2.3.5) wurde zunächst von jeder Probe der Gesamtproteingehalt mittels des Fluitest[®] (vergleiche 2.3.4) bestimmt. Die einem Proteingehalt von 1 µg entsprechende Menge an Urin wurde mit 100 mM Natriumacetat-Puffer (0,02% Triton X-100, pH 4,5) auf insgesamt 50 µl aufgefüllt. Zu Beginn wurden der ProteinChip in ein 15 ml Probenröhrchen überführt und zweimal mit je etwa 6 ml 100 mM Natriumacetat-Puffer für fünf Minuten auf einem rotierenden Schüttler inkubiert. Der ProteinChip wurde aus dem Gefäß genommen und an der Luft getrocknet. Der vollständig getrocknete ProteinChip wurde in den Bioprozessor eingespannt und auf jeden Spot 50 µl der Probe aufgetragen. Der Bioprozessor wurde in einer feuchten Kammer für 30 Minuten auf einem Thermomixer (600 rpm) inkubiert. Danach wurde der Inhalt verworfen und jeder Spot bzw. jede Kavität dreimal mit jeweils 50 µl 100 mM Natriumacetat-Puffer und im Anschluß zweimal mit jeweils 50 µl Wasser gewaschen. Zwischen den einzelnen Waschschrritten wurde der Inhalt jeweils verworfen und der Bioprozessor durch Ausklopfen auf einen Stapel Papiertücher von Flüssigkeitsresten befreit. Nach Beendigung der Waschschrritte wurde jede Kavität zudem vorsichtig, ohne den Spot direkt zu berühren, mit einer Pipettenspitze, die an eine Vakuumpumpe angeschlossen war, vollständig getrocknet. Der Bioprozessor wurde entfernt und der ProteinChip an der Luft weiter getrocknet. Die EAM- und Matrix-Lösung wurden wie in Abschnitt 4.1.9.1 beschrieben hergestellt. Auf jeden Spot wurden vorsichtig zweimal je 0,8 µl Matrix-Lösung pipettiert, ohne den Spot mit der Pipettenspitze zu berühren. Die zweite Applikation der Matrix durfte erst erfolgen, nachdem die erste getrocknet war. Nach dem endgültigen Trocknen der Matrix konnte der ProteinChip im Massenspektrometer analysiert werden.

4.1.9.3 Analyse der ProteinChips im SELDI-TOF-MS

Die Messung der ProteinChips erfolgte in einem PBS IIc Massenspektrometer (Ciphergen) nach folgendem Messprotokoll: Höchste Masse 20000 Dalton, optimiert für 2000 bis 20000 Dalton; beginnen mit Laserintensität 170 und Detektorsensitivität 5; *focus by optimization center*; Masse des Deflektors 1000 Dalton; Datenakquirierungsmethode *Seldi Quantitation*; Akquisitionparameter 20. *delta to 5. transients per to 15 ending position to 80*; zwei Aufwärmeschüsse des Lasers mit einer Intesität von 177, Aufwärmeschüsse nicht ins Spektrum aufnehmen. Die Peaks wurden in einem Massenbereich von 2000 bis 20000 Dalton identifiziert.

4.1.10 MALDI imaging

4.1.10.1 Herstellung und Vorbehandlung der Gefrierschnitte

Das gefrorene Gewebe wurde in einem Kryostaten (Microm HM 560) auf einer Stahlplatte unter Verwendung von möglichst wenig OCT (*optimal cutting temperature*) Polymer fixiert. Der Einsatz von OCT sollte möglichst sparsam erfolgen, da dieses Polymer sich beim Schneiden über dem gesamten Präparat verteilt und die Intensität der Spektren reduziert. Bei -20°C wurden mit Hilfe einer Mikrotomklinge 10 µm dicke Gefrierschnitte angefertigt und auf im Kryostaten vorgekühlte, spezielle, elektrisch leitfähige Objektträger (*conductive glass slides*, Bruker Daltonics, #237001) aufgezogen. Noch im Kryostaten wurden die Objektträger auf der Hand vorsichtig angewärmt und dann erst aus dem Kryostaten genommen. Auf diese Weise konnten die Schnittpräparate langsam auftauen, damit sich nicht zuviel Kondenswasser bildete, welches zu einer unerwünschten Delokalisation der Proteine führen könnte. Im Anschluß wurden die Schnitte auf den Objektträgern fixiert, indem sie zunächst für 30 Sekunden in 70%igem Ethanol (HPLC *grade*) und dann für 15 Sekunden in 96%igem Ethanol (HPLC *grade*) inkubiert wurden. Nach dem Trocknen an der Luft konnten die Schnittpräparate entweder direkt weiter verwendet werden oder bei -80 °C für etwa eine Woche gelagert werden.

Die kleinen Gewebeproben (Biopsien und Stenzen) wurden aus Gründen der Schneidfähigkeit in reichlich OCT eingebettet. Dieses mußte vor der weiteren Verarbeitung der Schnittpräparate so weit wie möglich mittels eines speziellen Waschprotokolls entfernt werden. Dazu wurden die Objektträger wie folgt behandelt:

1. 30 sec. 70 % Ethanol (HPLC *grade*)
2. 30 sec. 90% Ethanol (HPLC *grade*) + 9% Eisessig + 1% deionisiertes Wasser
3. 30 sec. 70 % Ethanol (HPLC *grade*)
4. 30 sec. deionisiertes Wasser
5. 30 sec. 70 % Ethanol (HPLC *grade*)
6. 30 sec. 90 % Ethanol (HPLC *grade*)+ 9% Eisessig + 1% deionisiertes Wasser

4.1.10.2 Präparation der Schnittpräparate

Vor der Präparation der Schnittpräparate wurde der Objektträger kurz getrocknet und um den Schnitt herum mindestens drei Orientierungspunkte mittels eines Tipp-Ex-Stiftes aufgebracht. Diese dienten im Verlauf zur Orientierung und Justierung der Software. Von jedem nativen, von Tipp-Ex-Punkten umringten Schnitt wurde mittels eines mit einer Kamera besetzten Stereomikroskops (Vergrößerung bis 40 fach) ein Übersichtsbild aufgenommen.

Bei der hier verwendeten Matrix handelte es sich um Sinapinsäure (*sinapinic acid* (SPA), Bruker Daltonics, #203073). Für die Matrixlösung wurden 180 mg SPA in ein 15 ml Probengefäß überführt und mit 5 ml hochreinem Wasser (HPLC *grade*), 5 ml Acetonitril und 10 µl TFA überschichtet. Das Röhrchen wurde mit Aluminiumfolie lichtgeschützt umwickelt und zur vollständigen Lösung des Matrixpulvers für mindestens 15 Minuten bei 4°C geschüttelt.

Die Aufbringung der Matrixlösung auf den Objektträger erfolgte mit Hilfe eines TLC-Sprayers (*Thin Layer Chromatography spraying device*, Sigma) und unter Verwendung von Stickstoffgas. Unter dem Abzug wurde aus einer Entfernung von etwa 30 cm die Matrix gleichmäßig auf den Schnitt gesprüht. Dabei wurde jeweils immer nur eine geringe Menge aufgesprüht und der Schnitt kurz antrocknen gelassen, so daß die Oberfläche nicht zu naß wurde. Denn im Falle einer zu nassen Oberfläche bestünde die Gefahr der Tropfenbildung und somit einer ungleichmäßigen Auskristallisierung der Matrix sowie einer Delokalisation der Proteine. Auf diese Weise wurden insgesamt 10 ml Matrixlösung auf den Schnitt aufgebracht. Bei optimaler Präparation zeigte das Schnittpräparat einen homogenen hellgelblichen Belag aus feinsten Matrixkristallen. Die Qualität der Sprühpräparation wurde mit Hilfe des mit einer Kamera versehenen, beschriebenen Stereomikroskops dokumentiert.

4.1.10.3 Analyse der Schnittpräparate im MALDI-TOF-MS

Die Messung der Schnittpräparate erfolgte im MALDI-TOF-MS (Reflex IV, Bruker Daltonics) mit Hilfe der Software FlexImaging 2.0 (Bruker Daltonics). Hierzu wurde der Objektträger zunächst in einen Stahlträger (*slide adapter*, Bruker Daltonics) eingespannt und in das Gerät eingebracht. In der Software wurde anhand der aufgetragenen Punkte und des digitalen Photos (vergleiche 4.1.10.2) die genaue Position des Schnittpräparates auf dem Objektträger definiert. Für die Analyse wurde über den Schnitt ein Meßraster gelegt, welches einen Abstand der einzelnen Messpunkte von 200 µm in x-y-Richtung zueinander aufwies. (Lediglich im Falle der Prostatastanzen wurde ein Abstand von 100 µm verwendet.) Während der Analyse wurde an jedem der Meßpunkte des Rasters ein Spektrum erzeugt. Die Parameter des Messprotokolls lauteten: Ionenquelle 1: 20,00 kV; Ionenquelle 2: 17,70 kV; Linse 9.80; *linear mode*; *pulsed ion extraction* 200 ns; *matrix suppression* bis zu 1.000 Da; *mass range* 1.000 – 20.000 Da; *electronic gain* 100 mV; *sample rate* 1,00 GS/s. Es wurden jeweils 20 Laserschüsse mit einer Laserintensität von 47% zu einem Spektrum addiert.

4.1.10.4 Entfernung der Matrix und Färbung

Nach der Analyse der Schnittpräparate wurden diese zu H&E gefärbten Dauerpräparaten umgewandelt. Auf diese Weise konnten die massenspektrometrischen Daten direkt mit den histologischen Informationen desselben Schnittpräparates korreliert werden.

Vor der Färbung mußte zunächst die Matrix entfernt werden. Dazu wurde der Objektträger für 15 Minuten in 100%igem Aceton, für 15 Minuten in 100%igem Methanol gewaschen und kurz mit destilliertem Wasser abgespült. Danach erfolgte die H&E-Färbung. Der Schnitt wurde zuerst für zehn Minuten in Hämatoxylin-Lösung nach Mayer inkubiert, kurz mit destilliertem Wasser abgespült und in Kalziumcarbonat für 5-10 Minuten gebläut. Es folgten 45 Sekunden Inkubation in Eosin-Lösung und ein kurzes Abspülen mit Wasser. In der aufsteigenden Alkoholreihe wurde der Schnitt zunächst kurz in 79%igem und 95%igem Ethanol und danach für 5-10 Minuten in 100%igem Ethanol gewaschen. Den Abschluß bildete ein Waschschrift für zehn Minuten in Xylol. Die Objektträger wurden mit Eindeckmedium betropft und ein Deckgläschen wurde aufgelegt.

4.6 Auswertestrategien

Für die verschiedenen Methoden fanden mehrere unabhängige Auswertestrategien Anwendung.

Bezogen auf die 2D-Gele waren es die manuelle Auswertung am Leuchttisch mittels Folienausdrucken und der Image Master Platinum Software (Amersham Biosciences/ GE Healthcare). Dabei wurde in einem dritten Ansatz die manuelle Auswertung auch durch Funktionen der Image Master Platinum Software (Bestimmung der Spotintensität und des Spotvolumens) unterstützt. Die Rohdaten der Image Master Platinum Software wurden zudem mit Hilfe der ClinProTools 2.0 Software (Bruker Daltonics) und der XLminer Software (Biocontrol) weiter ausgewertet und klassifiziert.

Bezogen auf die MALDI- und SELDI-Spektren wurde die Auswertung mit Hilfe der ClinProTools 2.0 Software durchgeführt. Ausgewählte Datensätze wurden zusätzlich mit der XLminer Software ausgewertet.

Für die Auswertung der MALDI-imaging Spektren wurden zunächst mit Hilfe der FlexImaging Software (Bruker Daltonics) in jedem Schnitt sogenannte *regions of interest* (ROI) ausgewählt, die die Histologie des zu untersuchenden Schnittes repräsentativ abbildeten (z.B. ein Areal mit Drüsen des PCa). Diese ROIs umfaßten in der Regel zwischen 30-50 Meßpunkte. Die Spektren der ausgewählten ROIs wurden den jeweiligen Gruppen (z.B. PCa

oder normales Prostatagewebe) zugeordnet und anschließend mittels der Software ClinProTools 2.0 (Bruker Daltonics) ausgewertet. Dabei wurden verschiedene Klassifizierungsmodelle erzeugt, die es erlaubten, jeden Meßpunkt des gesamten Schnittpräparates in eine der Klassen zu gruppieren. In der graphischen Darstellung, dem sogenannten *class image*, konnten diese Klassen farbkodiert dargestellt werden. Daneben wurden auch bestimmte Proteine bzw. Massen farblich kodiert und ebenfalls graphisch dargestellt. Dadurch erhielt man das sogenannte *mass image*. Diese beiden konnten direkt mit dem H&E-Bild des Schnittpräparates verglichen werden.

Die ClinProTools Software arbeitet mit drei verschiedenen mathematischen Modellen: dem genetischen Algorithmus (GA), dem *support vector machine* Algorithmus (SVM) und dem *quick classifier* (QC). Der genetische Algorithmus stellt einen stochastischen Suchalgorithmus dar, der sich an dem biologischen Evolutionsmodell orientiert. Alle detektierten Peaks werden anhand einer Zielfunktion evaluiert. Im nächsten Schritt werden mehrere (im Mittel 5) verschiedene Peaks ausgewählt, wobei bevorzugt Peaks mit besseren Zielfunktionswerten benutzt werden. Die verschiedenen Kombinationen werden solange variiert, bis eine Kombination entsteht, anhand welcher am besten zwischen zwei Klassen unterschieden werden kann. Neben dem von der Software erzeugten GA wurde zusätzlich durch manuelles Auswerten der Spektren ein sogenannter „Eigener GA“ erzeugt. Die *support vector machine* ist ein rein mathematisches Verfahren der Mustererkennung. Jeder Peak einer zuvor definierten Klasse stellt einen Vektor in einem Vektorraum dar. Die Trennung der Klassen erfolgt durch das Einfügen einer Hyperebene in den Raum. Beim *quick classifier* handelt es sich um einen univarianten Sortieralgorithmus, welcher einzelne Peaks statistisch auswertet. Zusätzlich können mit Hilfe der Software sogenannte 2D-Blots angefertigt werden. Hierbei werden exemplarisch die Intensitäten zweier Peaks gegeneinander aufgetragen. Dadurch gelingt im Idealfall eine gute räumliche Trennung der Klassen als getrennte *cluster* voneinander.

Die XLminer Software stellt eine komplexe Auswertesoftware dar, die in Form eines regelbasierten Auswahlverfahrens auf der Basis eines Entscheidungsbaumes (*decision tree algorithm*) arbeitet. Dazu sucht die Software vier beliebige Peaks, erkennt deren Verteilung bzw. Exprimierung über die verschiedenen Klassen und erstellt daraus eine Abfolge von Auswahlregeln. Im nächsten Schritt werden vier andere Peaks ausgewählt und erneut mit Regeln verknüpft. Die gefundenen Regeln werden statistisch im Hinblick auf ihre Wertigkeit für die Klassifizierung bewertet und hierarchisch sortiert. Um die Anzahl der Regeln zu begrenzen, wird ein Schwellwert der Signifikanz definiert, der von den Regeln erreicht werden muß. Dabei gilt, je höher der Schwellwert der Signifikanz, desto besser erfolgt die Klassifikation durch die Regeln. Alle Regeln, die signifikanter als der definierte Schwellwert sind, können graphisch als sogenannte *heatmap* dargestellt werden. In dieser werden auf

der y-Achse die verschiedenen Klassen jeweils zusammenhängend als Block dargestellt. Auf der x-Achse werden die Regeln, die zu der Klassifizierung geführt haben, abgebildet. Die Regeln werden hierbei entsprechend ihrer Aussagekraft für die Klassen in Quadranten sortiert.

3 Ergebnisse

3.1 Zweidimensionale Gelelektrophorese

3.1.1 Zellzahlbestimmung

Vor der Mikrodissektion der Gewebeproben wurden Gefrierschnitte von Zellpellets unter den gleichen Bedingungen wie die Gewebeproben mikrodissektiert, um die optimale Anzahl der Zellen für ein 2D-SDS-PAGE zu ermitteln. Hierzu wurden von Gefrierschnitten von RT4- und UROtsa-Zellpellets 15.000, 30.000, 45.000, 60.000, 75.000 und 100.000 Zellen isoliert. Der Vergleich der Gele zeigte bei dreimaliger Wiederholung die höchste Qualität bei einer Zellzahl um die 45.000 Zellen. Beurteilungskriterien waren insbesondere die Anzahl der detektierbaren Spots und Abgrenzbarkeit zueinander.

3.1.2 Mikrodissektiertes Urothel

Insgesamt wurden 38 *low-grade* papilläre Urothelkarzinome (pTa, G1) von 36 Patienten und 11 Normalurothelproben untersucht. Von den 36 Patienten mit Urothelkarzinom waren 31 Männer (86%) und 5 Frauen (14%). Der Altersdurchschnitt liegt bei 71 Lebensjahren, bei einer Altersspannbreite von 41-90 Jahren. Die Normalurothelproben entstammten ausschließlich männlichen Patienten mit einem Durchschnittsalter von 68 Jahren, bei einer Altersspannbreite von 57-80 Jahren.

3.1.2.1 Manuelle Auswertung

Der manuelle Vergleich der Gele der papillären Tumoren mit denen des Normalurothels ergab 15 Spots, die in den Gelen des Normalurothels gar nicht zu finden waren, und weitere 27 Spots, die nur in einem Teil der Normalurothel-Gele ein Korrelat zeigten. Abbildung 6 zeigt unter A für diese 42 Spots jeweils die Anzahl der Normalurothel-Gele, in denen ein Spotkorrelat gefunden werden konnte. Unter B sind die Gele der papillären Tumoren für diese 42 Spots untereinander verglichen. Dabei ist zu erkennen, daß keiner dieser 42 Spots bei allen Tumoren vorhanden ist.

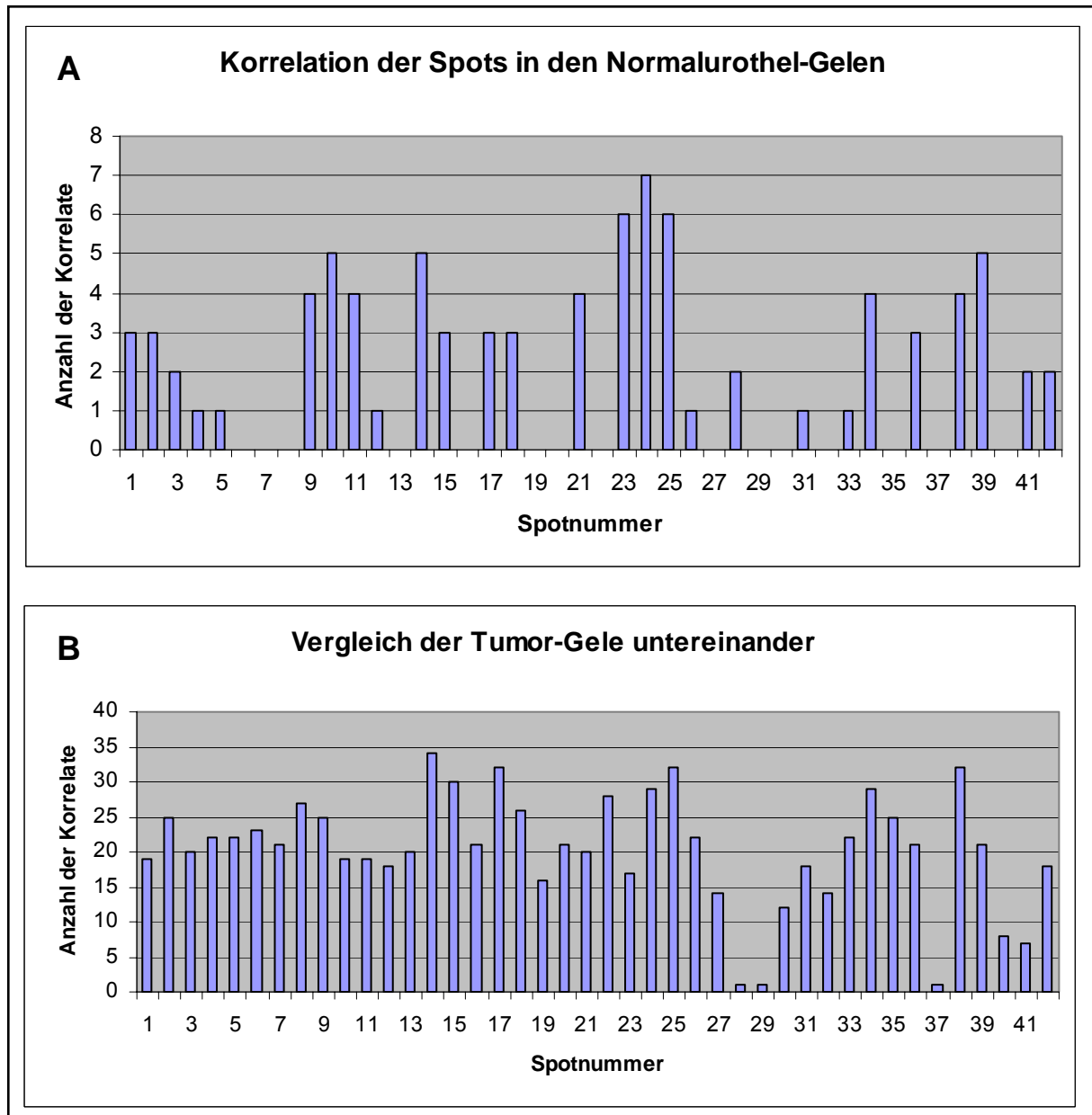


Abbildung 6: A: Anzahl der Korrelate für 42 Spots in den Normalurothel-Gele; B: Vergleich der Tumor-Gele untereinander für die 42 Spots.

Der Spot mit der Nummer 14 zeigt mit einer Repräsentanz in 34 der 38 (89,5%) Proben die größte Übereinstimmung in der Gruppe der papillären Tumoren. Die Spots mit den Nummern 17, 25 und 38 sind jeweils in 32 der 38 (84,2%) Proben zu finden. Stellt man diese Ergebnisse denen der Spotkorrelate in den Normalurothel-Gele gegenüber, weist der Spot mit der Nummer 22 die besten Werte auf: er ist in 28 der 38 (73,7%) Tumor-Gele und in keinem der Normalurothel-Gele erkennbar. Eine Übersicht über weitere die neun besten Spots im Hinblick auf Sensitivität und Spezifität zeigt Tabelle 13.

Tabelle 13: Sensitivität und Spezifität für die einzelnen Spotnummern.

Spotnummer	Sensitivität [%]	Spezifität [%]
2	65,8	72,7
8	71,1	100
9	65,8	63,6
17	84,2	72,7
18	68,4	72,7
22	73,7	100
34	76,3	63,6
35	65,8	100
38	84,2	63,6

3.1.2.2 Software-assistierte Bestimmung der Spotintensitäten und -volumina

Für jeden der manuell detektierten 42 Spots (vergleiche Abschnitt 3.1.2.1) wurden in jedem Gel mit Hilfe der Image Master 2D Platinum Software die normierten Spotintensitäten ermittelt. Die normierte Spotintensität entspricht der Helligkeit des Spots im Verhältnis zur Gesamthelligkeit des Geles. Die Spotintensität ist proportional zur Konzentration des Proteins, welches durch diesen Spot repräsentiert wird. Der Vergleich der normierten Spotintensitäten der 42 Spots ist in Abbildung 7 dargestellt. Hierbei fällt auf, daß die Software jedem der 42 Spots in beiden Gruppen eine Spotintensität zuordnen konnte. Im Gegensatz zur manuellen Auswertung lassen sich mit der Software demnach alle 42 Spots in allen Normalurothel-Gelen nachweisen.

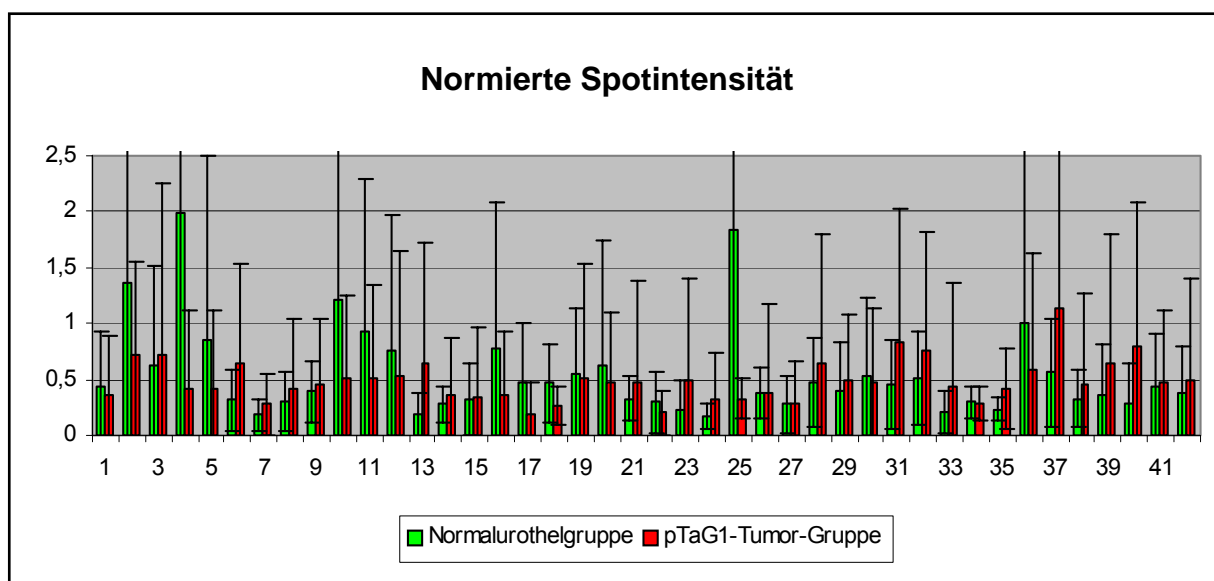


Abbildung 7: Vergleich der normierten Spotintensitäten für die 42 Spots in der Normalurothelgruppe und der Gruppe der papillären Tumoren.

Die größte Differenz der normierten Spotintensitäten (über 0,4 Punktwerte) ergeben sich für Spots mit den Nummern 2, 4, 5, 10, 13, 25, 36, 37 und 40. Jedoch weisen die Tumor-Gele lediglich bei drei dieser Spots (Spot Nummer 13, 37 und 40) eine höhere normierte Spotintensität im Vergleich zu den Normalurothel-Gele auf. Bei den restlichen Spots liegt die normierte Spotintensität der Normalurothel-Gele deutlich über denen der Tumor-Gele. Die Standardabweichung dieser neun Spots zeigt sich auffällig hoch, so daß die Streuung der Intensitätswerte trotz Normierung innerhalb der definierten Gruppe groß sein muß.

Als weiterer Parameter zur Bewertung der Proteinexpression wurde das normierte Volumen der Spots, ein Maß aus Intensität und Fläche, herangezogen. In Abbildung 8 sind die normierten Volumina für die 42 Spots in den beiden Gruppen gegenübergestellt.

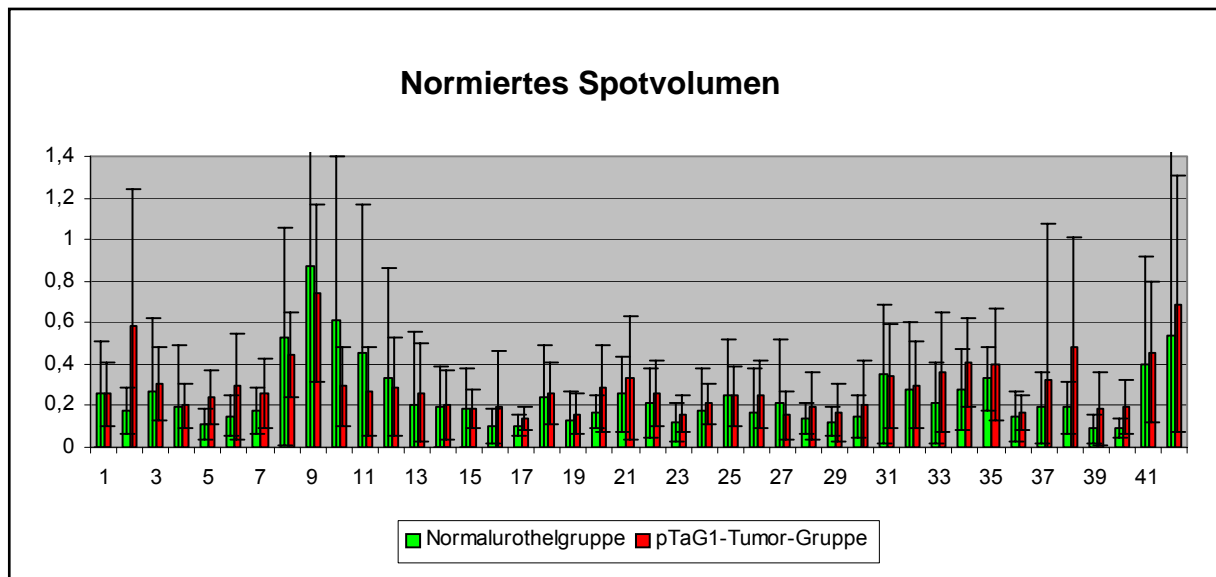


Abbildung 8: Vergleich der normierten Spotvolumina für die 42 Spots in der Normalurothelgruppe und der Gruppe der papillären Tumoren.

Eine deutliche Differenz der normierten Volumina zwischen beiden Gruppen ergibt sich nur für die Spots mit den Nummern 2, 10 und 38. Dabei zeigen die Spots Nummer 2 und 38 ein größeres Normiertes Volumen in den Tumor-Gele und der Spot Nummer 10 in den Normalurothel-Gele. Auch bei der Betrachtung der normierten Volumina können alle Spots in allen Gelen der beiden definierten Gruppen nachgewiesen werden. Analog zu den Werten der normierten Intensität weisen auch die Werte der normierten Volumina hohe Standardabweichungen auf, die durch eine große Streuung der Einzelwerte bedingt sind. Daher fallen die Werte für die Sensitivität und Spezifität der einzelnen Spots im Vergleich zu den Werten, die mit der manuellen Auswertung erzielt werden konnten (vergleiche Abschnitt 3.1.2.1), deutlich geringer aus.

3.1.2.3 Auswertung mittels der Image Master 2D Platinum Software

Die Auswertung der Gele der papillären Tumoren im Vergleich mit den Normalurothelproben mit Hilfe der Image Master 2D Platinum Software erbrachte 15 Spots, die eine signifikante differentielle Expression aufwiesen. Vier dieser 15 durch die Software ermittelten Spots wurden auch durch die manuelle Auswertung erkannt. Einer von diesen (entsprechende der Nummer 33 der manuellen Auswertung) weist die größte Aussagekraft für die Zuordnung zu einer Klasse auf. Insgesamt konnten mit der Software in den Normalurothel-Gelen 635 Spots und in den Tumor-Gelen 942 Spots ermittelt werden.

3.1.2.4 Auswertung mittels der ClinProTools 2.0 Software

Vor der Analyse der Daten mittels der ClinProTools 2.0 Software mußte für jedes Gel aus den Spotintensitäten ein künstliches Massenspektrum erzeugt werden. Dazu wurden die Werte der Spotintensität mit 100 multipliziert und zwischen diesen Werten neun niedrige Werte (Null) eingefügt. Dadurch entstand für jedes Gel ein 420 Werte langes Spektrum. Um zusätzlich die notwendige Länge eines Massenspektrums zu erreichen, wurde diesem Spektrum eine Reihe von niedrigen Werten angehängt, die einem Spektrum mit niedrigen Werten entnommen wurden. Diese Werte waren so niedrig, daß sie von der Auswertesoftware nicht als Peaks erkannt wurden und somit keinen Einfluß auf die eigentliche Analyse hatten.

In der Auswertung mit der Software konnten die Daten der beiden Gruppen mit Hilfe der drei Modelle klassifiziert werden. Eine Übersicht über die erzielten Werte für die Sensitivität und Spezifität sowie die Anzahl der für das jeweilige Modell verwendeten Peaks (bzw. Spots) gibt Tabelle 14.

Tabelle 14: Sensitivität, Spezifität und Anzahl der Peaks (bzw. Spots) für die verschiedenen Modelle im Vergleich bei Differenzierung zwischen Normalurothel und *low-grade* papillärem Urothelkarzinom; Ausgangsmaterial: Gewebe; Methode: 2D-SDS-PAGE und ClinProTools 2.0 Software.

Modell	Sensitivität [%]	Spezifität [%]	Anzahl der Peaks
GA	65,38	13,64	5
SVM	73,08	18,18	10
QC	50	54,55	1

3.1.2.5 Auswertung mittels der XLminer Software

Die Auswertung der Daten mit Hilfe der XLminer Software erbrachte eine Sensitivität von 92,1% und eine Spezifität von 72,7%. Die sogenannte *heat map* ist in Abbildung 9 dargestellt.

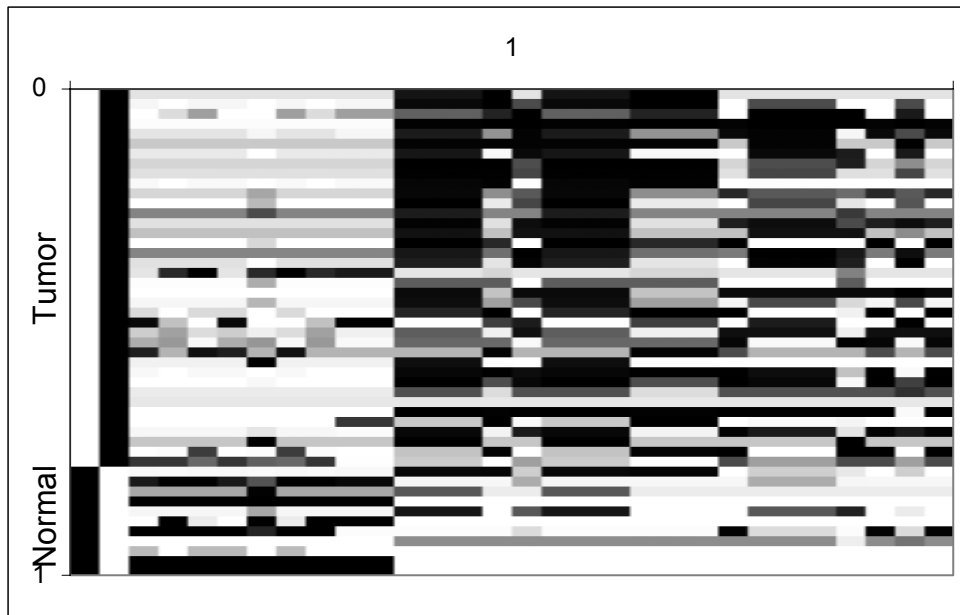


Abbildung 9: Graphische Darstellung der Differenzierung zwischen *low-grade* papillären Tumoren und Normalurothel als sogenannte *heat map*.

3.1.3 Fraktionierte Proben

Bei der Fraktionierung mit Hilfe der Vivapure[®] C18 Micro *spin columns* (Vivasciences) zeigte sich wiederholt bereits bei Zentrifugation mit niedrigen Umdrehungen ein Reißen der Membran in den *spin columns*, so daß keine saubere Fraktionierung durchführbar war. Von den drei anderen Methoden zeigte das 2-D Fractionation Kit (Amersham Biosciences / GE Healthcare) reproduzierbare Ergebnisse und die größten Anzahl an detektierbaren Spots (insgesamt im Mittel 3451) in den Gelen. Die beiden anderen Methoden (ProteoEnrich[™] CAT-X-Kit (Novagen) und ProteinChip[®] Biomarker Profiling Fractionation Kit (CIPHERGEN Biosystems)) erbrachten im Gegensatz dazu deutlich weniger detektierbare Spots, im Mittel etwa 2337 (Novagen) und 1864 (CIPHERGEN). In Abbildung 10 sind exemplarisch die Gele von drei RT4-Fractionen des 2-D Fractionation Kits (Fraktion1,4 und Fraktion der unlöslichen Proteine) dem Gel eines unfraktionierten Zellsediments von RT4 gegenüber gestellt.

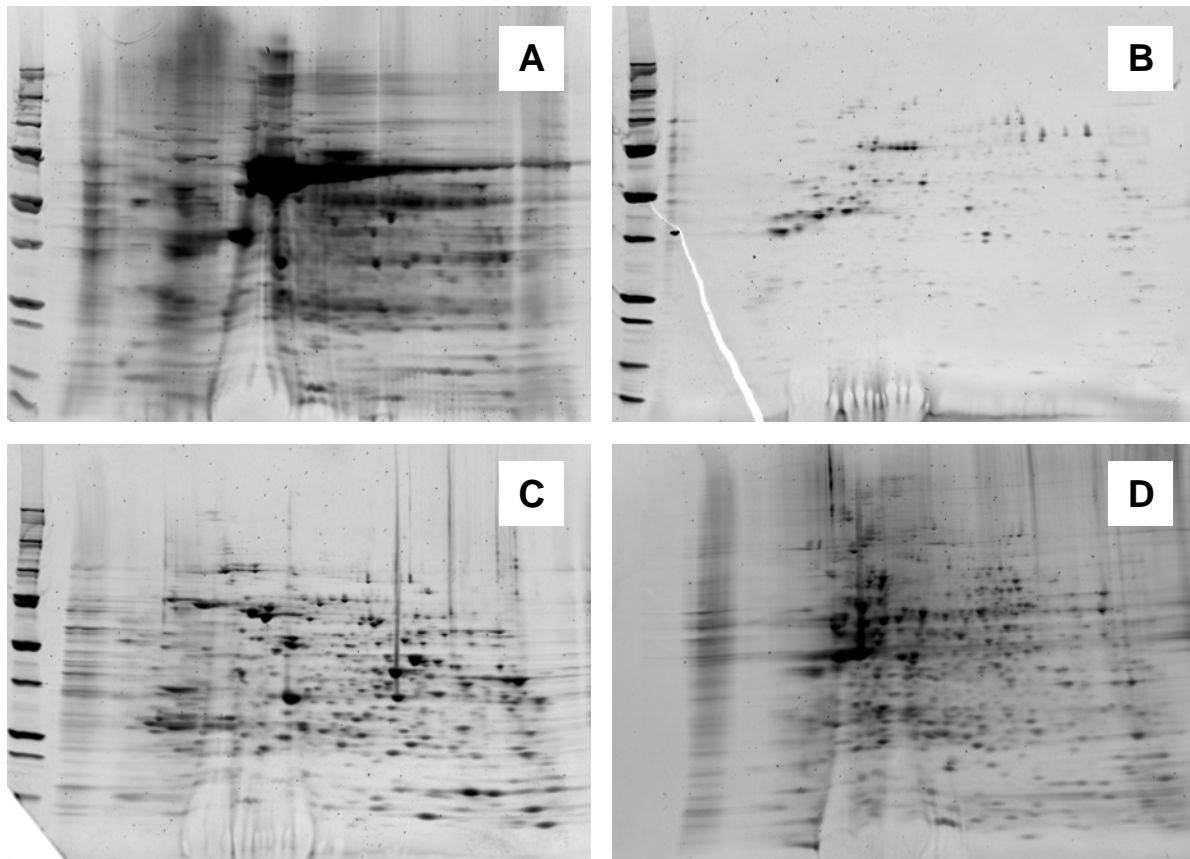


Abbildung 10: Bilder der 2D-SDS-Page im pH-Bereich 3-11. A: unfraktioniertes RT4-Zellsediment, B-D: Fraktionen nach Anwendung des 2-D Fractionation Kits (Amersham Biosciences / GE HealthCare); B: Fraktion 1, C: Fraktion 4 und D: Fraktion der unlöslichen Proteine. In Gelen A-B ist links jeweils ein Größenstandard (10 – 250 kDa) mitgeführt.

3.1.4 Urin

3.1.4.1 Vergleich der Fällungsmethoden

Für die Fällung der Proteine aus Urin wurden insgesamt acht verschiedene Methoden miteinander verglichen: Methanol-, Aceton- und TCA-Fällung, 2-D Clean-Up Kit (Amersham Biosciences / GE Healthcare), Centrifugal Filter Devices (Millipore), Zentrifugation mit getrennter Verwendung von Zellsediment und Überstand sowie Aufnahme des Urins in Lysepuffer.

In Abbildung 11 sind im Vergleich die verschiedenen Methoden hinsichtlich ihres Gesamtproteingehaltes und der Anzahl der Spots gegenübergestellt. Die Auswertung erfolgte mit der Software Image Master Platinum.

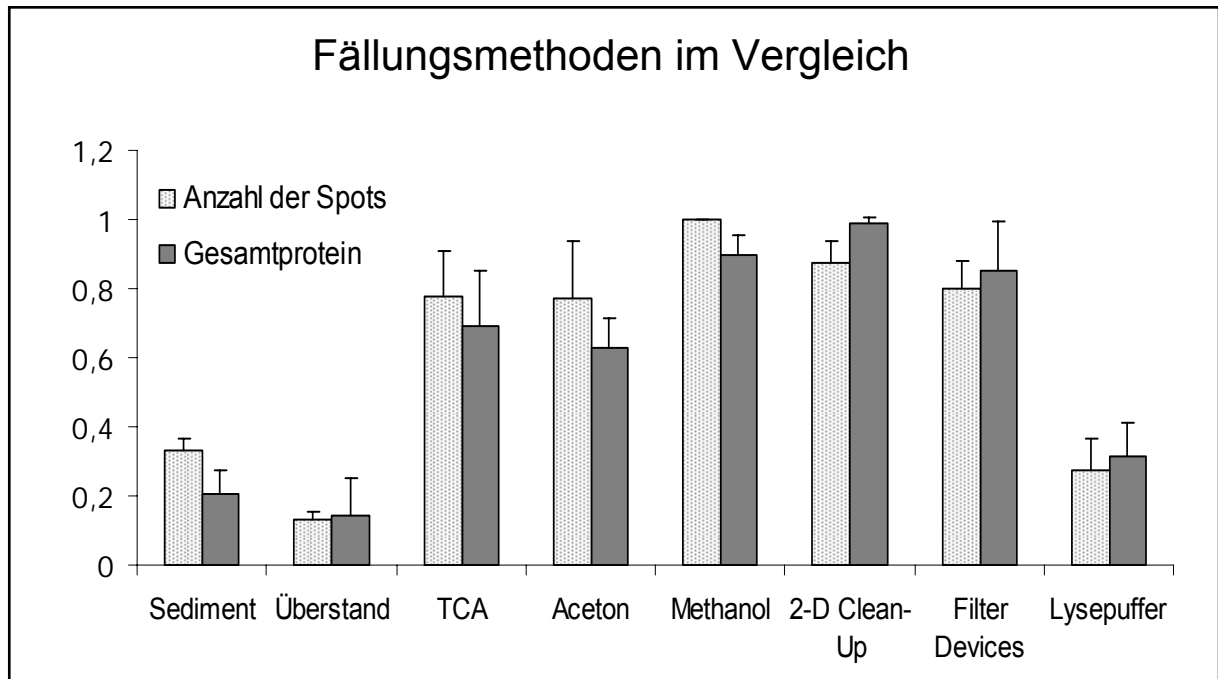


Abbildung 11: Graphischer Vergleich der verschiedenen Methoden zur Fällung der Proteine aus Urin bezogen auf die Anzahl der detektierbaren Spots und den Gesamtproteingehalt der Gele.

Abbildung 12 zeigt exemplarisch ein Gel einer Urinprobe nach Methanolfällung.

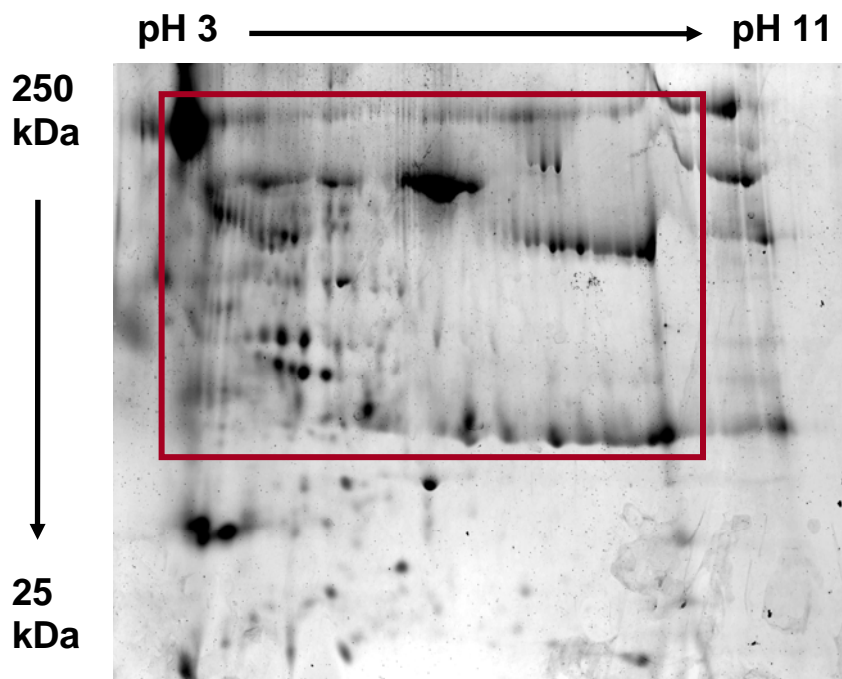


Abbildung 12: Bild eines 2D-Gels von einer Urinprobe nach Methanolfällung. Dargestellt ist ein pH-Bereich von 3-11 und ein Massenbereich von 25-250 kDa. Der rot umrandete Ausschnitt repräsentiert das in Abbildung 13 E dargestellte Bild.

In Abbildung 13 ist jeweils der in Abbildung 12 markierte Bildausschnitt des Gels für die verschiedenen Fällungsmethoden dargestellt.

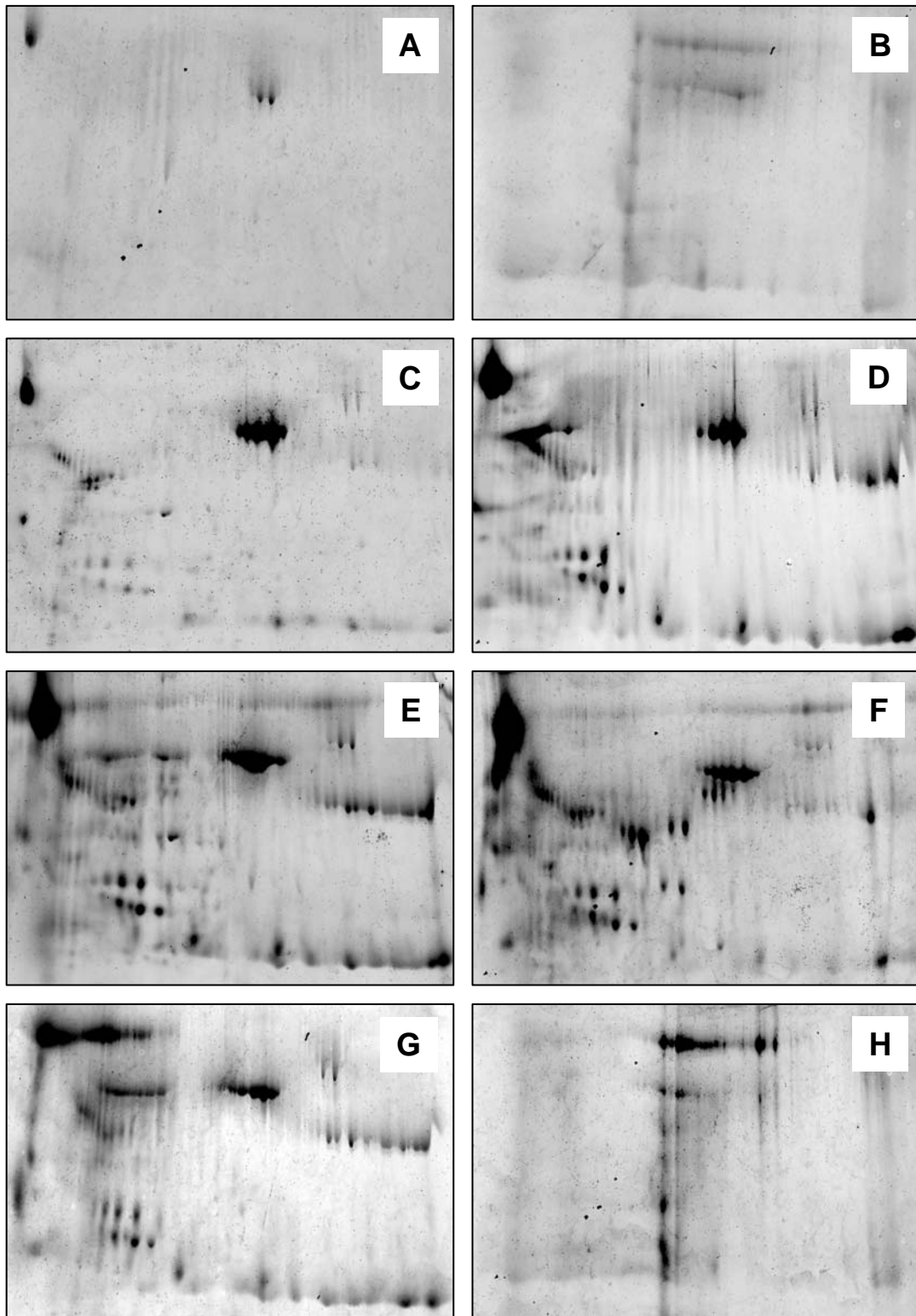


Abbildung 13: Repräsentativer Ausschnitt aus 2D-Gelen von Urin nach Proteinfällung mit den verschiedenen Methoden; A: Zellsediment nach Zentrifugation, B: Überstand nach Zentrifugation, C: TCA-Fällung, D: Aceton-Fällung, E: Methanol-Fällung, F: 2-D Clean-Up Kit, G: Centrifugal Filter Devices, H: Lysepuffer.

3.1.4.2 Einfluß der Fällung auf die Proteine

Um den Einfluß der Fällung auf den Proteingehalt zu testen, wurde ein Massenstandard (Precision Plus Protein™ Standard, Bio-Rad, #161-0363) den zwei besten Fällungsmethoden, Methanol-Fällung und 2-D Clean-Up Kit, unterzogen. In Abbildung 14 sind bezogen auf die Gesamtintensität aller Spots die Methanol-Fällung und das 2-D Clean-Up Kit dem Standard ohne Aufreinigung gegenübergestellt.

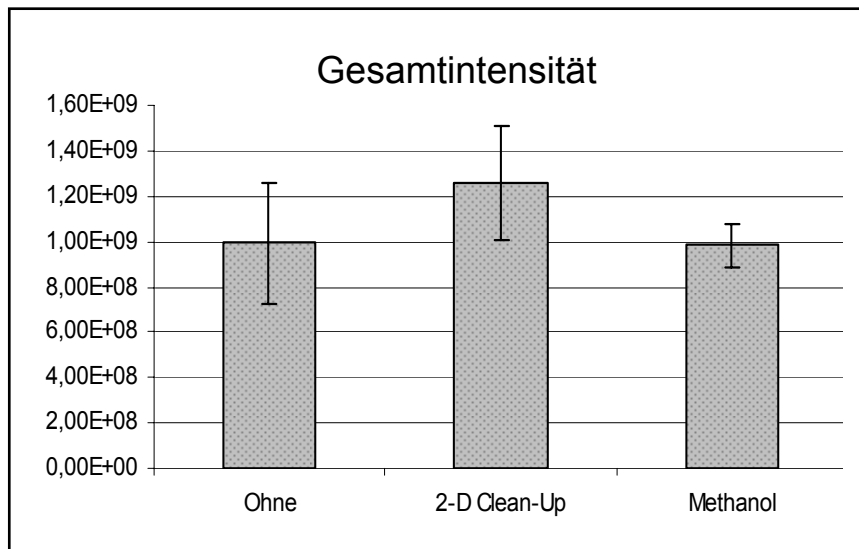


Abbildung 14: Vergleich der Gesamtintensität aller Spots des Standards ohne sowie nach Fällung mittels 2-D Clean-Up Kit und Methanol.

3.1.4.3 Vergleich von Harnblasenkarzinompatienten mit Kontrollen

Es wurden Urinproben von Patienten der urologischen Poliklinik (12) und Urinproben von Patienten mit Harnblasenkarzinomen (12) untersucht. Die Gruppe der Harnblasenkarzinompatienten setzte sich aus 4 Patienten mit pTa, G1 Karzinomen, 3 Patienten mit Carcinomata in situ und 5 Patienten mit invasiven Karzinomen zusammen.

Weder die Auswertung mit der Image Master 2D Platinum Software noch die manuelle Auswertung am Leuchttisch ergab Spots, die in einer ausreichenden Anzahl an Gelen differentiell exprimiert war.

In Abbildung 15 sind exemplarisch vier Gele (Patient mit Harnwegsinfekt (A), mit pTa, G1 Tumor (B), mit Carcinoma in situ (C) und mit invasivem Karzinom (D)) dargestellt.

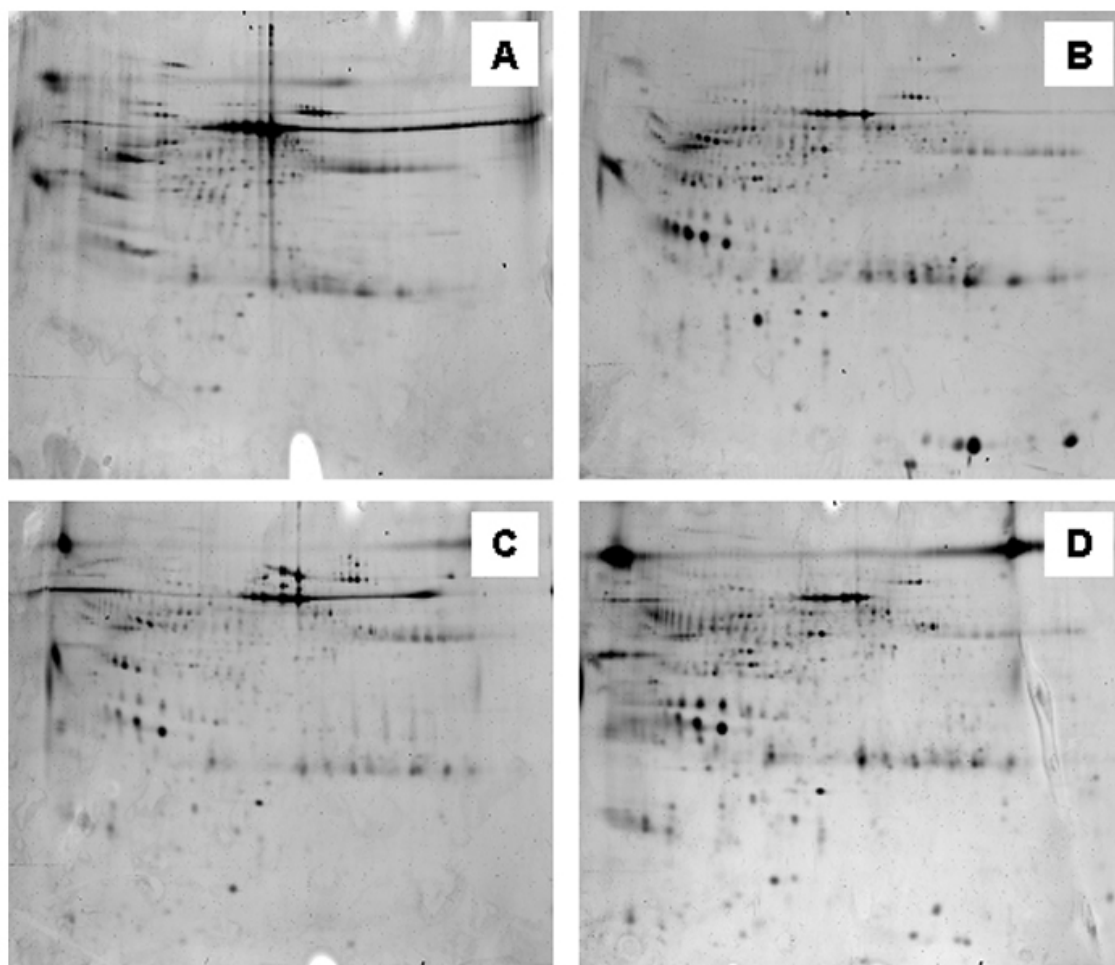


Abbildung 15: Vier exemplarische Bilder der 2D-Gele von Urinproben. A: Harnwegsinfekt, B: pTa, G1 Tumor, C: Carcinoma in situ, D: invasives Karzinom. pH-Bereich 3-11, Massenbereich 25-250 kDa.

3.2 MALDI-TOF-MS

3.2.1 Serumfraktionierung mit WCX-Beads

Es wurden die Seren der TUR-Patienten mit und ohne histologisch gesichertem Harnblasenkarzinom, der Patienten mit histologisch gesichertem Prostatakarzinom, der freiwilligen Blutspender aus dem Institut für Klinische Chemie, der freiwilligen männlichen Blutspender der Blutbank und den Patienten der urologischen Poliklinik verwendet. Ein weiteres Kollektiv entstand durch die Vermischung der freiwilligen Spender des Instituts für Klinische Chemie und der Blutbank, wobei hier die älteren Männer und Frauen verwendet wurden. Eine Übersicht über die Zusammensetzung der Kollektive gibt Tabelle 15.

Tabelle 15: Zusammensetzung und Durchschnittsalter der verschiedenen Kollektive.

Kollektiv	Anzahl	Durchschnittsalter
TUR-Patienten	86	66
kein Tumor	13	60
Tumor	73	67
Männer mit Tumor	48	68
pTa	29	65
pTis	19	67
pT1+2	25	68
gemischt	20	68
Prostatakarzinompatienten	54	63
pT2	27	62
pT3	26	64
pTx	1	76
Gleason 6	17	62
Gleason 7	26	65
Gleason 8	1	76
Gleason 9	9	62
Gleason X	1	49
PSA unter 4	10	62
PSA zwischen 4 und 10	25	62
PSA über 10	15	65
PSA unbekannt	4	68
Klinische Chemie	46	48
Männer	23	48
Blutbank (nur Männer)	66	58
Gemischte Kontrollen	60	51
Poliklinik gemischt	24	61
Poliklinik nur Männer	39	60

3.2.1.1 Harnblasenkarzinompatienten

Es wurden die Spektren der TUR-Patienten mit (73) und ohne (13) histologisch gesichertem Harnblasenkarzinom (HB-Ca) sowie Patienten mit verschiedenen Tumorstadien (pTa (29), pTis (19) und pT1+2 (25)) untereinander verglichen (vergleiche auch Tabelle 15).

Die Auswertung erfolgte mit Hilfe der ClinProTools 2.0 Software. Eine Übersicht über die erzielten Werte für die Sensitivität sowie die Anzahl der für das jeweilige Modell verwendeten Peaks gibt Tabelle 16.

Tabelle 16: Sensitivität und Anzahl der Peaks für die verschiedenen Modelle im Vergleich bei Differenzierung zwischen pTa, pTis und pT1+2 versus negative Biopsie sowie der verschiedenen T-Stadien untereinander; Ausgangsmaterial: Serum; Methode: MALDI, WCX-Beads.

Modell	Sensitivität Klasse 1 [%]	Sensitivität Klasse 2 [%]	Anzahl der Peaks
pTa versus negative Biopsie			
GA	72,55	44,83	7
pTis versus negative Biopsie			
GA	93,55	41,38	7
pT1+2 versus negative Biopsie			
SVM	73,33	63,33	8
pTis versus pTa			
GA	56,41	63,93	8
pTa versus pT1+2			
GA	59,18	55,74	4
pT1+2 versus pTis			
GA	72	45	7

In Abbildung 16 sind jeweils zwei verschiedene Stadien (negative Biopsie, pTa, pTis und pT1+2) in Analogie zu Tabelle 16 als sogenannter 2D-Blot anhand zweier Massen gegeneinander graphisch aufgetragen. Die schlechte Trennbarkeit der einzelnen Gruppen voneinander spiegelt sich auch in dieser Grafik wider. Die durch die Ellipsen dargestellten Gruppen überlappen sich in großen Teilen.

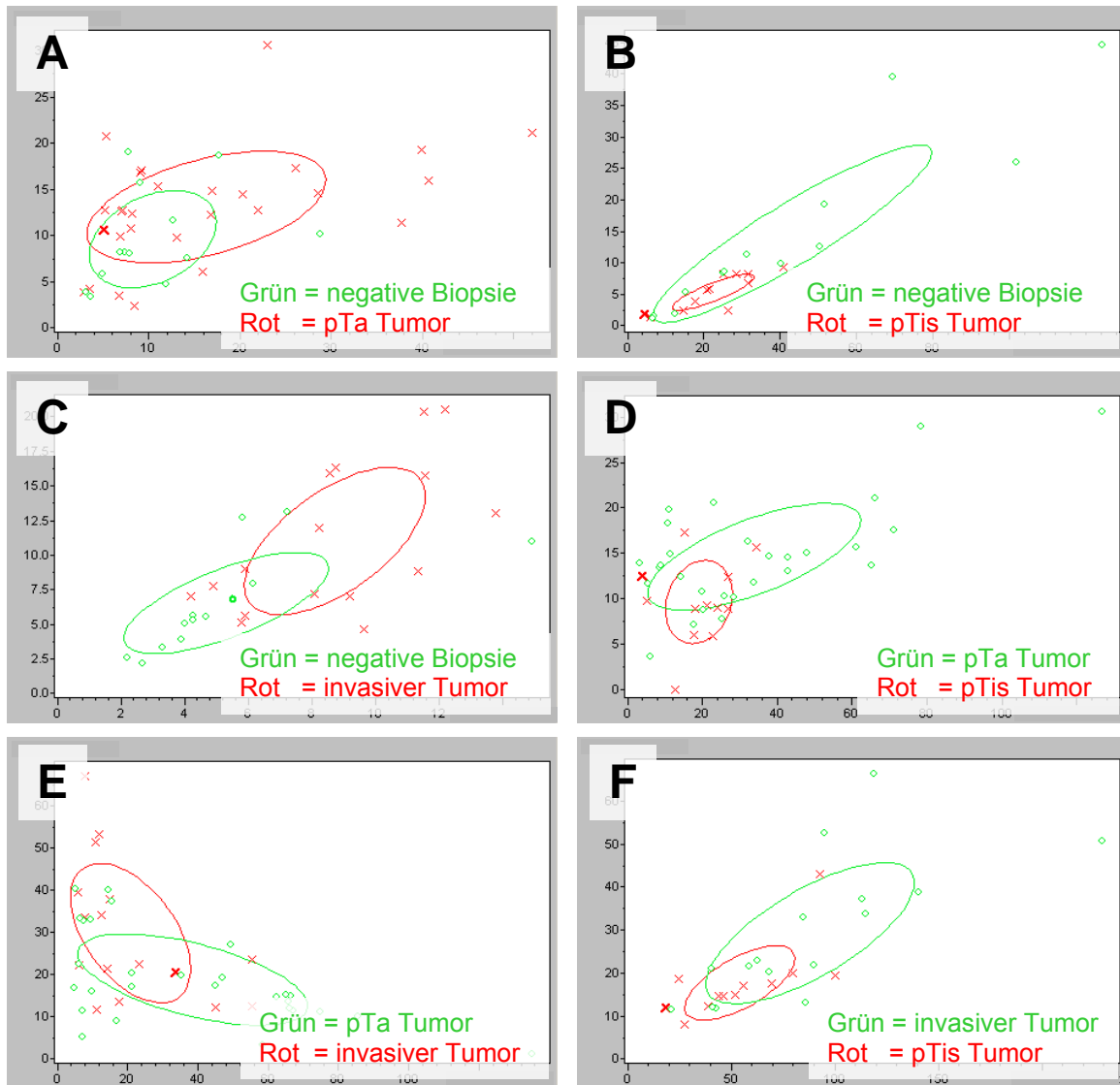


Abbildung 16: Graphische Gegenüberstellung der verschiedenen Stadien des Harnblasenkarzinoms (pTa, pTis und pT1+2) untereinander sowie gegenüber negativen Biopsien als sogenannter 2D-Blot.

3.2.1.2 Harnblasenkarzinompatienten versus Kontrollen

Zunächst wurden die Spektren aller Patienten mit histologisch gesichertem Harnblasenkarzinom (73) mit dem gemischten Kontrollkollektiv (60) und im Weiteren mit den gemischten Proben der Poliklinik (24) verglichen (vergleiche auch Tabelle 15). Die Patienten der Poliklinik zeigten unterschiedliche Erkrankungen, u.a. BPH (9), Nierenzellkarzinom (4), Inkontinenz (3), Zystitis (1) und Urolithiasis (1).

Die Auswertung erfolgte mit Hilfe der ClinProTools 2.0 Software sowie der XLminer-Software. Mit der Software konnten insgesamt 132 Peaks zwischen 1-20 kDa detektiert werden. Unter Verwendung der verschiedenen Algorithmen, basierend auf 5-23 Peaks, konnten Werte für die

Sensitivität von bis zu 99% und für die Spezifität von bis zu 98% erreicht werden. Eine Übersicht gibt Tabelle 17.

Tabelle 17: Sensitivität, Spezifität und Anzahl der Peaks für die verschiedenen Modelle im Vergleich bei der Differenzierung zwischen Patienten mit Harnblasenkarzinom und den gemischten Kontrollen bzw. den gemischten Patienten der Poliklinik; Ausgangsmaterial: Serum; Methode: MALDI, WCX-Beads.

Software bzw. Modell	Sensitivität [%]	Spezifität [%]	Anzahl der Peaks
HB-Ca versus Kontrollen			
ClinProTools 2.0			
GA	92,91	85,27	5
SVM	94,33	89,15	22
QC	96,45	94,57	23
Eigener GA 1	93,62	90,7	5
Eigener GA 2	96,45	93,8	7
XLminer	98,63	88,33	
HB-Ca versus Poliklinik			
ClinProTools 2.0			
GA	83,78	73,58	5
SVM	86,49	84,91	12
QC	91,89	73,58	18
Eigener GA	97,3	98,11	5

Daneben wurden die Patienten mit histologisch gesichertem Harnblasenkarzinom (pTa (29), pTis (19), pT1+2 (25)) getrennt nach ihrem T-Stadium mit dem gemischten Kontrollkollektiv verglichen.

Die Auswertung erfolgte ebenfalls mit Hilfe der ClinProTools 2.0 Software. Eine Übersicht über die erzielten Werte für Sensitivität und Spezifität sowie die Anzahl der für das jeweilige Modell verwendeten Peaks gibt Tabelle 18. Bei dem Modell „Eigener GA 1“ handelt es sich jeweils um das gleiche Modell für alle drei Klassifizierungen. Dabei fällt auf, daß die Klassifizierung mit zunehmendem T-Stadium des Tumors immer sicherer gelingt.

Tabelle 18: Sensitivität, Spezifität und Anzahl der Peaks für die verschiedenen Modelle im Vergleich bei Differenzierung zwischen pTa versus Kontrollen, pTis versus Kontrollen und pT1+2 versus Kontrollen; Ausgangsmaterial: Serum; Methode: MALDI, WCX-Beads.

Modell	Sensitivität [%]	Spezifität [%]	Anzahl der Peaks
pTa versus Kontrollen			
GA	75,47	89,76	5
SVM	77,36	98,43	12
Eigener GA 1	83,02	91,34	5
pTis versus Kontrollen			
GA	71,88	96,09	5
SVM	78,13	100	17
Eigener GA 1	90,63	91,41	5
pT1+2 versus Kontrollen			
GA	73,91	92,74	5
SVM	80,43	98,39	13
Eigener GA 1	95,65	95,97	5

In Abbildung 17 ist unter A das Summenspektrum aller Seren der Harnblasenkarzinompatienten (rot) und das Summenspektrum aller Seren der Personen des gemischten Kontrollkollektivs (grün) in einem repräsentativen Massenbereich dargestellt. Unter B ist der 2D-Blot dieser beiden Gruppen gezeigt (rot: Karzinompatienten, grün: Kontrollpersonen).

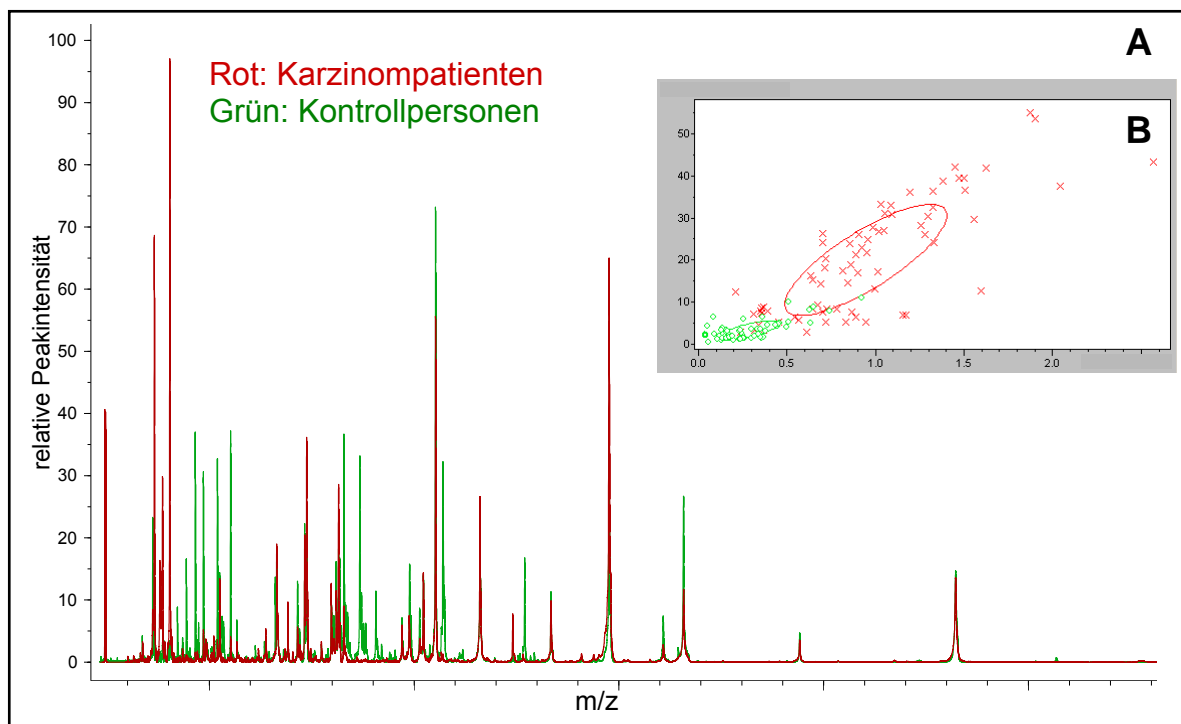


Abbildung 17: A: Summenspektren aller Patienten mit Harnblasenkarzinom (rot) und aller Personen der gemischten Kontrollgruppe (grün). B: Sogennanter 2D-Blot der Patienten mit Harnblasenkarzinom (rot) und aller Personen der gemischten Kontrollgruppe (grün). Fraktionierung mit WCX-Beads. Aufgrund eines laufenden Patentverfahrens zeigt die X-Achse keine Beschriftung.

3.2.1.3 Prostatakarzinompatienten

Es wurden die Spektren der Patienten mit Prostatakarzinom untereinander hinsichtlich ihres T-Stadiums (pT2 (27) und pT3 (26)), ihres Gleason score (Gleason score 6 (17), Gleason score 7 (26), Gleason score 9 (9)) und ihres PSA-Wertes (PSA <4 (10), PSA zwischen 4 und 10 (25) und PSA>10 (15)) verglichen (vergleiche auch Tabelle 15).

Die Auswertung erfolgte mit Hilfe der ClinProTools 2.0 Software. Eine Übersicht über die erzielten Werte für die Sensitivität sowie die Anzahl der für das jeweilige Modell verwendeten Peaks geben Tabelle 19 und Tabelle 20.

Tabelle 19: Sensitivität und Anzahl der Peaks für die verschiedenen Modelle im Vergleich bei Differenzierung zwischen den verschiedenen T-Stadien und Gleason scores; Ausgangsmaterial: Serum; Methode: MALDI, WCX-Beads.

Modell	Sensitivität Klasse 1 [%]	Sensitivität Klasse 2 [%]	Anzahl der Peaks
pT2 versus pT3			
GA	53,06	49,02	5
SVM	55,1	45,1	9
QC	71,43	52,94	13
Eigener GA	75,51	58,82	5
Gleason 6 versus 7			
GA	35,29	64,29	5
SVM	29,41	66,07	5
QC	35,29	60,71	21
Eigener GA	58,52	73,21	5
Gleason 6 versus 9			
GA	68,75	16,67	5
SVM	71,88	38,89	12
QC	62,5	33,33	5
Eigener GA	96,88	66,67	5
Gleason 7 versus 9			
GA	84,31	5,26	5
SVM	86,27	26,32	1
QC	82,35	47,37	13
Eigener GA	98,04	63,16	5

Tabelle 20: Sensitivität und Anzahl der Peaks für die verschiedenen Modelle im Vergleich bei Differenzierung zwischen den verschiedenen PSA-Werten; Ausgangsmaterial: Serum; Methode: MALDI, WCX-Beads.

Modell	Sensitivität Klasse 1 [%]	Sensitivität Klasse 2 [%]	Anzahl der Peaks
PSA 4-10 versus PSA <4			
GA	80	16	5
SVM	75,56	8	7
QC	66,67	60	14
Eigener GA	93,33	28	5
PSA >10 versus PSA <4			
GA	59,26	73,91	5
SVM	51,85	56,52	18
QC	44,44	86,96	2
Eigener GA	62,96	95,65	5
PSA >10 versus PSA 4-10			
GA	53,13	72,92	5
SVM	43,75	70,83	23
QC	93,75	66,67	3
Eigener GA	71,88	77,08	4

3.2.1.4 Prostatakarzinompatienten versus Kontrollen

Es wurden die Spektren der Prostatakarzinompatienten (54) mit den freiwilligen Spendern der Blutbank (66) und den männlichen Patienten der urologischen Poliklinik (39) verglichen (vergleiche auch Tabelle 15). Die Patienten der Poliklinik zeigten unterschiedliche Erkrankungen, u.a. Nierenzellkarzinom (9), Harnblasenkarzinom (6), Hodentumor (4), Peniskarzinom (1), Bronchialkarzinom (1), BPH (10) und andere nicht-tumoröse urologische Erkrankungen (8).

Die Auswertung erfolgte mit Hilfe der ClinProTools 2.0 Software sowie der XLminer-Software. Insgesamt konnten mit der Software 78 Peaks zwischen 1-20 kDa detektiert werden. Unter Verwendung der verschiedenen Algorithmen, basierend auf 5-9 Peaks, konnten Werte für die Sensitivität von bis zu 100% und für die Spezifität von bis zu 99% erreicht werden. Eine Übersicht gibt Tabelle 21.

Tabelle 21: Sensitivität, Spezifität und Anzahl der Peaks für die verschiedenen Modelle im Vergleich bei der Differenzierung zwischen Patienten mit Prostatakarzinom und Kontrollen der Blutbank sowie der urologischen Poliklinik; Ausgangsmaterial: Serum; Methode: MALDI, WCX-Beads.

Software bzw. Modell	Sensitivität [%]	Spezifität [%]	Anzahl der Peaks
PCa versus Blutbank			
ClinProTools 2.0			
GA	83,17	89,93	5
SVM	89,11	91,37	9
QC	97,03	86,33	5
Eigener GA 1	98,02	87,77	5
Eigener GA 2	97,03	87,77	3
XLminer	100	83,33	
PCa versus Poliklinik			
ClinProTools 2.0			
GA	97,92	83,33	5
SVM	98,96	84,52	1
QC	95,83	100	1
Eigener GA	100	98,81	5

In Abbildung 18 ist unter A in rot das Summenspektrum aller Seren der Prostatakarzinompatienten und in grün das Summenspektrum aller Seren der Patienten der urologischen Poliklinik in einem repräsentativen Massenbereich dargestellt. Die Fraktionierung des Serums erfolgte mit WCX-Beads. Unter B ist der sogenannte 2D-Blot dieser beiden Gruppen gezeigt (rot: Karzinompatienten, grün: Patienten der urologischen Poliklinik). Aufgrund eines laufenden Patentverfahrens zeigt die X-Achse keine Beschriftung. Im 2D-Blot läßt sich auch anhand von zwei Peaks aus dem „Eigenen GA“ eine gute Trennung der beiden Klassen erreichen, die an den auseinander liegenden Ellipsen beider Gruppen erkennbar ist. Aus Gründen des Patentverfahrens können auch hier die Peaks nicht genannt werden.

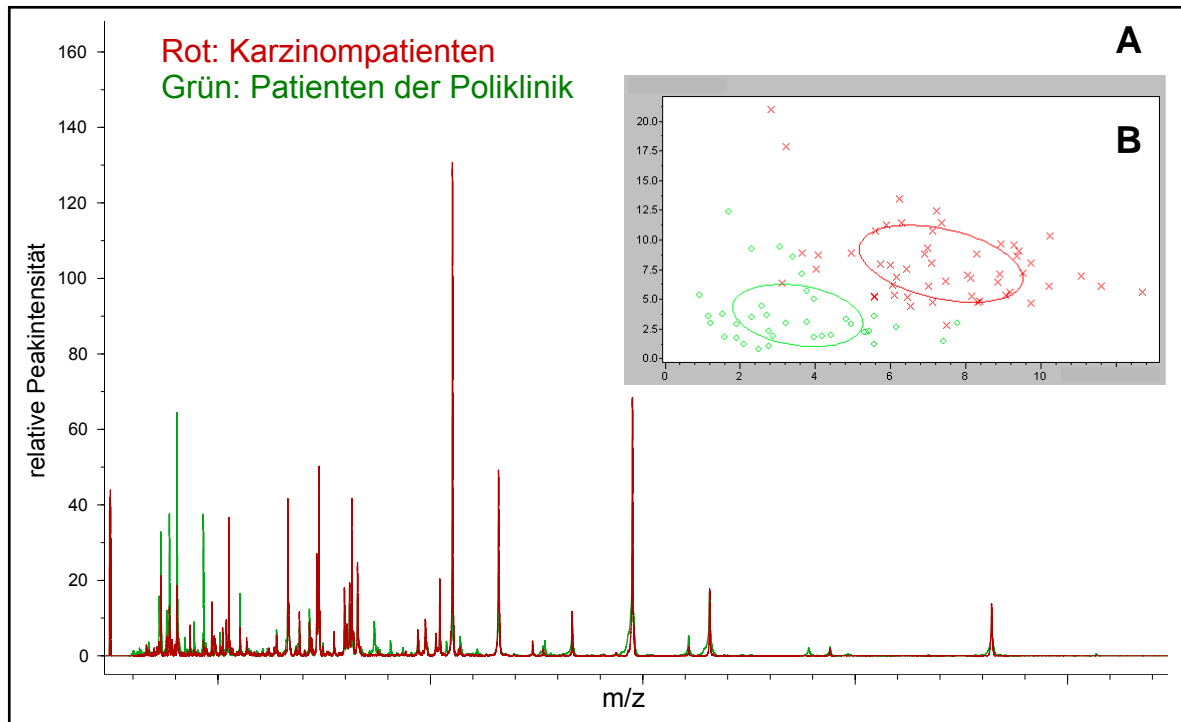


Abbildung 18: A: Summenspektren aller Patienten mit Prostatakarzinom (rot) und aller Patienten der urologischen Poliklinik (grün). B: 2D-Blot der Patienten mit Prostatakarzinom (rot) und aller Patienten der urologischen Poliklinik (grün). Fraktionierung mit WCX-Beads. Aufgrund eines laufenden Patentverfahrens zeigt die X-Achse keine Beschriftung.

3.2.1.5 Harnblasenkarzinompatienten versus Prostatakarzinompatienten

Es wurden die Spektren der männlichen Patienten mit histologisch gesichertem Harnblasenkarzinom (48) mit den Prostatakarzinompatienten (54) verglichen (vergleiche auch Tabelle 15).

Die Auswertung erfolgte mit Hilfe der ClinProTools 2.0 Software sowie der XLminer-Software. Es konnten mit der Software insgesamt 75 Peaks zwischen 1-20 kDa detektiert werden. Unter Verwendung der verschiedenen Algorithmen, basierend auf 5-16 Peaks, konnten Werte für die Sensitivität für das Prostatakarzinom von bis zu 100% und für das Harnblasenkarzinom von bis zu 97% erreicht werden. Eine Übersicht gibt Tabelle 22.

Tabelle 22: Sensitivität und Anzahl der verwendeten Peaks für die verschiedenen Modelle im Vergleich bei Differenzierung zwischen Patienten mit Prostatakarzinom (PCa) und Patienten mit Harnblasenkarzinom (HB-Ca); Ausgangsmaterial: Serum; Methode: MALDI, WCX-Beads.

Software bzw. Modell	Sensitivität PCa [%]	Sensitivität HB-Ca [%]	Anzahl der Peaks
ClinProTools 2.0			
GA	88,24	90,82	5
SVM	91,18	91,84	9
QC	81,37	87,76	16
Eigener GA	86,27	96,94	5
XLminer	100	75	

In Abbildung 19 sind in einer sogenannten *heat map* die Patienten mit Harnblasenkarzinom (unten) denen mit Prostatakarzinom (oben) gegenübergestellt.

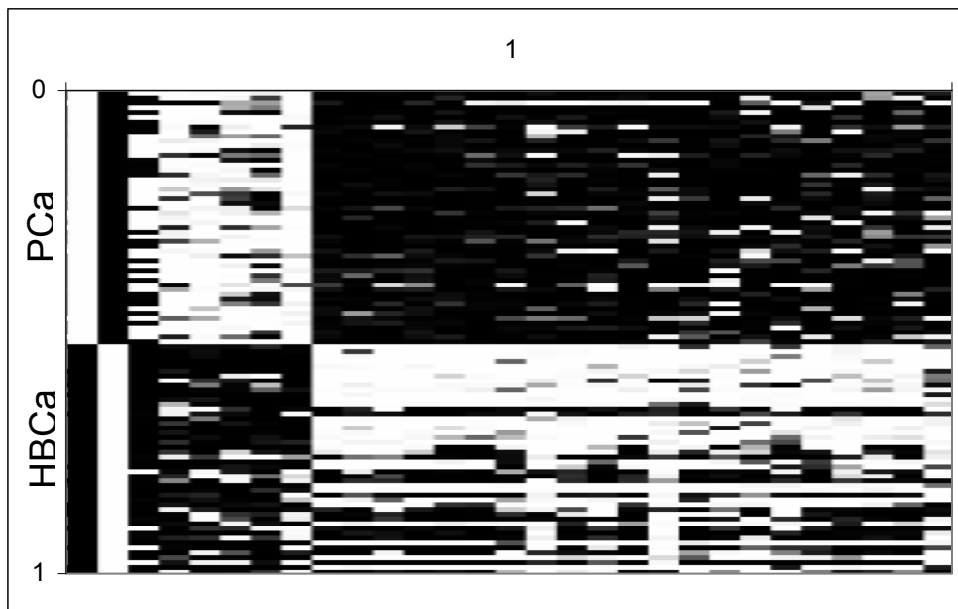


Abbildung 19: Graphische Darstellung der Differenzierung zwischen Patienten mit Prostatakarzinom (PCa, oben) und Patienten mit Harnblasenkarzinom (HBCa, unten) als sogenannte *heat map*.

3.2.1.6 Harnblasenkarzinompatienten versus Prostatakarzinompatienten versus Kontrollen

Es wurden die Spektren der männlichen Patienten mit histologisch gesichertem Harnblasenkarzinom (48) mit den Prostatakarzinompatienten (54) sowie den freiwilligen Spendern der Blutbank (66) verglichen (vergleiche auch Tabelle 15).

Die Auswertung erfolgte mit Hilfe der ClinProTools 2.0 Software sowie der XLminer-Software. Insgesamt konnten mit der Software 79 Peaks zwischen 1-20 kDa detektiert werden. Unter Verwendung der verschiedenen Algorithmen, basierend auf 5-25 Peaks, konnten Werte für die

Sensitivität der Erkennung des Prostatakarzinoms von bis zu 91%, der Erkennung des Harnblasenkarzinoms (HB-Ca) von bis zu 83% und der Erkennung der Kontrollen (männliche Blutspender) von bis zu 96% erreicht werden. Eine Übersicht gibt Tabelle 23.

Tabelle 23: Sensitivität und Anzahl der Peaks für die verschiedenen Modelle im Vergleich bei der Differenzierung zwischen Patienten mit Prostatakarzinom (PCa), Patienten mit Harnblasenkarzinom (HB-Ca) und Blutspendern; Ausgangsmaterial: Serum; Methode: MALDI, WCX-Beads.

Software bzw. Modell	Sensitivität PCa [%]	Sensitivität HB-Ca [%]	Sensitivität Kontrolle [%]	Anzahl der Peaks
ClinProTools 2.0				
GA	62,63	81,82	79,02	5
SVM	90,91	82,95	95,8	25
QC	77,78	72,73	81,82	17
Eigener GA	81,82	80,68	85,31	7
XLminer	88,68	72,92	71,21	

3.2.2 Serumfraktionierung mit WAX-Beads

Es wurden die Seren der Patienten mit histologisch gesichertem Prostatakarzinom und der freiwilligen männlichen Blutspender aus dem Institut für Klinische Chemie verwendet. Eine Übersicht über die Zusammensetzung der Kollektive gibt Tabelle 24.

Tabelle 24: Zusammensetzung und Durchschnittsalter der verschiedenen Kollektive.

Kollektiv	Anzahl	Durchschnittsalter
Prostatakarzinompatienten	55	63
pT2	27	62
pT3	27	64
pTx	1	76
Gleason 6	17	62
Gleason 7	26	65
Gleason 8	1	76
Gleason 9	10	62
Gleason X	1	49
Klinische Chemie	27	47

3.2.2.1 Prostatakarzinompatienten

Es wurden die Spektren der Patienten mit Prostatakarzinom untereinander hinsichtlich ihres T-Stadiums (pT2 (27) und pT3 (26)) und ihres Gleason score (Gleason 6 (17), Gleason 7 (26), Gleason 9 (9)) verglichen (vergleiche auch Tabelle 24).

Die Auswertung erfolgte mit Hilfe der ClinProTools 2.0 Software. Eine Übersicht über die erzielten Werte für die Sensitivität sowie die Anzahl der für das jeweilige Modell verwendeten Peaks geben Tabelle 25 und Tabelle 26.

Tabelle 25: Sensitivität und Anzahl der Peaks für die verschiedenen Modelle im Vergleich bei Differenzierung zwischen den verschiedenen T-Stadien und Gleason scores; Ausgangsmaterial: Serum; Methode: MALDI, WAX-Beads.

Modell	Sensitivität Klasse 1 [%]	Sensitivität Klasse 2 [%]	Anzahl der Peaks
pT2 versus pT3			
GA	42,59	46,43	5
SVM	44,44	44,64	8
QC	53,7	37,5	6
Eigener GA	59,26	57,14	2
Gleason 6 versus 7			
GA	44,12	55,36	5
SVM	47,06	60,71	9
QC	50	51,79	12
Eigener GA	73,53	71,43	6
Gleason 6 versus 9			
GA	58,06	21,05	5
SVM	80,65	57,89	1
QC	87,1	36,84	15
Eigener GA	90,32	78,95	1
Gleason 7 versus 9			
GA	72	35	5
SVM	76	35	8
QC	52	70	6
Eigener GA	80	55	1

Tabelle 26: Sensitivität und Anzahl der Peaks für die verschiedenen Modelle im Vergleich bei Differenzierung zwischen den drei verschiedenen Gleason scores; Ausgangsmaterial: Serum; Methode: MALDI, WAX-Beads.

Modell	Sensitivität Gleason 6 [%]	Sensitivität Gleason 7 [%]	Sensitivität Gleason 9 [%]	Anzahl der Peaks
GA	15,63	49,02	17,65	5
SVM	28,13	52,94	5,88	11
QC	46,88	35,29	12,53	12
Eigener GA	53,33	56,86	47,06	3

3.2.2.2 Prostatakarzinompatienten versus Kontrollen

Es wurden die Spektren der Prostatakarzinompatienten (54) mit den freiwilligen männlichen Spendern des Institutes für Klinische Chemie (27) verglichen (vergleiche auch Tabelle 24).

Die Auswertung erfolgte mit Hilfe der ClinProTools 2.0 Software. Es konnten insgesamt mit der Software 54 Peaks zwischen 1-20 kDa detektiert werden. Unter Verwendung der verschiedenen Algorithmen, basierend auf 5-24 Peaks, konnten Werte für die Sensitivität von bis zu 99% und für die Spezifität von bis zu 92% erreicht werden. Eine Übersicht gibt Tabelle 27.

Tabelle 27: Sensitivität, Spezifität und Anzahl der Peaks für die verschiedenen Modelle im Vergleich bei der Differenzierung zwischen Patienten mit Prostatakarzinom und Kontrollen; Ausgangsmaterial: Serum; Methode: MALDI, WAX-Beads.

Modell	Sensitivität [%]	Spezifität [%]	Anzahl der Peaks
PCa versus Klinische Chemie			
GA	97,12	69,44	5
SVM	97,12	55,56	24
QC	88,46	83,33	18
Eigener GA	99,04	91,67	5

In Abbildung 20 ist unter A in rot das Summenspektrum aller Seren der Prostatakarzinompatienten und in grün das Summenspektrum aller Seren der freiwilligen Spender des Institutes für Klinische Chemie in einem repräsentativen Massenbereich dargestellt. Die Fraktionierung des Serums erfolgte mit WAX-Beads. Unter B ist der sogenannte 2D-Blot dieser beiden Gruppen gezeigt (rot: Karzinompatienten, grün: freiwillige Spender des Institutes für Klinische Chemie). Aufgrund eines laufenden Patentverfahrens zeigt die X-Achse keine Beschriftung. Im 2D-Blot lässt sich auch anhand von zwei Peaks eine gute Trennung der beiden Klassen erreichen, die an den auseinander liegenden Ellipsen der beiden Gruppen erkennbar ist. Aus Gründen des Patentverfahrens können auch hier die Peaks nicht genannt werden.

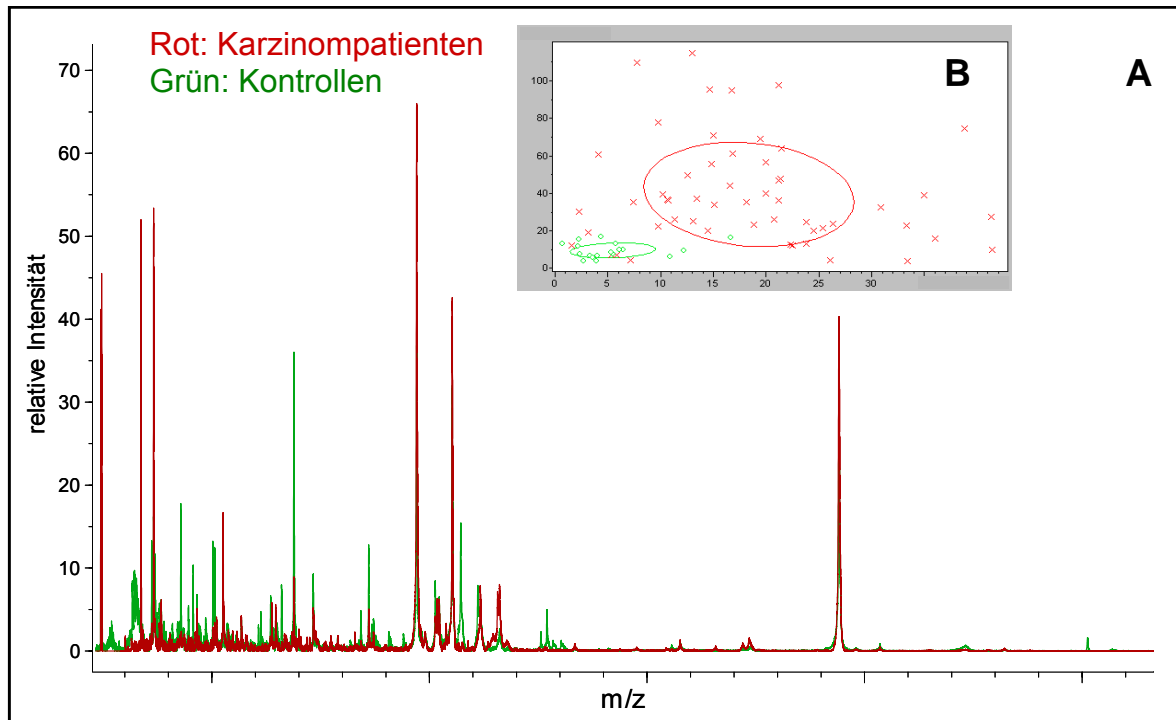


Abbildung 20: A: Summenspektren aller Patienten mit Prostatakarzinom (rot) und aller freiwilligen Spender des Institutes für Klinische Chemie (grün). B: 2D-Blot der Patienten mit Prostatakarzinom (rot) und aller freiwilligen Spender des Institutes für Klinische Chemie (Kontrollen, grün). Fraktionierung mit WAX-Beads. Aufgrund eines laufenden Patentverfahrens zeigt die X-Achse keine Beschriftung.

3.3 SELDI-TOF-MS

3.3.1 Matrixsubstanzen

Auf der Oberfläche CM10 wurden verschiedene Matrixsubstanzen und deren Kombinationen in unterschiedlichen Konzentrationen ausgetestet: sinapic acid (SA, Fluka), sinapinic acid (SPA, Sigma und CIPHERGEN), cinnamic acid (CHCA, Sigma und CIPHERGEN) sowie Kombinationen (1:1, 1:3 and 3:1 Mischung von SPA und CHCA (Sigma) und 1:1:1 Mischung von SA, SPA und CHCA (Sigma)). Eine Übersicht über die erzielten Ergebnisse hinsichtlich der Anzahl der Peaks und der Gesamtintensität aller Peaks bei drei verschiedenen Laserintensitäten (125, 150 und 175) zeigt Abbildung 21. Hierbei zeigte sich die CHCA-Matrix als die beste Substanz, da sie auch schon bei niedriger Laserintensität eine gute Anzahl an Peaks zeigte.

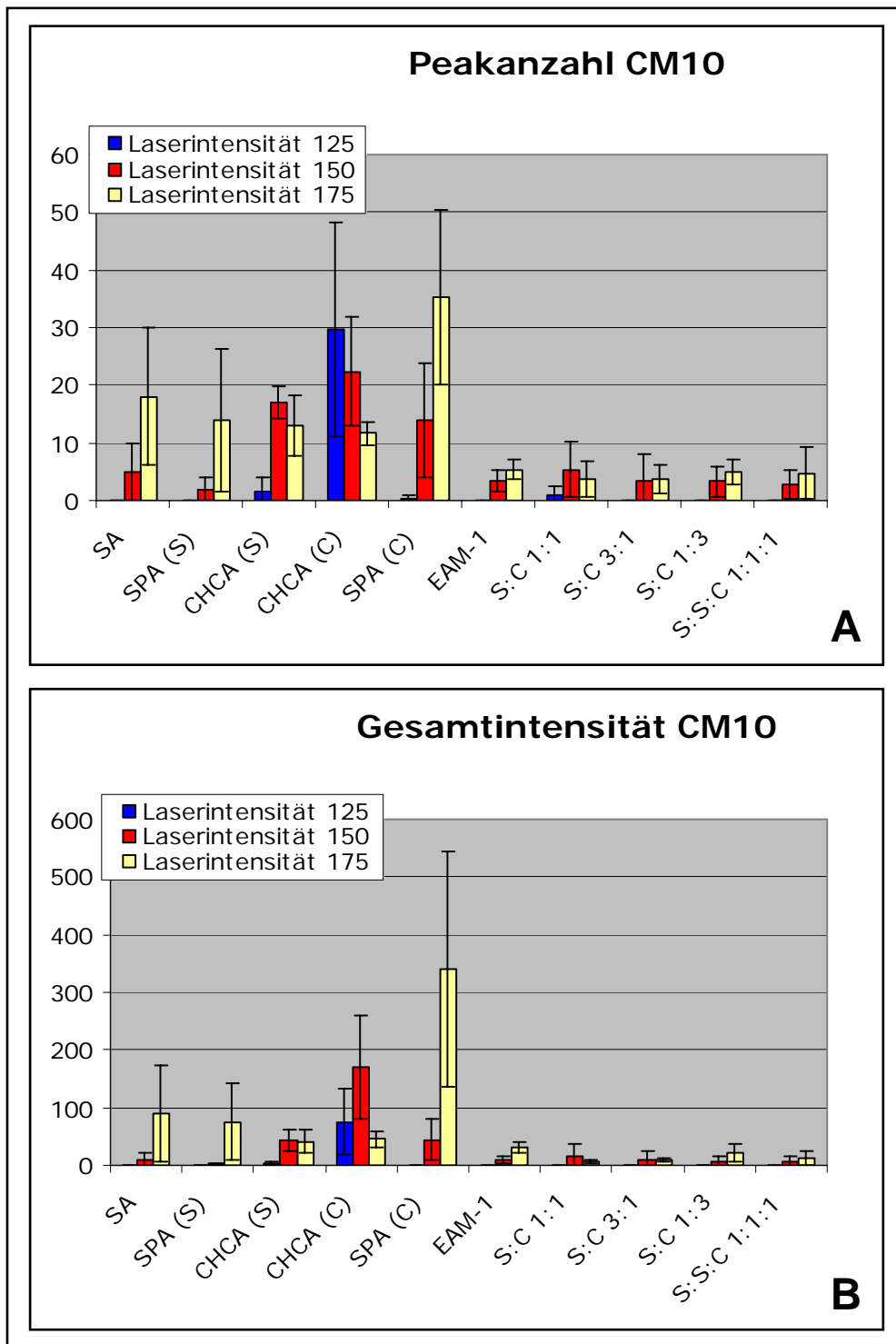


Abbildung 21: Graphische Gegenüberstellung der verschiedenen Matrixsubstanzen (SA: sinapic acid, SPA: sinapinic acid (S: Sigma und C: Ciphergen), CHCA: cinnamic acid (S: Sigma und C: Ciphergen)) sowie verschiedener Kombinationen (1:1, 1:3 and 3:1 Mischung von SPA und CHCA (Sigma) und 1:1:1 Mischung von SA, SPA und CHCA (Sigma)) im Hinblick auf die Anzahl der Peaks und die Gesamtintensität aller Peaks bei den Laserintensitäten 125, 150 und 175. Chipoberfläche jeweils CM10.

In Abbildung 22 sind exemplarisch Fluoreszenzbilder (vierfache Vergrößerung) der CHCA-Matrix (A), SPA-Matrix (B) sowie zweier Mischungen aus beiden (CHCA : SPA 1:1 (C) und 3:1 (D)) gezeigt.

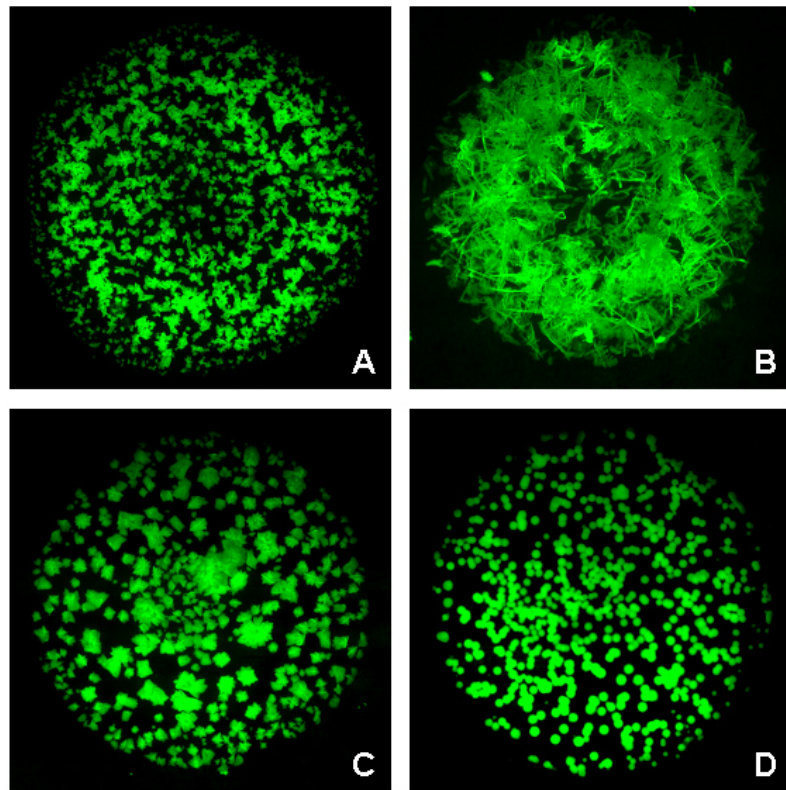


Abbildung 22: Exemplarische Fluoreszenzbilder der Matrixsubstanzen und ihrer Mischungen nach Auskristallisierung. A: CHCA, B: SPA, C: CHCA : SPA 1:1 und D: CHCA : SPA 3:1. Vergrößerung: vierfach.

3.3.2 Serumfraktionierung mit CM10 ProteinChips

Es wurden Seren der TUR-Patienten mit histologisch gesichertem Harnblasenkarzinom (20) und Seren von Patienten der urologischen Poliklinik (24) miteinander verglichen. Von den Patienten mit Harnblasenkarzinom wiesen 6 Patienten einen pTa-Tumor, 5 ein Carcinoma in situ und 9 einen invasiven Tumor (pT1+2) auf. Die Patienten der Poliklinik zeigten zum Zeitpunkt der Probengewinnung verschiedene tumoröse und nicht-tumoröse urologische Erkrankungen. Das Durchschnittsalter der Patienten mit Harnblasenkarzinom betrug 68 Jahre und das der Patienten der Poliklinik 61 Jahre.

Die Spektren wurden in die ClinProTools 2.0 Software importiert und mit dieser ausgewertet, um die SELDI-Spektren mit den MALDI-Spektren vergleichen zu können. Insgesamt konnten mit der Software 147 Peaks zwischen 1-20 kDa detektiert werden. Unter Verwendung der verschiedenen Algorithmen, basierend auf 2-16 Peaks, konnten Werte für die Sensitivität von bis zu 70% und für die Spezifität von bis zu 70% erreicht werden. Eine Übersicht gibt Tabelle 28.

Tabelle 28: Sensitivität, Spezifität und Anzahl der Peaks für die verschiedenen Modelle im Vergleich bei der Differenzierung zwischen Patienten mit Harnblasenkarzinom und Patienten der Poliklinik; Ausgangsmaterial: Serum; Methode: SELDI, CM10 ProteinChips.

Modell	Sensitivität [%]	Spezifität [%]	Anzahl der Peaks
GA	56,76	64,15	5
SVM	43,24	71,7	16
QC	64,86	35,85	5
Eigener GA	70,27	69,81	2

In Abbildung 23 sind exemplarisch SELDI-Spektren von vier verschiedenen Patientenseren als reguläres Spektrum (A) sowie als sogenannter *gel view* (B) gezeigt.

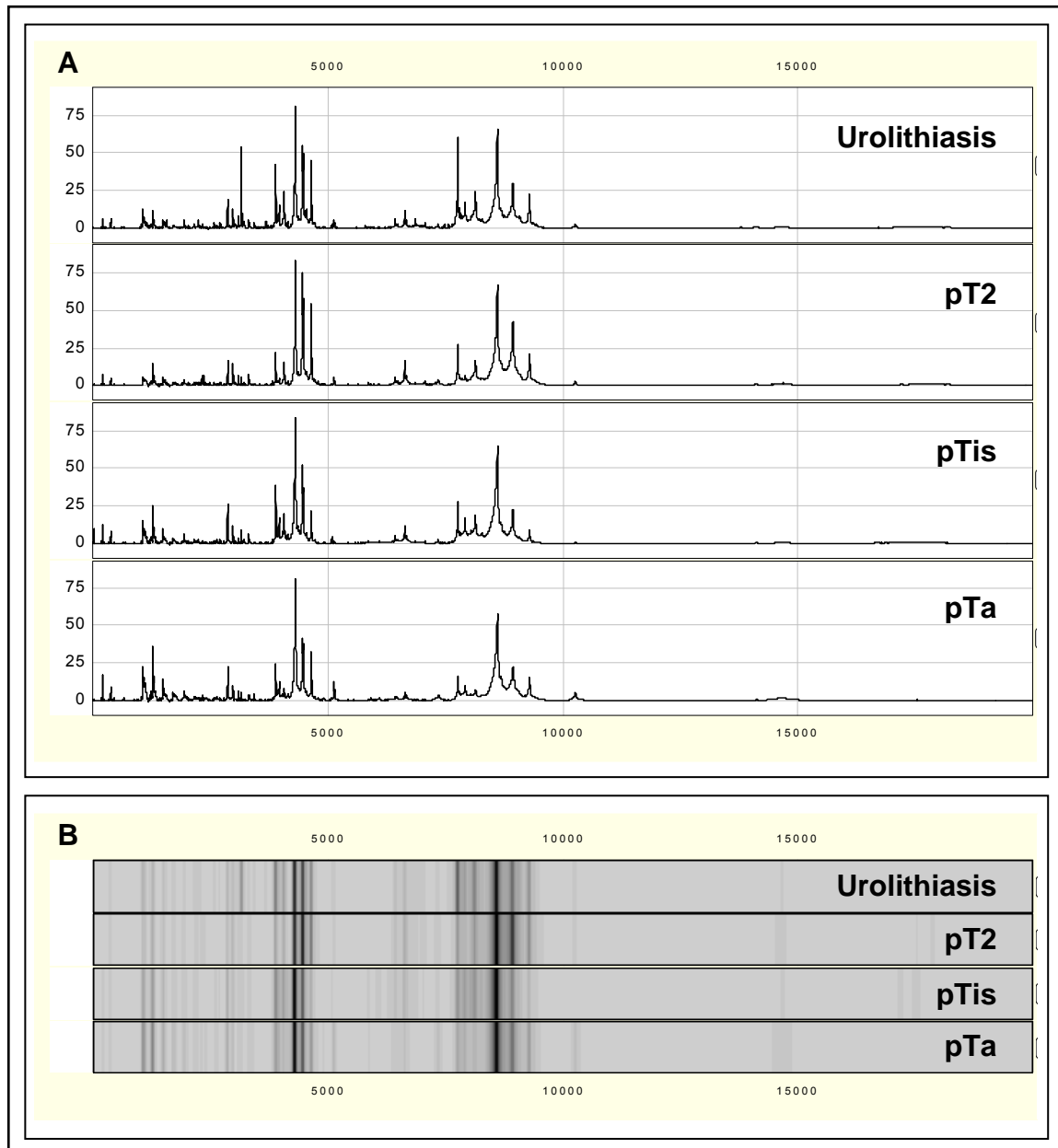


Abbildung 23: Vier exemplarische SELDI-Spektren im Bereich von 1-20 kDa als reguläres Spektrum (A) und als sogenannter *gel view* (B).

3.3.3 Urinfraktionierung mit CM10 ProteinChips

Es wurden Urinproben der TUR-Patienten mit histologisch gesichertem Harnblasenkarzinom (8) und Urinproben von Patienten der urologischen Poliklinik (8) miteinander verglichen. Von den Patienten mit Harnblasenkarzinom wiesen 3 Patienten einen pTa-Tumor, 2 ein Carcinoma in situ und 3 einen invasiven Tumor (pT1+2) auf. Die Patienten der Poliklinik zeigten zum

Zeitpunkt der Probengewinnung verschiedene nicht-tumoröse urologische Erkrankungen. Das Durchschnittsalter der Patienten mit Harnblasenkarzinom betrug 60 Jahre und das der Patienten der Poliklinik 71 Jahre.

Die Spektren wurden für die Auswertung in die ClinProTools 2.0 Software importiert. Unter Verwendung der verschiedenen Algorithmen, basierend auf 1-9 Peaks, konnten Werte für die Sensitivität von bis zu 100% und für die Spezifität von bis zu 78% erreicht werden. Eine Übersicht gibt Tabelle 29.

Tabelle 29: Sensitivität, Spezifität und Anzahl der Peaks für die verschiedenen Modelle im Vergleich bei der Differenzierung zwischen Patienten mit Harnblasenkarzinom und Patienten der Poliklinik; Ausgangsmaterial: Urin; Methode: SELDI, CM10 ProteinChips.

Modell	Sensitivität [%]	Spezifität [%]	Anzahl der Peaks
GA	64,71	60,87	5
SVM	52,94	69,57	1
QC	71,43	35,71	9
Eigener GA	100	78,26	1

3.4 Vergleich MALDI- versus SELDI-TOF-MS

Die Seren der TUR-Patienten mit histologisch gesichertem Harnblasenkarzinom (20) und Seren von Patienten der urologischen Poliklinik (24) wurden sowohl mittels MALDI-TOF-MS (nach vorheriger WCX-Beads basierter Fraktionierung) als auch mittels SELDI-TOF-MS (CM10 ProteinChips) untersucht. Die WCX-Beads und die CM10 ProteinChips zeichnen sich durch ähnliche Oberflächeneigenschaften aus, beide sind schwache Kationenaustauscher. In Abbildung 24 sind die beiden Analyseverfahren mit Hilfe der ClinProTools 2.0 Software einander gegenübergestellt (A: SELDI-Summenspektren, A': 2D-Blot SELDI, B: MALDI-Summenspektren, B': 2D-Blot MALDI).

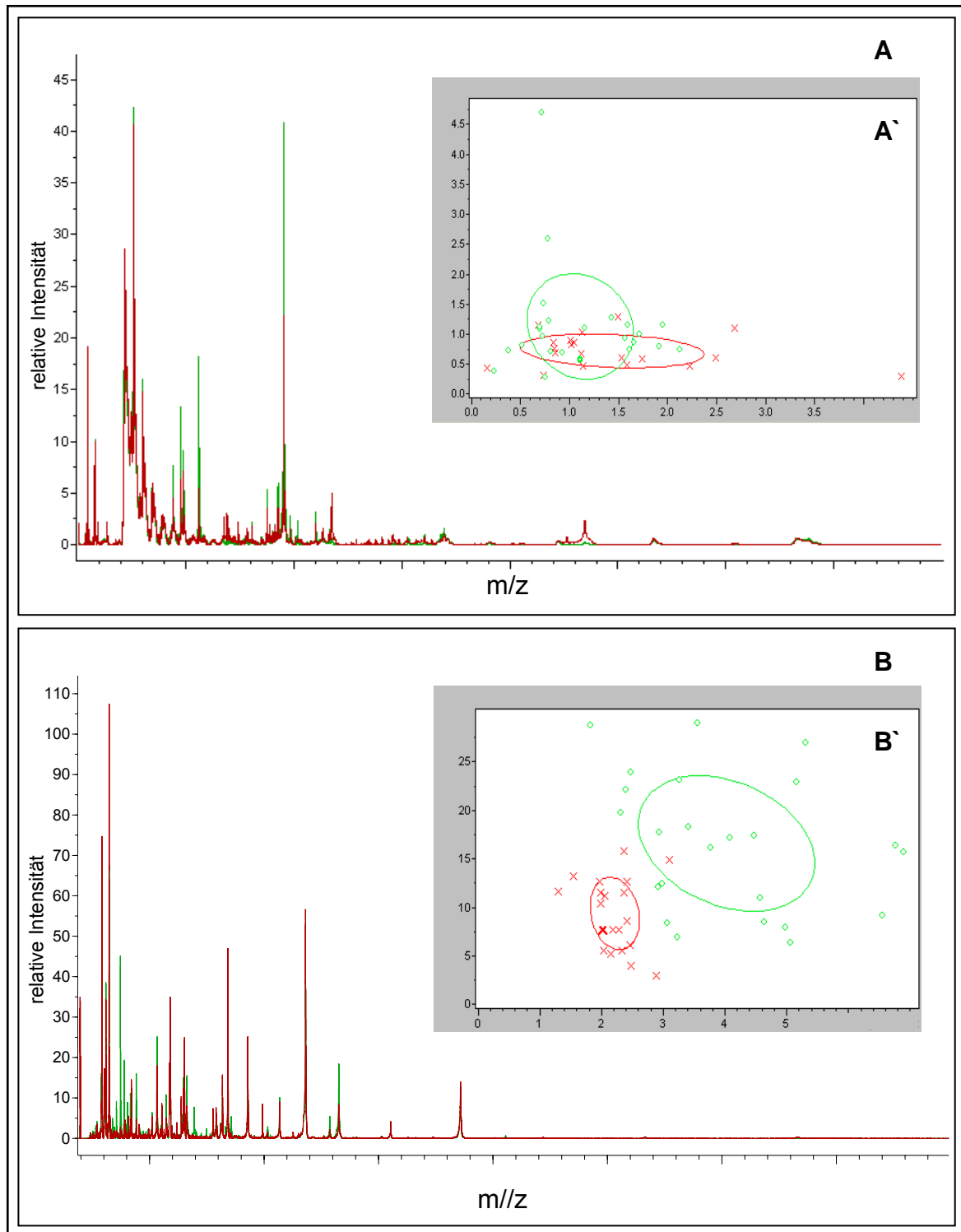


Abbildung 24: Vergleich der Ergebnisse der Analyse der Seren von Harnblasenkarzinompatienten (rot) und von Patienten der urologischen Poliklinik (Kontrollen, grün) mittels SELDI-TOF-MS (A) und MALDI-TOF-MS (B). A+B: jeweils Summenspektren der beiden Gruppen, A'+B': jeweils 2D-Blot der beiden Gruppen. Aufgrund eines laufenden Patentverfahrens zeigt die X-Achse keine Beschriftung.

3.5 MALDI imaging

3.5.1 Harnblasenbiopsien

Es wurden insgesamt 41 Gefrierschnitte von Harnblasenbiopsien verwendet, die im Rahmen einer TUR gewonnen wurden. Dabei wurden 10 Proben mit Normalurothel, 10 Proben mit einem *low-grade* papillären Tumor (pTa, G1), 10 Proben mit einem Carcinoma in situ (pTis) und 11 Proben mit einem invasiven Urothelkarzinom (pT1+2) untereinander verglichen.

3.5.1.1 Normalurothel versus alle Tumoren

Hierbei wurden alle Tumoren zusammen als eine Klasse definiert und mit den Normalurothelproben verglichen. Die Spektren wurden für die Auswertung in die ClinProTools 2.0 Software importiert. Insgesamt konnten mit der Software 118 Peaks detektiert werden. Unter Verwendung der verschiedenen Algorithmen, basierend auf 1-23 Peaks, konnten Werte für die Sensitivität von bis zu 98% und für die Spezifität von bis zu 100% erreicht werden. Eine Übersicht gibt Tabelle 30.

Tabelle 30: Sensitivität, Spezifität und Anzahl der Peaks für die verschiedenen Modelle im Vergleich bei der Differenzierung zwischen Normalurothel und allen Tumoren; Ausgangsmaterial: Gewebe; Methode: MALDI imaging.

Modell	Sensitivität [%]	Spezifität [%]	Anzahl der Peaks
GA	97,74	14,49	1
SVM	97,32	44,88	23
QC	48,26	100	1
Eigener GA	95,01	51,94	6

In Abbildung 25 sind unter A die Summenspektren der *regions of interest* (ROIs) aller Tumorpräparate (rot) und die Summenspektren der ROIs aller Normalurothelproben (grün) im Bereich zwischen 1-10 kDa dargestellt. Die Pfeile markieren die Peaks, die für den „Eigener GA“ herangezogen wurden. Abbildung 25 B zeigt im selben Massenbereich die Summenspektren aller ROIs aller Normalurothelproben (grün) sowie aller Tumorpräparate getrennt nach ihrem T-Stadium: invasive Karzinome (pT1+2 = rot), Carcinoma in situ (pTis = gelb) und papilläre Tumoren (pTa, G1 = blau).

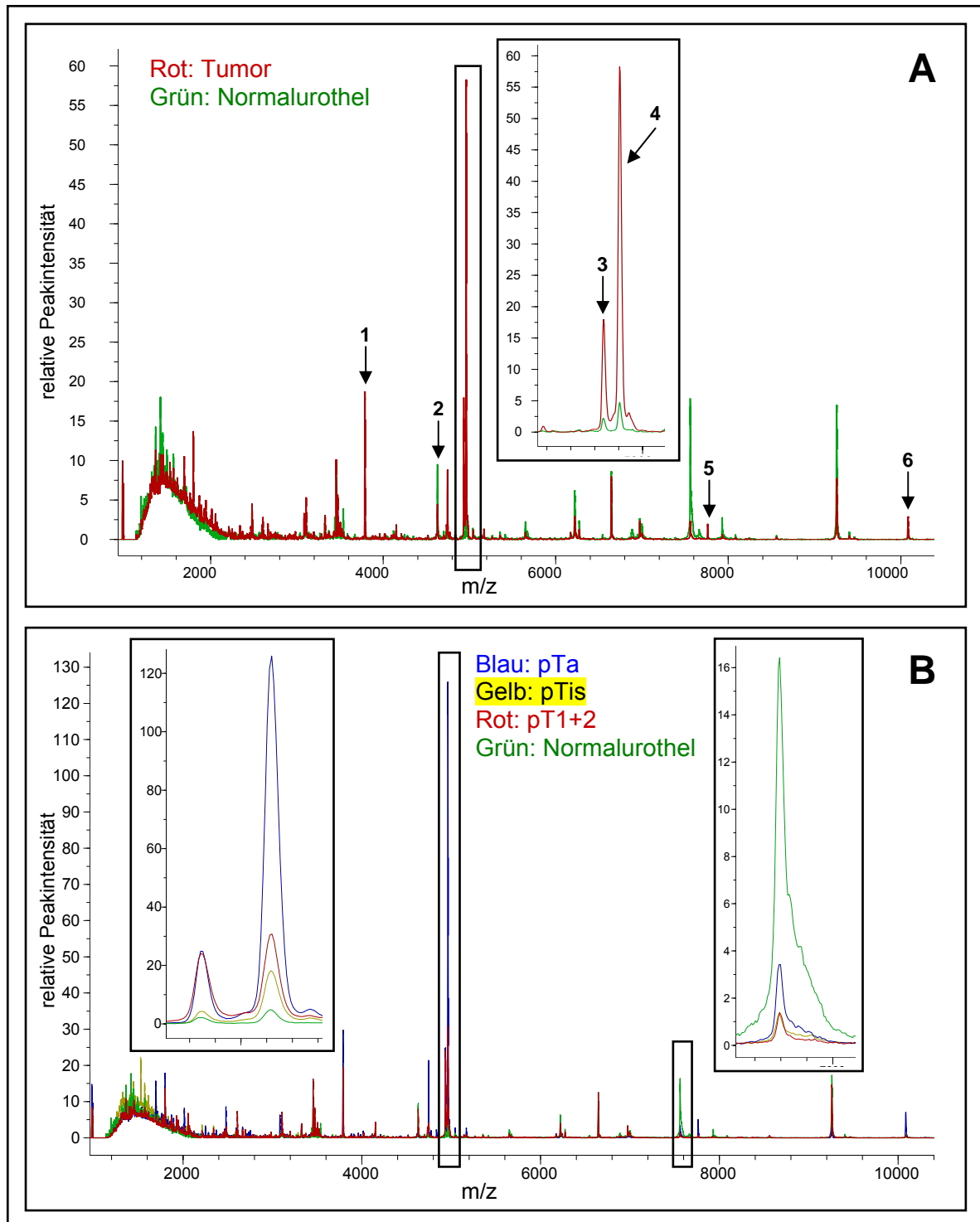


Abbildung 25: A: Summenspektren aller ROIs der Tumorpräparate (rot) im Vergleich zu allen ROIs der Normalurothelproben (grün); die Pfeile markieren die 6 Peaks des „Eigenen GA“; der Einschub zeigt einen relevanten Bereich in höherer Vergrößerung. B: Summenspektren aller ROIs der Normalurothelproben (grün) im Vergleich zu den verschiedenen, nach ihrem T-Stadium getrennten Tumoren (rot:pT1+2, blau: pTa, gelb:pTis); die Einschübe zeigen jeweils einen relevanten Bereich in höherer Vergrößerung.

3.5.1.2 Normalurothel versus papilläre Tumoren

Die Spektren wurden für die Auswertung in die ClinProTools 2.0 Software importiert. Unter Verwendung der verschiedenen Algorithmen konnten Werte für die Sensitivität von bis zu 95% und für die Spezifität von bis zu 100% erreicht werden. Eine Übersicht gibt Tabelle 31.

Tabelle 31: Sensitivität, Spezifität und Anzahl der Peaks für die verschiedenen Modelle im Vergleich bei der Differenzierung zwischen Normalurothel und pTa, G1 Tumoren; Ausgangsmaterial: Gewebe; Methode: MALDI imaging.

Modell	Sensitivität [%]	Spezifität [%]	Anzahl der Peaks
GA	86,11	34,78	5
SVM	95,05	82,61	13
QC	59,7	100	5
Eigener GA	93,81	95,26	5

3.5.1.3 Normalrothel versus Carcinoma in situ

Für die Auswertung wurden die Spektren in die ClinProTools 2.0 Software importiert. Unter Verwendung der verschiedenen Algorithmen konnten Werte für die Sensitivität von bis zu 82% und für die Spezifität von bis zu 85% erreicht werden. Eine Übersicht gibt Tabelle 32.

Tabelle 32: Sensitivität, Spezifität und Anzahl der Peaks für die verschiedenen Modelle im Vergleich bei der Differenzierung zwischen Normalurothel und Carcinoma in situ; Ausgangsmaterial: Gewebe; Methode: MALDI imaging.

Modell	Sensitivität [%]	Spezifität [%]	Anzahl der Peaks
GA	66,2	57,88	5
SVM	82,4	83,9	25
QC	67,6	78,77	1
Eigener GA	76,82	84,93	5

3.5.1.4 Normalurothel versus invasive Tumoren

Die Spektren wurden für die Auswertung in die ClinProTools 2.0 Software importiert. Insgesamt konnten mit der Software 136 Peaks zwischen 1-20 kDa detektiert werden. Unter Verwendung der verschiedenen Algorithmen konnten Werte für die Sensitivität von bis zu 93% und für die Spezifität von bis zu 100% erreicht werden. Eine Übersicht gibt Tabelle 33.

Tabelle 33: Sensitivität, Spezifität und Anzahl der Peaks für die verschiedenen Modelle im Vergleich bei der Differenzierung zwischen Normalurothel und invasivem Urothelkarzinom; Ausgangsmaterial: Gewebe; Methode: MALDI imaging.

Modell	Sensitivität [%]	Spezifität [%]	Anzahl der Peaks
GA	85,96	44,28	5
SVM	91,4	90,87	23
QC	54,76	100	1
Eigener GA	93,37	90,04	6

3.5.1.5 Graphische Darstellungen der Tumorstadien im Vergleich zum Normalurothel

Mittels der generierten Algorithmen konnten die Spektren an den einzelnen Messpunkten jedes Schnittpräparates in eine der zwei Klassen, Karzinom oder Normal, gruppiert werden. In Abbildung 26 ist exemplarisch das Ergebnis der Klassifikation, das sogenannte *class image* (C, D, G und H), vierer repräsentativer Schnittpräparate unter Anwendung des jeweils besten Algorithmus dargestellt. Die Bilder A, B, E und F zeigen in der H&E-Färbung erkennbar eine Biopsie mit normaler urothelialer Überkleidung (A), multiple Biopsien mit einem *low-grade* papillären Tumor (pTa, G1; B), eine Biopsie mit Carcinoma in situ (pTis; E) und drei Biopsien mit Anteilen eines invasiven Urothelkarzinoms (pT2; F) sowie jeweils eine Ausschnittsvergrößerung der relevanten Bereiche. Bei den *class images* (C, D, G und H) stehen rote Pixels für das Karzinom und grüne für normales Gewebe. Schwarze Pixel sind durch unklassifizierbare Spektren bedingt. Die H&E-Bilder sowie die *class images* entsprechen identischen Schnittpräparaten, da die H&E-Färbung nach der massenspektrometrischen Analyse erfolgte.

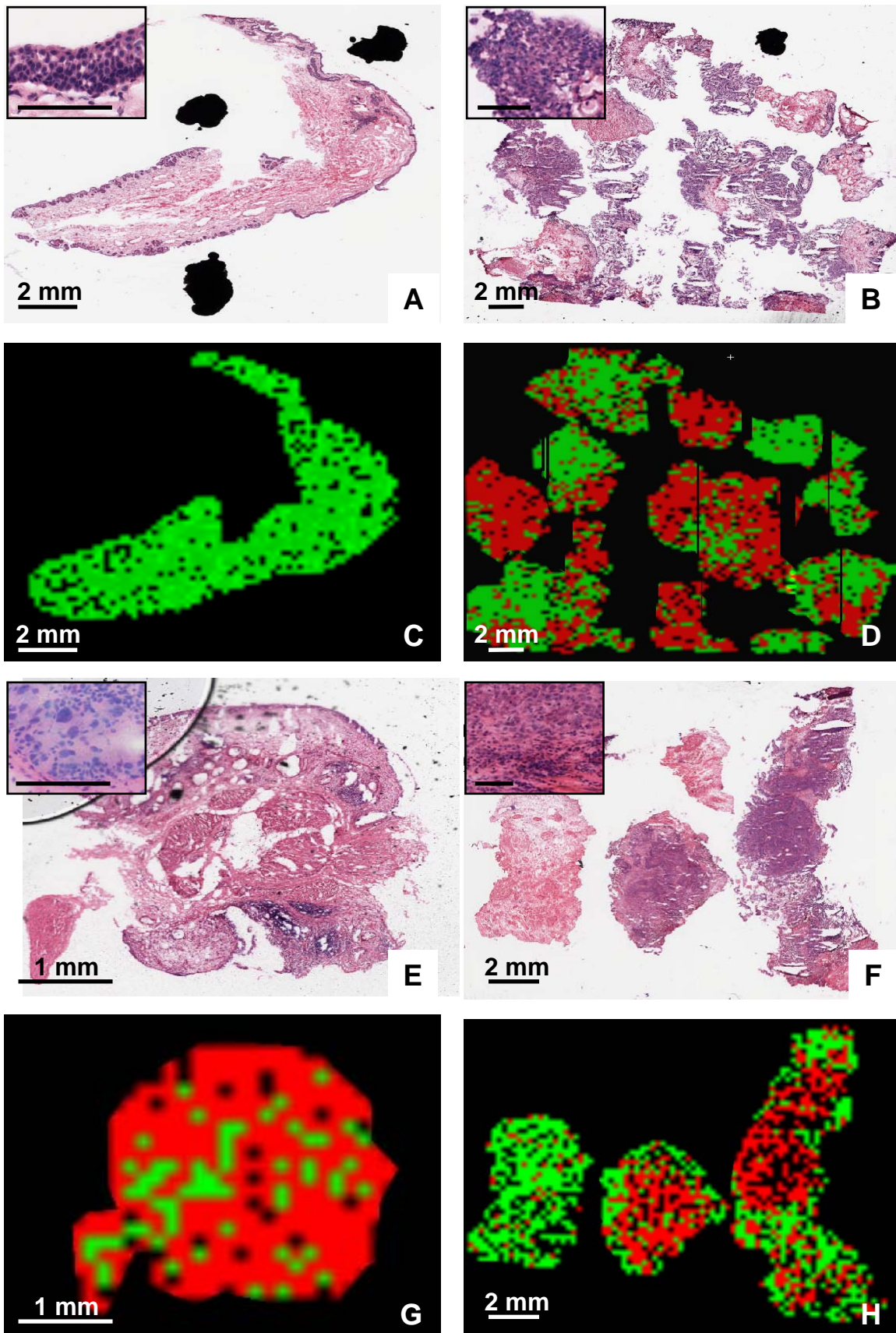


Abbildung 26: Repräsentative H&E-Bilder sowie korrespondierende *class images* je einer Normalurothelprobe (A+C), eines *low-grade* papillären Karzinoms (B+D), eines Carcinoma in situ (E+G) und eines invasiven Karzinoms (F+H). Die Einschübe zeigen jeweils eine Ausschnittsvergrößerung des H&E-Bildes, der Balken entspricht 100 μ m. Das Karzinom ist durch rote Pixel, normales Gewebe durch grüne und unklassifizierbare Spektren sind durch schwarze dargestellt.

3.5.1.6 Papilläre Tumoren versus Carcinoma in situ

Für die Auswertung wurden die Spektren in die ClinProTools 2.0 Software importiert. Unter Verwendung der verschiedenen Algorithmen konnten Werte für die Sensitivität von bis zu 95% und für die Spezifität von bis zu 88% erreicht werden. Eine Übersicht gibt Tabelle 34.

Tabelle 34: Sensitivität, Spezifität und Anzahl der Peaks für die verschiedenen Modelle im Vergleich bei der Differenzierung zwischen *low-grade* papillären Tumoren und Carcinoma in situ; Ausgangsmaterial: Gewebe; Methode: MALDI imaging.

Modell	Sensitivität pTa, G1 [%]	Sensitivität pTis [%]	Anzahl der Peaks
GA	87,32	64,67	5
SVM	94,83	86,75	24
QC	78,27	88,01	4
Eigener GA	90,69	76,03	7

3.5.1.7 Papilläre Tumoren versus invasive Tumoren

Die Auswertung erfolgte mit der ClinProTools 2.0 Software, in welche die Spektren importiert wurden. Unter Verwendung der verschiedenen Algorithmen konnten Werte für die Sensitivität von bis zu 90% und für die Spezifität von bis zu 89% erreicht werden. Eine Übersicht gibt Tabelle 35.

Tabelle 35: Sensitivität, Spezifität und Anzahl der Peaks für die verschiedenen Modelle im Vergleich bei der Differenzierung zwischen *low-grade* papillären Tumoren und invasiven Tumoren; Ausgangsmaterial: Gewebe; Methode: MALDI imaging.

Modell	Sensitivität pTa, G1 [%]	Sensitivität pT1+2 [%]	Anzahl der Peaks
GA	76,37	70,58	5
SVM	90,12	89,07	21
QC	83,31	77,87	16
Eigener GA	89,59	85,7	7

3.5.1.8 Carcinoma in situ versus invasive Tumoren

Die Spektren wurden für die Auswertung in die ClinProTools 2.0 Software importiert. Unter Verwendung der verschiedenen Algorithmen konnten Werte für die Sensitivität von bis zu 93% und für die Spezifität von bis zu 89% erreicht werden. Eine Übersicht gibt Tabelle 36.

Tabelle 36: Sensitivität, Spezifität und Anzahl der Peaks für die verschiedenen Modelle im Vergleich bei der Differenzierung zwischen Carcinoma in situ und invasivem Urothelkarzinom; Ausgangsmaterial: Gewebe; Methode: MALDI imaging.

Modell	Sensitivität pT1+2 [%]	Sensitivität pTis [%]	Anzahl der Peaks
GA	88,41	69,21	5
SVM	92,99	89,21	23
QC	78,47	85,4	7
Eigener GA	87,01	85,4	8

3.5.1.9 Exemplarische *mass images* für einen papillären Tumor

Mit Hilfe der FlexImaging Software konnten für die Präparate sogenannte *mass images* erstellt werden. In diesen wird die Verteilung eines oder mehrerer Proteine im Präparat dargestellt. In Abbildung 27 ist exemplarisch am Beispiel eines papillären Tumor die Verteilung von vier verschiedenen Massen über das gesamte Präparat gezeigt. Dabei erweist sich rot (9260 Da) als deckungsgleich mit dem Urothel, blau (3286 Da) mit dem Stroma / Bindegewebe, orange (3228 Da) mit der Muskulatur und gelb (4962 Da) mit den Entzündungszellen.

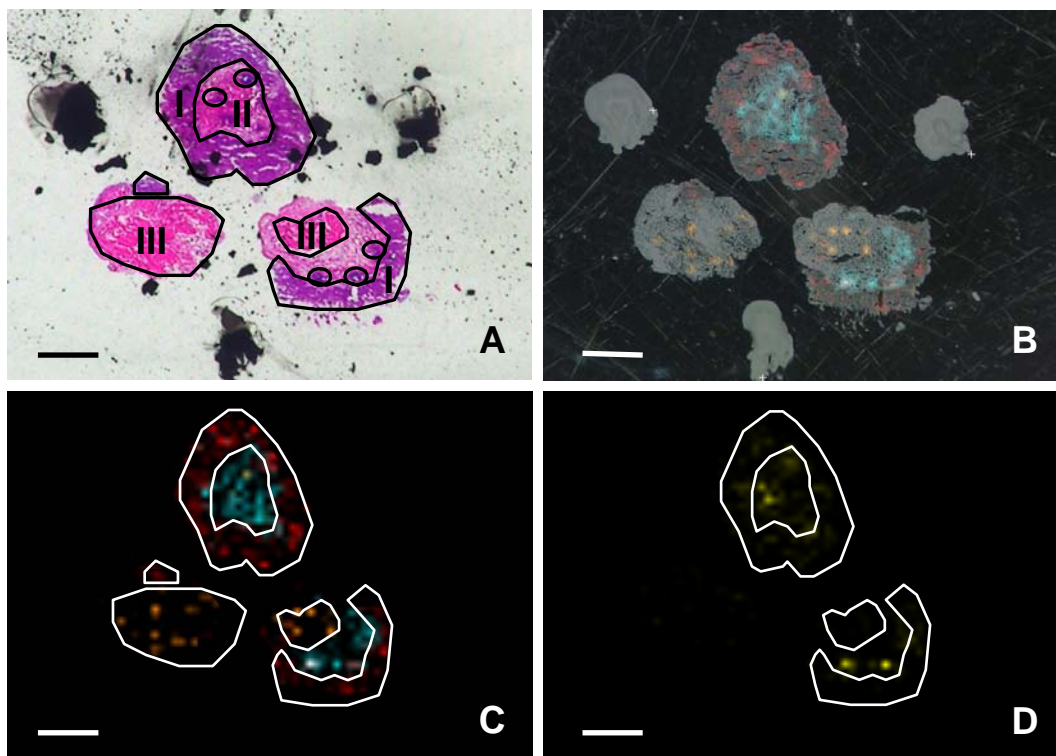


Abbildung 27: A: H&E-Übersichtsbild, in dem die verschiedenen Gewebeentitäten markiert sind (I = Urothel, II = Stroma, III = Muskulatur und kleine Kreise = Entzündungszellen); B-D: *mass images*, rot = 9260 Da, Urothel; blau = 3286 Da, Stroma; orange = 3228 Da Muskulatur und gelb = 4962 Da, Entzündungszellen. Die Balken entsprechen jeweils 2 mm.

3.5.2 Prostatagewebeblöcke

Es wurden Gefrierschnitte von 11 Gewebeproben mit Prostatakarzinom und von 11 Proben ohne Prostatakarzinom (normales Drüsengewebe oder BPH) miteinander verglichen. Die Spektren wurden für die Auswertung in die ClinProTools 2.0 Software importiert. Insgesamt konnten 85 Peaks detektiert werden. Unter Verwendung der verschiedenen Algorithmen konnten, basierend auf 5-22 Peaks, Werte für die Sensitivität von bis zu 85% und für die Spezifität von bis zu 91% erreicht werden. Eine Übersicht gibt Tabelle 37.

Tabelle 37: Sensitivität, Spezifität und Anzahl der Peaks für die verschiedenen Modelle im Vergleich bei der Differenzierung zwischen Prostatakarzinom und nicht tumorösem Prostatagewebe; Ausgangsmaterial: Gewebe; Methode: MALDI imaging.

Modell	Sensitivität [%]	Spezifität [%]	Anzahl der Peaks
GA	53,7	75,4	5
SVM	85,21	90,74	22
Eigener GA 1	70,04	84,42	5

In Abbildung 28 sind die Summenspektren der *regions of interests* (ROIs) aus den Bereichen mit Prostatakarzinom (rot) und die Summenspektren der ROIs aus den Bereichen mit normalen Prostatadrüsen (grün) im Bereich zwischen 1-15 kDa dargestellt.

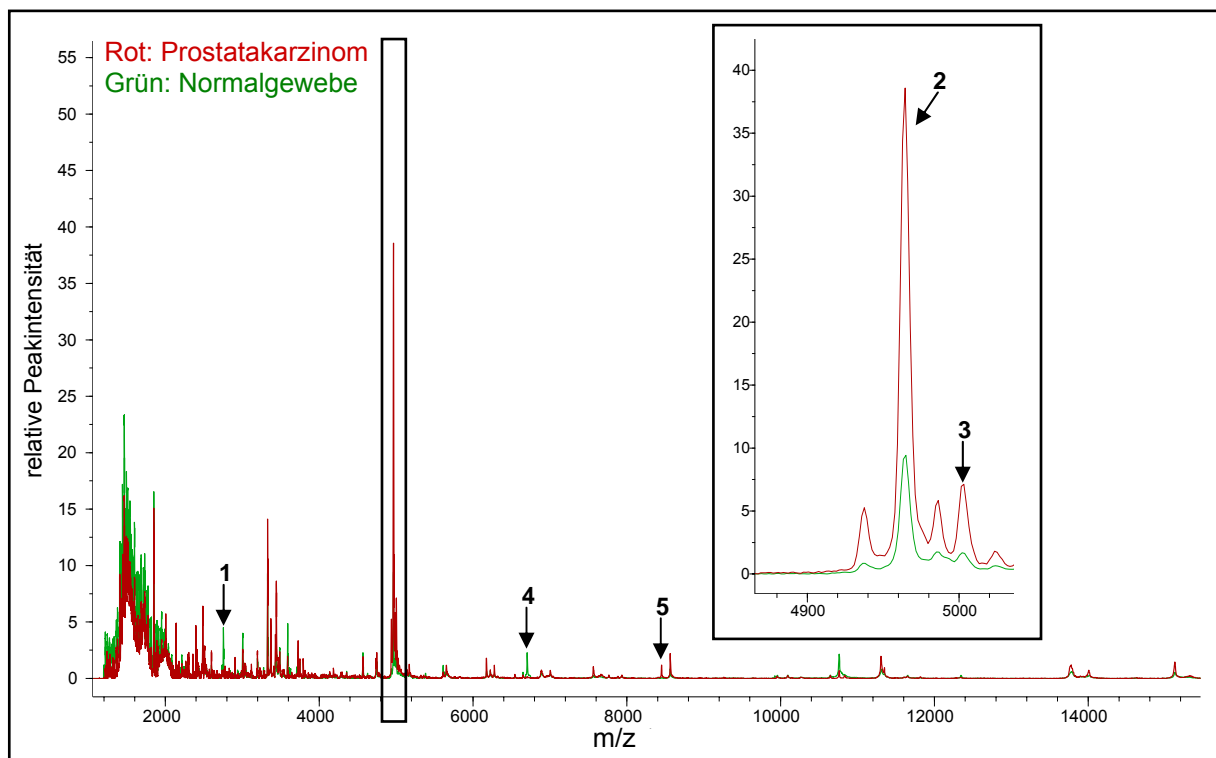


Abbildung 28: Summenspektren aller ROIs mit Prostatakarzinom (rot) und normalem Prostatagewebe (grün). Die Pfeile markieren die fünf Peaks des „Eigenen GA“.

Mittels der generierten Algorithmen konnten allen Spektren jedes Schnittpräparates in eine der zwei Klassen, Karzinom oder Normal, gruppiert werden. In Abbildung 29 ist exemplarisch das Ergebnis der Klassifikation, das sogenannte *class image* (C+D), zweier Schnittpräparate unter Anwendung des SVM-Algorithmus dargestellt. Das eine Präparat zeigt in der H&E-Färbung erkennbar in großen Anteilen ein Prostatakarzinom (B), das andere normale und atrophe Prostatadrüsen (A) sowie beide zeigen Ausschnittsvergrößerungen der relevanten Bereiche. Bei den *class images* (C+D) repräsentieren rote Pixels das Karzinom und grüne normales Gewebe. Schwarze Pixel sind durch unklassifizierbare Spektren bedingt. Bild A+C sowie B+D entsprechen einem identischen Schnittpräparat, da die H&E-Färbung nach der massenspektrometrischen Analyse erfolgte.

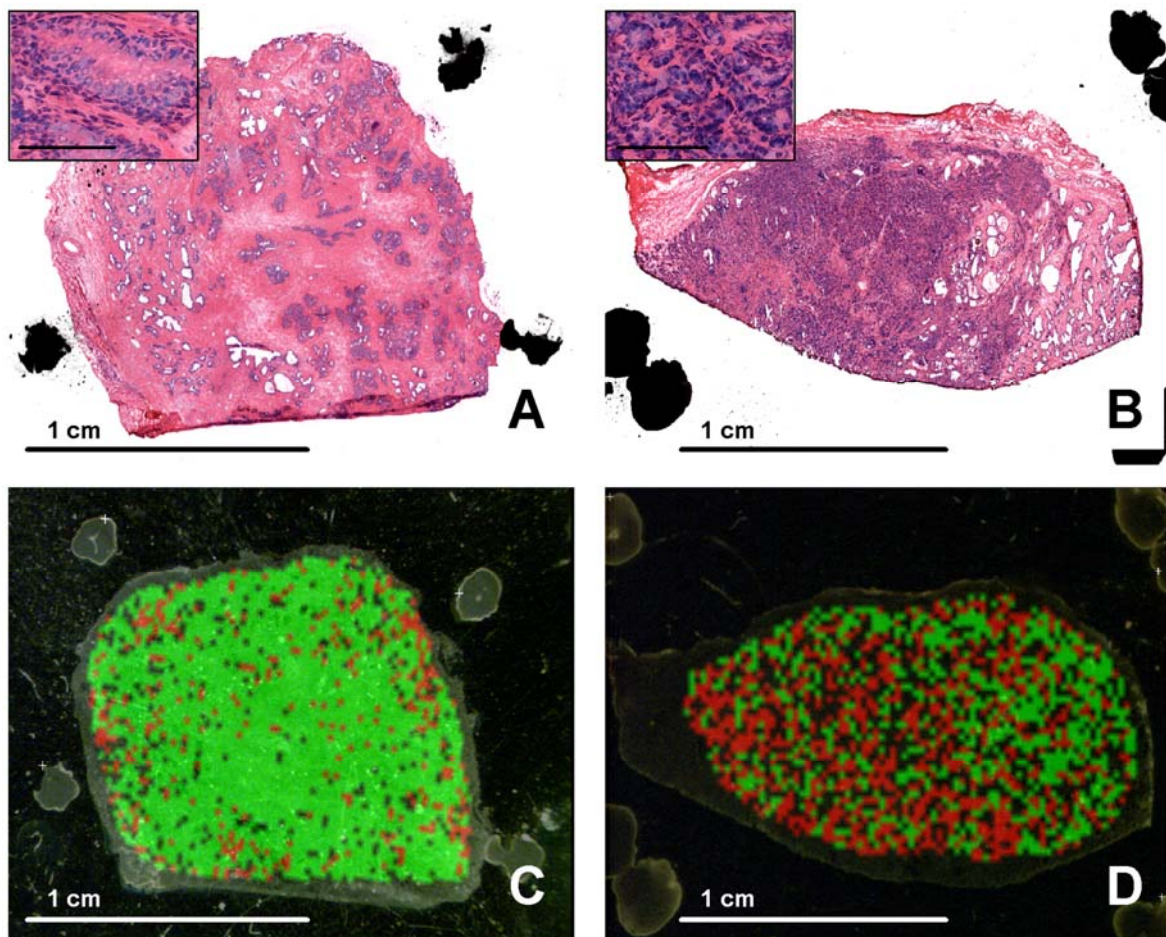


Abbildung 29: Repräsentative H&E-Bilder eines Schnittpräparates von normalem Prostatagewebe (A) und Prostatagewebe mit Karzinom (B). In den Einschüben jeweils vergrößerte Bilder der relevanten Histologie, der Balken entspricht jeweils 10 µm. Korrespondierende *class images* derselben Schnittpräparate: normales Prostatagewebe (C) und Prostatagewebe mit Karzinom (D). Rote Pixel entsprechen dem Karzinom, grüne dem normalen Gewebe und schwarze unklassifizierbaren Spektren.

3.5.3 Prostatastanzen

Die Spektren der stanzbioptisch aus frischem Prostatagewebe gewonnenen Biopsien wurden mittels des SVM-Algorithmus der Prostatagewebeblöcke klassifiziert. In Abbildung 30 sind exemplarisch zwei Stanzen ohne Nachweis eines Karzinoms abgebildet. Bilder A+B zeigen das Photo des nativen Schnittpräparates vor dem Aufsprühen der Matrix. In den Bildern C+D sind jeweils die korrespondierenden *class images* dargestellt. Grüne Pixel repräsentieren normales Prostatagewebe, rote Karzinom und blau unklassifizierbare Spektren.

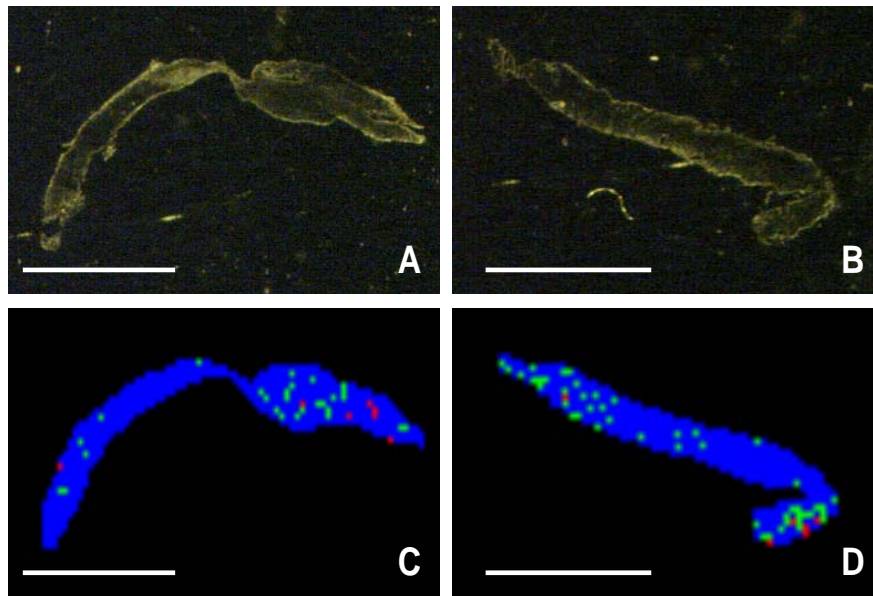


Abbildung 30: A+B: Bilder zweier nativer Schnittpräparate von Prostatastanzen ohne Karzinomnachweis. C+D: korrespondierende *class images*. Grün = normales Prostatagewebe, rot = Karzinom, blau = unklassifizierbare Spektren. Die Balken entsprechen jeweils 2 mm.

3.5.4 Formalin-fixiertes und paraffin-eingebettetes Gewebe

Es wurden die verschiedenen Strategien der Entparaffinierung und Antigendemaskierung des formalin-fixierten und paraffin-eingebetteten (FFPE) Gewebes in ihrer Effizienz mit gefrorenem Gewebe desselben Tumors verglichen. Dabei fanden sechs verschiedene Techniken Anwendung: Xylol, Trypsin, Proteinase K, Mikrowelle, Dampfdrucktopf und das Antigen retrieval Kit. Abbildung 31 zeigt eine exemplarische Gegenüberstellung von Summenspektren der verschiedenen Methoden in dem Massenbereich 2-10 kDa.

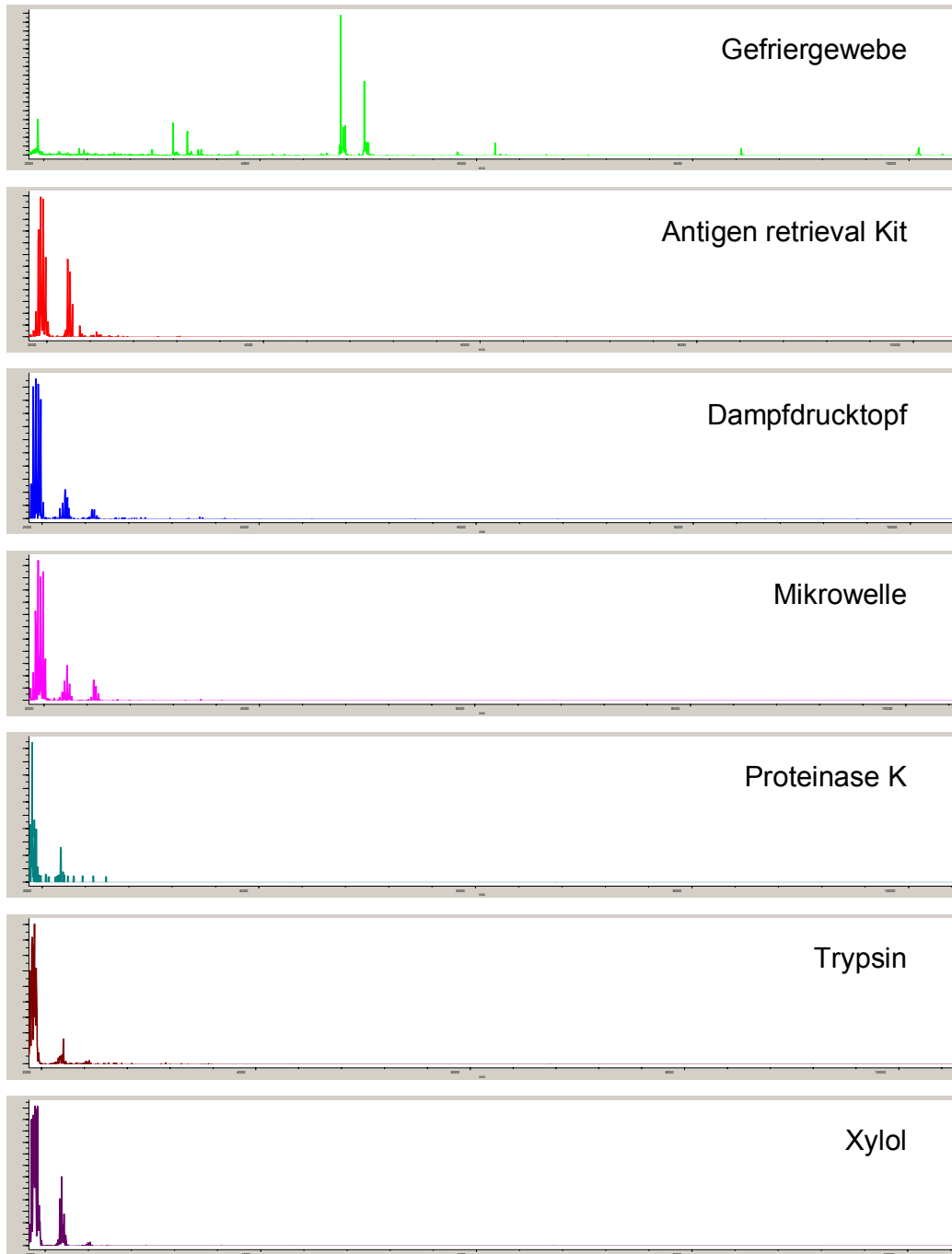


Abbildung 31: Vergleich der Summenspektren des FFPE-Gewebes nach Behandlung mit den verschiedenen Antigenmaskierungsmethoden mit einem Summenspektrum von Gefriergewebe. Gezeigt ist jeweils ein repräsentativer Ausschnitt des Massenspektrums im Bereich von 2-10kDa.

4 Diskussion

Nach den kardiovaskulär bedingten Todesfällen, die im Jahre 2004 mit 45% etwa die Hälfte aller Todesfälle repräsentierten, stehen die Malignome mit 25,6% an zweiter Stelle in der Statistik der Mortalitätsursachen. Im zeitlichen Verlauf nahm dabei die absolute Anzahl derer, die an einem Malignom verstarben, stetig zu [Schelhase et al., 2006]. Im Jahre 2002 betrug der prozentuale Anteil des Prostatakarzinoms (PCa) an der Gesamtheit der Krebssterbefälle 10,4%, wodurch das PCa an Stelle 3 in der Statistik der Männer rangiert [Krebs in Deutschland, 2006]. In den USA liegt das PCa nach dem Bronchialkarzinom sogar an Stelle zwei in der Statistik der Krebssterbefälle [U.S. Cancer Statistics Working Group, 2006]. Das Harnblasenkarzinom steht in Deutschland im Jahre 2002 bei den Männern an zehnter und bei den Frauen an elfter Stelle in der Rangliste der Krebssterbefälle [Krebs in Deutschland, 2006]. Maligne Erkrankungen treten vor allem im höheren Lebensalter auf, so lag das Durchschnittsalter der an malignen Erkrankungen Verstorbenen im Jahre 2004 bei 71,8 Jahren [Schelhase et al., 2006]. Aufgrund der derzeitigen demographischen Entwicklung mit steigenden Werten für die Lebenserwartung, stellen Malignome ein zunehmendes Problem des Gesundheitswesens dar. Das Statistische Bundesamt beziffert die Lebenserwartung eines neugeborenen Jungen derzeit auf 76,6 Jahre und die eines neugeborenen Mädchen auf 82,1 Jahre. Auch für die älteren Menschen ist ein Anstieg ihrer Lebenserwartung im Vergleich zum Vorjahr um 0,2-0,3 Jahre zu verzeichnen [Statistisches Bundesamt, 2007]. Auch unter diesen Gesichtspunkten sollte ein vorrangiges Ziel der medizinischen Forschung in der Entwicklung und Verbesserung der Diagnostik und Therapie von malignen Erkrankungen liegen. Nicht unerheblich ist in diesem Zusammenhang auch das Problem der sinkenden Kostenbudgets im Gesundheitswesen, so daß nicht nur eine bessere sondern nach Möglichkeit auch effektivere und kostengünstigere Diagnostik sowie eine patientenoptimierte und dadurch bedingt effizientere Therapie wünschenswert wäre.

Die Zystoskopie als derzeitiger Goldstandard in der Primärdiagnostik und Nachsorge des Urothelkarzinoms [Oosterlinck et al., 2002] ist ein invasives, aufwendiges und teures Verfahren. Im Falle einer parallel angestrebten Entnahme von Biopsien aus der Harnblase (transurethrale Resektion der Harnblase, TUR-B) ist zudem eine Allgemeinnarkose oder rückenmarksnahe Regionalanästhesie erforderlich. Somit bestehen für den Patienten die üblichen Risiken, die bei einer Narkose und einem operativen Eingriff auftreten können, und es entstehen zusätzliche Kosten durch die Operation. Auch eignet sich die Zystoskopie nicht als Screeningmethode [Prout, 1990] und zeichnet sich durch eine nicht ausreichende Sensitivität und Spezifität aus [Konety, 2006]. In idealer Weise sollte durch die Identifizierung eines neuen Markermoleküls für das Urothelkarzinom bzw. einer Kombination von mehreren Markern (*pattern*) die Diagnostik und Nachsorge vereinfacht, für den Patienten angenehmer

und kostengünstiger gestaltet werden können. Ein solcher Test sollte daher am ehesten auf urin- oder serumgebundenen Markermolekülen beruhen, gewebegebundene Marker eignen sich dagegen eher für die Therapieentscheidung. Die Zystoskopie wäre nur noch bei begründetem Verdacht auf das Vorliegen eines Urothelkarzinoms indiziert. Dies würde insbesondere in der langjährigen Nachsorge der Patienten mit Urothelkarzinomen, die bisher mittels regelmäßiger Zystoskopien erfolgt [Oosterlinck et al., 2002], eine Verbesserung für Patient und Kostenbudget bedeuten. Die Suche nach einem derartigen Marker bzw. einer Kombination von Markermolekülen hat in den letzten Jahren begonnen, wobei auch proteomische Untersuchungen in den Vordergrund rückten [Srinivas, 2001]. Jedoch konnte bisher keiner der bekannten und teils kommerziell erhältlichen Urintests die Zystoskopie in der Erstdiagnose oder in der Nachsorge ablösen [Borden et al., 2005]. Markermoleküle im Serum sind bisher noch nicht identifiziert worden.

Das Prostatakarzinom (PCa) stellt im Besonderen eine Herausforderung an das Gesundheitssystem dar, da es zum am häufigsten diagnostizierten Tumor des Mannes avanciert ist [Lee et al., 2005]. Seine Prävalenz steigt steil mit zunehmendem Alter an [Breslow et al., 1977], eine Tatsache, die in einer zunehmend älter werdenden Bevölkerung eine bedeutende Rolle spielt. Aber beiden nicht invasiven diagnostischen Verfahren (Bestimmung des PSA-Wertes und DRE) mangelt es an ausreichender Spezifität [Hsu et al., 2006; Lein et al., 2005; Brawer, 1999]. Auch die verschiedenen Differenzierungen des PSA-Wertes wie z.B. die PSA-Density konnten keine eindeutige Verbesserung der Sensitivität erbringen [Ward et al., 2001]. Ein weiteres Problem stellt die hohe Rate an Überdiagnostizierung [Draisma et al., 2003] dar, wodurch für den Patienten unnötiges Leiden und für das Gesundheitssystem unnötige Kosten verursacht werden. Daher gibt es auch beim PCa zunehmend Bestrebungen, neue und zuverlässige Markermoleküle zu identifizieren. Jedoch zeichnen sich die meisten bisher gefundenen Marker bzw. Tests durch eine nicht ausreichende Spezifität aus [Reynolds et al., 2007].

Die Voraussetzung für ein Protein als idealen Tumormarker ist seine differentielle Expression zwischen Ausgangsmaterial (Serum, Urin oder Gewebe) von Gesunden und Tumorpatienten. Das Proteom repräsentiert die Gesamt aller in einer Zelle, einem Organismus oder einer komplexen Körperflüssigkeit exprimierten Proteine [van der Merwe et al., 2007; Lottspeich et al., 2006]. Es repräsentiert eine Momentaufnahme des Zell- bzw. Gewebezustandes unter den jeweilig herrschenden inneren und äußeren Bedingungen. Dadurch ist es eine dynamische Größe, die sich fortwährend an neue Bedingungen adaptiert [Görg et al., 2000], und somit wesentlich komplexer und flexibler ist als das Genom [Celis et al., 2003; Hanash, 2003]. Daher eignet sich das Proteom in besonderer Weise als sensitive Sonde für jegliche Veränderungen des Gesundheitszustandes einer Zelle, d.h. auch zur Unterscheidung zwischen Normal- und Tumorzellen. Neben der vergleichenden

Untersuchung des gewebegebundenen Proteoms finden auch zunehmend Körperflüssigkeiten, insbesondere Serum, in der Suche nach Biomarkern Verwendung. Ihr Einsatz liegt in der postulierten komplexen Interaktion zwischen Tumorgewebe und dem umgebenden Mikromilieu sowie einer daraus resultierenden Veränderung des Proteinprofils des Serum begründet [Liotta, et al., 2001]. In der Suche nach Biomarkern ist die Analyse des Proteoms der Analyse der DNA überlegen, weil vom Genom auf die tatsächliche Expression eines bestimmten Proteins oder dessen Funktionalität keine direkten Rückschlüsse gezogen werden können [Duggan et al., 2004]. Mittels Proteomics können jedoch zum einen die aktuelle Menge und zum anderen posttranslationale Modifikationen jedes Proteins dargestellt werden [Lottspeich et al., 2006]. Ein idealer Tumormarker oder ein tumorspezifisches *pattern* sollte auch der nicht-invasiven Diagnostik zugänglich sein und folglich im Serum oder Urin, d.h. einer leicht zu gewinnenden Körperflüssigkeit, nachweisbar sein.

Um die differenzielle Proteinexpression zwischen gesunden Zellen und Tumorzellen aufzudecken, wird in der proteomischen Forschung die 2D-SDS-PAGE als eine etablierte Methode genutzt. Sie dient zur Trennung und Darstellung von Bestandteilen eines komplexen Proteingemisches, wie des zellulären Proteoms [Craven et al., 2002]. Dieser Technik bedienen sich eine Vielzahl verschiedener Arbeitsgruppen zur Analyse der differentiellen Proteinexpression unterschiedlicher Tumorentitäten [Murphy et al., 2007; Jesnowski et al., 2007; Nishimori et al., 2006; Shen et al., 2004; Tomonaga et al., 2004].

Eine neuere Technik für die proteomische Analyse von Gewebe stellt das MALDI imaging dar. Hierbei werden vor allem Peptide und kleine Proteine bis zu einer Masse von 20 kDa direkt aus einem Gewebeschnitt analysiert [Caprioli et al., 1997]. Eine vorherige Mikrodissektion ist nicht von Nöten, da die Spektren orts aufgelöst und in Korrelation zu der Histologie des Schnittpräparates abgebildet werden [Chaurand et al., 2004]. In ersten Studien konnte diese Technik bereits an klinischen Proben angewendet werden [Schwamborn et al., 2007; Cornett et al., 2006; Yanagisawa et al., 2003].

Für die proteomische Analyse von Körperflüssigkeiten (Serum und Urin) können analog dem Gewebe für größere Proteine (ab einer Masse von 10-15 kDa) die 2D-SDS-PAGE verwendet werden. Jedoch ist diese Methode aufwendig und nicht für einen hohen Probendurchsatz ausgelegt. Diese Möglichkeit bieten wiederum MS-basierte Techniken wie die MALDI- und SELDI-TOF-MS, die jedoch nur Peptide und kleinere Proteine bis zu einer Masse von 20 kDa analysieren können [Pisitkun et al., 2006]. Kleine Proteine und Peptide rücken derzeit zunehmend in den Mittelpunkt der proteomischen Krebsforschung. Dieses Interesse liegt in der Annahme begründet, daß Tumoren mit zunehmender Malignität und Aggressivität Proteasen freisetzen. Das Vorhandensein dieser Proteasen lässt sich aber womöglich besser indirekt durch den Nachweis eines bestimmten Musters an den von ihnen erzeugten proteolytischen Fragmenten belegen [Villanueva, et al., 2006].

4.1 Zweidimensionale Gelelektrophorese

4.1.1 Mikrodisszeziertes Gewebe

Es wurde mikrodisszeziertes Gewebematerial von Normalurothel (11) und *low-grade* papillären Urothelkarzinomen (38) auf die differentielle Proteinexpression zwischen beiden Gruppen mit dem Ziel untersucht, einen oder mehrere potentielle Tumormarker zu identifizieren. Dabei erreicht ein Tumormarker erst einen diagnostischen Wert im eigentlichen Sinne, wenn er nicht nur im Gewebe, sondern auch in leicht zugänglichen Körperflüssigkeiten wie Serum und Urin nachgewiesen werden kann. Durch die primäre Identifizierung eines oder mehrerer solcher potentieller Marker im Gewebe kann jedoch eine anschließende Auffindung derselben im Serum oder Urin erfolgen und auch erleichtert werden. Denn es ist davon auszugehen, daß im Gewebe deutlich höhere Konzentrationen der Markersubstanz vorliegen als im Serum oder Urin, so daß eine primäre Identifikation in den Körperflüssigkeiten schwieriger ist. Erfolgt die Suche jedoch nach einem bereits bekannten Protein, gibt es eine Vielzahl an Strategien (z.B. antikörperbasierte Aufreinigung der Probe), die eine Auffindung erleichtern.

Die Bestimmung der optimalen Zellzahl für die 2D-SDS-PAGE stellt einen Kompromiß zwischen der Darstellung aller abbildbaren Proteine (ab einer Masse von 10-15 kDa) und der Aussagekraft der Gele dar. Denn es können nicht alle Proteine gleichzeitig dargestellt werden, ohne die Aussagekraft durch Überlagerungen der einzelnen Spots zu reduzieren. Bei der verwendeten Zellzahl von 45.000 Zellen pro Gel können Proteine, welche nur in geringer Kopiezahl in der Zelle synthetisiert werden, nicht auf dem Gel visualisiert werden. Zwar wurde mit einem pH-Bereich von 3-11 ein großer Teil des gesamten pH-Spektrums abgedeckt, aber sehr saure und sehr basische Proteine sind auf diese Weise nicht fassbar. Somit wird durch die ermittelte Zellzahl ein reproduzierbarer Ausschnitt des Proteoms abgebildet, der aufgrund seiner Aussagekraft ausgewählt wurde.

4.1.1.1 Auswertungen der Gele im Vergleich

Ein Markerprotein ist durch seine differentielle Expression zwischen zwei verschiedenen Gruppen gekennzeichnet, wobei es im Optimalen in einer Gruppe vorhanden und in der anderen nicht vorhanden ist. Im manuellen Vergleich der Gele der *low-grade* papillären Urothelkarzinom mit denen des Normalurothels wurden insgesamt 42 Spots gefunden, die gar nicht oder in einem Teil der Normalurothel-Gele nachweisbar waren. Aber keiner dieser 42 Spots war gleichzeitig in allen Tumor-Gele auffindbar. Der Spot, der bei Nachweis in 34 der 38 (89,5%) Tumorgele, die größte Konsistenz innerhalb der Tumor-Gele zeigte, konnte jedoch auch in 5 der Normalurothel-Gele detektiert werden. Daraus resultiert eine Spezifität von lediglich 54,5%. Insgesamt zeigten neun Spots eine Sensitivität und Spezifität über 60%,

wobei der höchste Wert für die Sensitivität bei 84,2% lag (Spots Nummer 17 und 38) und für die Spezifität bei 100% (Spots Nummer 8, 22 und 25). Kombiniert man zwei Spots zu einem *pattern*, liegt bei Nachweis von Spot Nummer 17 und 38 in einem Gel mit einer Wahrscheinlichkeit von 71% ein Tumor vor.

Bei der software-assistierten Bestimmung der Spotintensitäten und –volumina wurden die Gele mit Hilfe der Image Master 2D Platinum Software ausgewertet. Beide Parameter zeigten deutliche Schwankungen zwischen den Gelen innerhalb einer Gruppe, die eine Klassifikation mit hoher Sensitivität und Spezifität nicht erlauben.

Die rein software-basierte Auswertung der Gele mit Hilfe der Image Master 2D Platinum Software konnte 15 Spots ermitteln, die eine signifikante Zuordnung zu den beiden Gruppen ermöglichten. Dabei konnten vier dieser Spot auch in der manuellen Auswertung als differentiell exprimierte Proteine identifiziert werden. Jedoch erzielte der Spot, der in der software-basierten Auswertung die höchste klassenspezifische Ratio aufwies (Spot Nummer 33), in der manuellen Auswertung Werte für die Sensitivität und Spezifität von unter 60%.

Sowohl die ClinProTools als auch die XLminer Software wurden eingesetzt, um ein Muster (*pattern*) von mehreren differentiell exprimierten Proteinen zu identifizieren, welches beide Gruppen mit hoher Sensitivität und Spezifität trennen kann. Die ClinProTools Software bedient sich dazu dreier verschiedener Algorithmen (genetischer Algorithmus (GA), *support vector machine* Algorithmus (SVM) und *quick classifier* (QC)), die XLminer Software verwendet ein regelbasiertes Auswahlverfahren auf der Basis eines Entscheidungsbaumes.

Alle drei durch die ClinProTools Software ermittelten Algorithmen zeigten insgesamt Genauigkeiten in ihrer Klassifikation von zum Teil deutlich unter 60%. Bei Betrachtung der Werte für die Sensitivität und Spezifität fällt auf, daß für den GA und die SVM die Sensitivitätswerte mit 65,38% bzw. 73,08% deutlich über denen für die Spezifität liegen (13,64% bzw. 18,18%). Der QC klassifiziert lediglich anhand eines einzelnen Spots (Nummer 6) zwar mit einer besseren Spezifität (54,55%), aber im Vergleich zu den beiden anderen Algorithmen mit einer geringeren Sensitivität (50%). Die Auswertung mit Hilfe der XLminer Software erzielt im Vergleich die besten Ergebnisse mit Hinblick auf Sensitivität und Spezifität mit Werten von 92,1% bzw. 72,7%.

Bei der Bewertung der Ergebnisse der manuellen Auswertung sind immer die Grenzen und Probleme dieser Methode zu beachten. Die Erkennung von Spots mit dem bloßen Auge ist durch das Auflösungsvermögen des Auges und die Fähigkeit des menschlichen Gehirns, Graustufen voneinander zu differenzieren, begrenzt. Besonders dicht zusammen liegende oder sehr schwache Spots sind demnach mit dieser Methode schwer voneinander abgrenzbar bzw. erkennbar. Eine solche, differenzierte Detektion von Spots ist lediglich mittels einer Software möglich. Erschwerend kommt ein allgemeines Problem der 2D-SDS-

PAGE hinzu: Spots zeigen in den verschiedenen Gelen nicht immer die absolut gleiche Position, auch wenn es sich um das gleiche Protein handelt. Diese Unterschiede sind vor allem zwischen Gelen gegeben, die nicht gleichzeitig die zweite Dimension durchlaufen haben. Da immer nur zwölf Gelen gleichzeitig in der zweiten Dimension prozessiert werden können, ergeben sich bei der untersuchten Fallzahl zwangsläufig Unterschiede. Hier liegt wiederum ein Vorteil der Auswertung mit Hilfe der Software Image Master 2D Platinum. Durch die Markierung mehrerer Spots, die zum einen in allen Gelen auffindbar sind und zum anderen möglichst breit über das gesamte Gel verteilt liegen, können alle Gelen in Deckung zueinander gebracht werden. Nach diesem Vorgang ist die Software in der Lage, eigenständig, nach zuvor definierten Kriterien Spots zu detektieren und in den anderen Gelen nach korrespondierenden Spots zu suchen. Die Intensitäten der Spots können semiquantitativ ermittelt werden und zwischen den Gelen verglichen werden. Doch weist die Software auch klare Nachteile auf, die vor allem im Auffinden korrespondierender Spots liegen. Ist an einer Stelle in einem Gel ein Spot zu finden und in einem anderen Gel nicht, wäre für das Kriterium einer optimalen differentiellen Expression erfüllt. Die Software ist aber nicht in der Lage, den fehlenden Spot in diesem Sinne zu werten, sondern schließt einen derartigen Spot als möglichen Kandidaten aus. Ein Spot muß für die Software eine gewisse Mindestintensität aufweisen, um erkannt zu werden. Folglich müßte aufwendig von Hand an den entsprechenden Stellen ein artefizieller Spot eingezeichnet und der Software „aufgezwungen“ werden, was sich in der Praxis jedoch kaum realisieren läßt. Somit muß man mit den Kandidaten vorlieb nehmen, die die Software mit ihren begrenzten Möglichkeiten vorschlägt. Dies spiegelt sich auch in dem Ergebnis der rein softwarebasierten Auswertung wider.

Durch die manuelle Auswertung wurden die höchsten Werte für die Spezifität erreicht (100%). Die Werte für die Sensitivität insbesondere bei hoher Spezifität liegen bei maximal 71,1%. Der mit 92,1% höchste Wert für die Sensitivität wurde durch die Auswertung der Spotintensitäten mit Hilfe der XLminer Software erzielt bei einer Spezifität von 72,7%. Der Vorteil in der Auswertung mit Hilfe dieser Software gegenüber der manuellen Auswertung liegt in der Möglichkeit begründet, für die Klassifizierung mehrere Spots heranziehen zu können. Ein solches Muster (oder *pattern*) ist im Vergleich zu einem singulären Marker in der Regel robuster. Die Auswertung mit Hilfe der Software scheint demnach der manuellen Auswertung im Hinblick auf die Sensitivität, jedoch nicht bezogen auf die Spezifität überlegen zu sein. Sowohl die Werte für die Sensitivität als auch für die Spezifität bei der Auswertung mit der ClinProTools Software fallen deutlich hinter den beiden anderen Auswertetechniken zurück.

Um die mit den verschiedenen Auswertetechniken erzielten Werte für die Sensitivität und Spezifität beurteilen zu können, seien diese dem derzeitigen diagnostischen Goldstandard,

der Zytologie und der Zystoskopie, gegenüber gestellt. Die Zytologie erzielt bezogen auf *low-grade* papilläre Tumoren zwar mit bis zu 94% sehr hohe Werte für die Spezifität [Boman et al., 2002], aber die Sensitivität liegt mit etwa 35% [Karakiewicz et al., 2006; Curry et al., 2002; Hughes et al., 2000] deutlich niedriger als die durch die manuelle und softwaregestützte Auswertung mit XLminer erreichte Sensitivität. Außerdem ist das Ergebnis der Zytologie stark abhängig vom diagnostizierenden Pathologen [Karakiewicz et al., 2006; Raitanen et al., 2002]. Die Zystoskopie zeigt ohne den Einsatz von ALA (Aminolävulinsäure) im Mittel Werte für die Sensitivität und Spezifität, die mit 73% bzw. 37% angegeben werden [Sarosdy et al., 2002; Kriegmair et al., 1996]. Durch den Einsatz von ALA kann die Sensitivität auf bis zu 97% und die Spezifität auf bis zu 65% verbessert werden [König et al., 1999; Kriegmair et al., 1996]. Damit konnten durch die manuelle Auswertung sowie durch die Auswertung mittels des Software XLminer höhere Werte für die Sensitivität und die Spezifität erreicht werden. Die Auswertung mit Hilfe Image Master 2D Platinum Software und der ClinProTools Software erzielte Werte für die Sensitivität und die Spezifität, die unter denen der etablierten Standards liegen.

4.1.2 Fraktionierte Proben

Von den vier verschiedenen Fraktionierungsmethoden (der Vivapure[®] C18 Micro *spin columns* (Vivasciences), 2-D Fractionation Kit (Amersham Biosciences/ GE Healthcare), ProteoEnrich[™] CAT-X-Kit (Novagen) und ProteinChip[®] Biomarker Profiling Fractionation Kit (CIPHERGEN Biosystems)), erwies sich das zuerst genannte aufgrund von Materialmängeln als nicht reproduzierbar druchführbar. Von den drei anderen zeichnete sich das 2-D Fractionation Kit durch die beste Reproduzierbarkeit und die größte Anzahl an detektierbaren Spots aus.

Allen Methoden war jedoch gemeinsam, daß für die Fraktionierungen eine vergleichsweise große Menge an Serum bzw. eine Vielzahl von Zellen eingesetzt werden mußte. Dadurch ist vor allem eine Anwendbarkeit der Methoden an Gewebe von klinischen Proben eher in Frage zu stellen. Bei einer benötigten Zellzahl von mindestens einer Millionen Zellen aus Gefriergewebe (für kleine Gele, 10 x 10 cm) wäre es in der Mehrzahl der Fälle unmöglich oder nur schwer möglich, diese Zellzahl zu erreichen. Zur besseren Einschätzung der Größenordnung sei auf die verwendeten 45.000 Zellen für die großen Gele (24 x 24 cm) der mikrodisektierten Urothelproben hingewiesen.

4.1.3 Urin

Durch den Vergleich der acht verschiedenen Methoden zur Fällung der Proteine aus Urin zeigten die Methanol-Fällung und das 2-D Clean-Up Kit (Amersham Biosciences/ GE Healthcare) in etwa ähnlich gute Ergebnisse bezogen auf die Anzahl der Spots in einem Gel sowie die Gesamtintensität aller Spot eines Gels. Durch die Testung dieser beiden Methoden an einem Massenstandard mit definierter Proteinkonzentration konnte ein negativer Einfluß beider Fällungsmethoden auf die Probe ausgeschlossen werden. Die Methanol-Fällung erwies sich jedoch zum einen in der Durchführung wesentlich einfacher und schneller als das 2-D Clean-Up Kit. Zum anderen stellt sie auch die preiswertere Methode von beiden dar. Daher wurde für alle weiteren Versuche die Methanol-Fällung eingesetzt.

Der Vergleich der Gele von Urinproben der Harnblasenkarzinompatienten mit denen der urologischen Poliklinik (Kontrollen) mit Hilfe der Image Master 2D Platinum Software ergab keinen Spot, der entweder in allen oder der Mehrzahl der Urin-Gele der Tumorpatientenn über- oder unterexprimiert. Auch fand sich kein Spot der im Gegenzug in allen oder der Mehrzahl der Urin-Gele der Kontrollen, der signifikant differentiell exprimiert war.

4.2 MALDI-TOF-MS

4.2.1 Serumfraktionierung mit WCX-Beads

4.2.1.1 Harnblasenkarzinompatienten

Die Analyse der mittels WCX-Beads fraktionierten Serumproben von Patienten mit Harnblasenkarzinom und verschiedenen Kontrollkollektiven erbrachte maximal 132 Peaks im Bereich zwischen 1 und 20 kDa. Insbesondere im Bereich von 1-10 kDa konnte eine Reihe von Peaks identifiziert werden, die eine differentielle Expression aufwiesen. Der Vergleich aller Tumorpatienten mit den beiden Kontrollkollektiven ergab insgesamt Werte für die Sensitivität von bis zu bis zu 99% und für die Spezifität von bis zu 98%. Bei Betrachtung der verschiedenen Gruppen und Modelle erzielte der QC beim Vergleich aller Tumorpatienten mit den gemischten Kontrollen die besten Werte für Sensitivität (96,45%) und Spezifität (94,57%). Dieser beruhte auf 23 Peaks in einem Bereich zwischen 1,4 und 5,9 kDa. Die Klassifizierung von Tumorpatienten und urologischen Patienten gelang am besten mit Hilfe des „Eigenen GAs“, der eine Sensitivität von 97,3% und eine Spezifität von 98,11% basierend auf fünf Peaks zwischen 1,8 und 5,7 kDa erreichte. Genauere Angaben bezüglich der identifizierten Peaks sind aufgrund eines laufenden Patentierungsverfahrens nicht möglich. Wendete man den auf fünf Peaks basierenden „Eigenen GA 1“ im Vergleich aller

Tumoren mit den gemischten Kontrollen an, lagen die Werte für die Sensitivität und Spezifität bei 93,62% und 90,7%. Wurde derselbe Algorithmus auf die verschiedenen T-Stadien im Vergleich mit den Kontrollen eingesetzt, erzielte dieser bei den pTa, pTis und pT1+2 Tumoren mit dem Tumorstadium proportional zunehmende Werte für die Sensitivität (83,02%, 90,63% und 95,65%) sowie für die Spezifität (91,34%, 91,41% und 95,97%).

Derzeit gibt es in der Literatur keine Studien über die massenspektrometrische Untersuchung an Seren von Harnblasenkarzinompatienten. Daher können die Ergebnisse nicht mit methodisch vergleichbaren Studien in einem Kontext beleuchtet werden. Lediglich der Vergleich mit den Standardmethoden der Diagnose des Harnblasenkarzinoms (Zystoskopie und Zytologie) sowie den unterschiedlichen kommerziellen Test ist basierend auf den Werten für die Sensitivität und Spezifität möglich. Die Zytologie zeichnet sich zwar mit Werten von bis zu 94% durch eine hohe Spezifität aus [Boman et al., 2002], jedoch sind die Werte für die Sensitivität stark abhängig vom Differenzierungsgrad des Tumors. Sie liegen für *high-grade*-Tumoren bei etwa 67% und für *low-grade*-Tumoren bei etwa 35% [Karakiewicz et al., 2006; Curry et al., 2002; Hughes et al., 2000]. In Analogie zu dieser Zunahme der Sensitivität mit abnehmendem Differenzierungsgrad des Karzinoms zeigen auch die vorliegenden Ergebnisse eine Zunahme der Sensitivität mit abnehmendem Differenzierungsgrad sowie zunehmendem Tumorstadium. Ein Nachteil der Zytologie ist auch die deutliche Abhängigkeit der Ergebnisse vom diagnostizierenden Pathologen [Karakiewicz et al., 2006; Raitanen et al., 2002]. Die mittels der massenspektrometrischen Untersuchung an Serum erzielten Ergebnisse liegen sowohl für die Sensitivität als auch für die Spezifität über denen der Zytologie. Daneben ist ein weiterer Vorteil dieser Methode die fehlende Abhängigkeit vom Untersucher, denn mit Hilfe des Algorithmus wird objektiv eine Zuordnung zu einer Klasse getroffen. Auch die Weißlicht-Zystoskopie zeigt mit einer Sensitivität von 73% und einer Spezifität von 37% [Sarosdy et al., 2002; Kriegmair et al., 1996] ebenfalls Werte, die unter denen mittels MS erzielten liegen. Jedoch durch den Einsatz von ALA kann die Sensitivität auf bis zu 97% angehoben werden [König et al., 1999; Kriegmair et al., 1996] und liegt damit in derselben Größenordnung wie die Sensitivität der MS-Analyse des Serums. Die Spezifität der Zystoskopie mit ALA bleibt aber auch weiterhin hinter der Spezifität der MS-Analyse zurück. Die Ergebnisse aller bisher bekannten Urin-basierten Tests für das Urothelkarzinom variieren zum Teil erheblich zwischen den verschiedenen Studien. Im Allgemeinen weisen sie jedoch eine höhere Sensitivität aber eine niedrigere Spezifität als die Urinzytologie auf [Lokeshwar et al., 2006; Dinney et al., 2004; Boman et al., 2002]. Ein Grund für die Tatsache, daß daher bisher keiner der Test die Zystoskopie in ihrer Rolle in der Erstdiagnose und Nachsorge ablösen konnte, liegt ggf. darin begründet, daß sich die Mehrzahl der Test auf einen singulären Marker stützt. Dahingegen könnte eine Kombination mehrerer Marker von Vorteil sein [Black et al., 2006]. Aufgrund der

zum Teil erheblich divergierenden Angaben in der Literatur für die Sensitivität und Spezifität der verschiedenen Urintests ist ein Vergleich mit den Ergebnissen der MS-basierten Methode schwierig. Hierbei zeigen die Analyse der Mikrosatelliten mit einer Sensitivität von 83-95% und einer Spezifität von 89-100% sowie die FISH (Fluoreszent in-situ Hybridisierung) mit 73-92% und 92-100% am ehesten Werte, die denen der MS-basierten Methode ähnlich sind. Sowohl die Mikrosatellitenanalyse als auch die FISH benötigen jedoch eine ausreichende Anzahl an Urothelien im Untersuchungsmaterial, die nicht immer gegeben ist [Placer et al., 2002]. Außerdem handelt es sich bei beiden Methoden um zeitaufwändige Verfahren, die jeweils etwa zwei Tage in Anspruch nehmen. Die MS-Analyse inklusive der vorangehenden Fraktionierung dauert in etwa einen halben Tag.

Obwohl es sich bei dem Harnblasenkarzinom streng genommen um eine topische Erkrankung handelt, so spiegelt es sich doch im Serum wieder. Dies bestätigt die Theorie, daß von den Tumorzellen freigesetzte oder sezernierte Moleküle in die Blutbahn gelangen [Alaiya et al., 2005] und damit zu diagnostischen Zwecken herangezogen werden können. Diese Strategie des sogenannten *serum pattern profiling* wurde erstmalig von Petricoin et al. im Jahre 2002 in der Anwendung am Ovarialkarzinom beschrieben [Petricoin et al., 2002]. Vor dem Hintergrund der im Anschluß an diese Studie aufgetretenen Kritik bezüglich der Reproduzierbarkeit und Glaubhaftigkeit der Ergebnisse [u.a. Baggerly, et al., 2005] sowie dem derzeitigen Stand der Wissenschaft [Mischak et al., 2007; Rai et al., 2005] wurden die Proben nach einem strikten Protokoll aufgearbeitet, daß u.a. eine zügige Verarbeitung und Archivierung bei -80°C vorschreibt. Zudem wurden die Proben in Replikaten aufgetragen bzw. vermessen und unter den Gruppen vermischt analysiert, um einem systematischen Meßfehler vorzubeugen. Die Auswertung erfolgte mittels multivariater Analyseverfahren anstelle von ein-dimensionalen Ansätzen.

Der Vergleich der Patienten mit den verschiedenen Tumorstadien mit den Patienten mit negativer Biopsie zeigte insgesamt zwar relativ hohe Werte für die Sensitivität (73-94%), jedoch waren die Werte für die Spezifität gering (41-63%). Eine Ursache für die geringen Werte der Spezifität könnte darin begründet liegen, daß die überwiegende Mehrzahl der Patienten mit den negativen Biopsien (11 von 13) in ihrer Vorgeschichte histologisch gesicherte Harnblasentumoren aufwiesen und einzelne (soweit bisher beurteilbar) auch im Verlauf erneut ein Rezidiv oder Metastasen entwickelten.

Eine Unterscheidung zwischen den verschiedenen Patienten mit Urothelkarzinom in Abhängigkeit von ihrem T-Stadium erzielte nur geringe Werte für die Sensitivität und Spezifität. Eine mögliche Ursache hierfür kann in dem gleichzeitigen Vorliegen mehrerer Karzinome mit unterschiedlichen T-Stadien bei einem Patienten zum Zeitpunkt der Diagnose begründet liegen. So zeigten 11 der 25 Patienten mit einem invasiven Karzinom (pT1+2) zusätzlich ein Carcinoma in situ, 1 Patient ein zusätzliches papilläres Karzinom und 3

Patienten sowohl ein Carcinoma in situ als auch ein papilläres Karzinom. Von den 19 Patienten mit einem Carcinoma in situ wiesen 11 Patienten zusätzlich papilläre Karzinome auf.

4.2.1.2 Prostatakarzinompatienten

Im Bereich zwischen 1-20 kDa konnten durch die Analyse der mittels WCX-Beads fraktionierten Serumproben von Patienten mit Prostatakarzinom (PCa) und verschiedenen Kontrollkollektiven (freiwillige Spender der Blutbank sowie Patienten der urologischen Poliklinik) maximal 78 Peaks erkannt werden. Peaks mit einer differentiellen Expression fanden sich insbesondere im Bereich von 1-10 kDa. Der Vergleich aller Tumorpatienten mit den beiden Kontrollkollektiven ergab insgesamt Werte für die Sensitivität von bis zu 100% und für die Spezifität von bis zu 99%. Auffällig war, daß die Algorithmen zur Klassifizierung der Patienten aus der Poliklinik und der PCa-Patienten Werte für die Sensitivität und Spezifität zeigten, die über denen der anderen lagen. Hierbei erzielte der „Eigene GA“ die mit einer Sensitivität von 100% und einer Spezifität von 99% die besten Ergebnisse. Dieser beruhte auf fünf Peaks in einem Bereich zwischen 1,4 und 4,7 kDa. Auch bei der Klassifizierung der PCa-Patienten und den freiwilligen Spendern der Blutbank erreichte ein „Eigener GA“ basierend auf fünf Peaks die besten Ergebnisse, wobei die Sensitivität bei 98% und die Spezifität bei 88% lagen. Genauere Angaben bezüglich der identifizierten Peaks sind aufgrund eines laufenden Patentierungsverfahrens nicht möglich. Eine Trennung der PCa-Patienten nach ihrem T-Stadium, ihrem Gleason score und ihrem PSA-Wert war nicht mit ausreichender Sensitivität und/oder Spezifität möglich.

In der Literatur gibt es zwar eine Reihe von Studien an Seren von PCa-Patienten, doch sind diese mittels SELDI-TOF-MS durchgeführt worden. Zwei Studien verwendeten bei ihren Analysen CM10 ProteinChips, die in ihren Oberflächeneigenschaften denen der WCX-Beads gleichen. Li et al. konnten fünf Peaks (2,68 kDa, 10,3 kDa, 17,9 kDa, 10,8 kDa und 12,7 kDa) identifizieren, die differentiell zwischen den PCa-Patienten und den Kontrollpatienten exprimiert waren [Li et al., 2004]. Durch die Kombination der ersten drei Peaks war eine Klassifizierung mit einer Sensitivität von 67% und einer Spezifität von 65% möglich. Anhand eines Modells, das auf 10 *clustern* basiert, erreichten Ornstein et al. eine Sensitivität von 100% und eine Spezifität von 67% in der Klassifizierung von Patienten mit und ohne PCa [Ornstein et al., 2004]. Angaben zu den zugrunde liegenden Peaks Studie. Die Werte für die Sensitivität und Spezifität beider Studien liegen zum Teil deutlich unter denen, die mittels MALDI-TOF-MS erzielt werden konnten. Andere SELDI-TOF-MS Studien, die jedoch ProteinChips mit anderen Oberflächeneigenschaften verwendeten, erreichten Werte für die

Sensitivität und Spezifität Werte von bis zu 100% [Pan et al., 2006; Adam et al., 2002; Qu et al., 2002].

Im Vergleich hierzu wird die Sensitivität und Spezifität des PSA-Wertes im Allgemeinen mit 67% und 20-30% angegeben [Li et al., 2004; Ornstein et al., 2000]. Dabei eignen sich insbesondere PSA-Werte <15 ng/ml nicht zur Unterscheidung zwischen einer BPH und einem Karzinom [Peter et al., 2000]. Auch durch die zusätzlichen Bestimmungen von cPSA, fPSA und den Verhältnissen von fPSA zum Gesamt-PSA konnte die Karzinom-Detektionsrate nicht verändert werden [Roddam et al., 2005]. Die Sensitivität und Spezifität, die durch die Untersuchung von mittels WCX-Beads fraktionierten Serumproben erzielt werden konnten, liegen damit deutlich über denen des PSA-Wertes.

4.2.1.3 Harnblasen- und Prostatakarzinompatienten

Sowohl die Klassifizierung von Harnblasen- und PCa-Patienten als auch von Harnblasen- und PCa-Patienten sowie gesunden Kontrollpatienten basierend auf den Ergebnissen der MALDI-TOF-MS Analyse von mittels WCX-Beads fraktionierten Serumproben erreichte Werte für die Sensitivität zur Erkennung der einzelnen Klassen von bis zu 100%. In beiden Gruppenkonstellationen erzielte die SVM die besten Ergebnisse. So konnten basierend auf eine SVM Harnblasen- und PCa-Patienten mit einer Sensitivität von 92% bzw. 91% erkannt werden. Auch die Zuordnung zu den drei Gruppen Harnblasen- und PCa-Patienten sowie gesunden Kontrollen konnte mittels einer SVM mit einer Sensitivität von 83%, 91% und 96% erfolgen. Genauere Angaben bezüglich der identifizierten Peaks sind aufgrund eines laufenden Patentierungsverfahrens nicht möglich.

Diese Diskriminierung zwischen den zwei häufigsten urologischen Tumoren einerseits und andererseits zusätzlich zu den gesunden Kontrollen ist in der Literatur bisher noch nicht beschreiben. Auch scheint eine derartige Klassifikation durch einen singulären Marker nicht möglich. Die Erkrankungen sind zu komplex, so daß nur die gleichzeitige Analyse mehrerer Marker erfolgversprechend erscheint [Ornstein et al., 2004].

4.2.2 Serumfraktionierung mit WAX-Beads

Im Vergleich der mittels WAX-Beads fraktionierten Seren von PCa-Patienten mit den gesunden Kontrollen konnte die Software 54 Peaks im Bereich zwischen 1-20 kDa identifizieren. Hierbei zeigte sich der „Eigene GA“ mit einer Sensitivität von 99% und einer

Spezifität von 92% am besten in der Lage, die Patienten zu klassifizieren. Kritisch ist allerdings zu bewerten, daß das Durchschnittsalter beider Gruppen 16 Jahre auseinander liegt. Dadurch kann es ggf. zu einer fälschlicherweise zu guten Klassifizierung aufgrund des hohen Altersunterschiedes zwischen beiden Gruppen kommen.

Im Gegensatz zu der Fraktionierung mittels WCX-Beads konnten bei der Serum Fraktionierung mittels WAX-Beads die PCa-Patienten untereinander zumindest teilweise ihres Gleason scores entsprechend getrennt werden. Insbesondere die Trennung zwischen einem Gleason score 6 und 9 konnte durch einen „Eigenen GA“ mit einer Sensitivität von 90% (für Gleason score 6) und 79% (für Gleason score 9) erfolgen.

Derzeit sind in der Literatur weder Studien zu MALDI-TOF-MS basierten Untersuchungen an mittels WAX-Beads fraktionierter Seren von PCa-Patienten zu finden noch SELDI-TOF-MS basierte Analysen mit vergleichbaren Oberflächeneigenschaften der ProteinChips. Ein Vergleich mit den Werten für die Sensitivität und Spezifität der PSA-Bestimmung zeigt für diese mit Werten von 67% bzw. 20-30% [Li et al., 2004; Ornstein et al., 2000] deutlich niedrigere Werte als die mittels MALDI-TOF-MS Analyse von durch WAX-Beads fraktioniertem Serum.

4.3 SELDI-TOF-MS

4.3.1 Serumfraktionierung mit CM10 ProteinChip

Es wurde in Analogie zu den Versuchen mit WCX-Beads Harnblasenkarzinompatienten (20) mit Patienten der urologischen Poliklinik (24) verglichen. Die Software konnte insgesamt 147 Peaks in einem Massenbereich zwischen 1-20 kDa detektieren. Unter Verwendung der verschiedenen Algorithmen konnten Werte für die Sensitivität von bis zu 70% und für die Spezifität von bis zu 70% erreicht werden. Dabei zeigte sich der „Eigene GA“ mit einer Sensitivität von 70% und einer Spezifität von 70% als der beste Algorithmus zu Klassifizierung.

Der derzeitige Goldstandard, die Zytologie liegt mit ihrer Spezifität von bis zu 94% [Boman et al., 2002] über den Werten der SELDI-Analyse. Die Werte für die Sensitivität der Zytologie sind stark abhängig vom Differenzierungsgrad des Tumors, liegen aber sowohl für *high-grade*-Tumoren mit etwa 67% als auch für *low-grade*-Tumoren mit etwa 35% [Karakiewicz et al., 2006; Curry et al., 2002; Hughes et al., 2000] unter dem Wert der SELDI-Analyse. Die Weißlicht-Zystoskopie übertrifft mit einer Sensitivität von 73% [Sarosdy et al., 2002;

Kriegmair et al., 1996] den Wert der SELDI-Analyse, jedoch bleibt die Spezifität mit 37% hinter der der SELDI-Analyse zurück.

4.3.2 Urinfraktionierung mit CM10 ProteinChips

Es wurden Urinproben der von Patienten mit Harnblasenkarzinom (8) und Urinproben von Patienten der urologischen Poliklinik (8) miteinander verglichen. Unter Verwendung der verschiedenen Algorithmen, basierend auf 1-9 Peaks, erreichten die Werte für die Sensitivität bis zu 100% und für die Spezifität bis zu 78% erreicht werden. Die besten Ergebnisse in der Klassifizierung erzielte der „Eigene GA“ mit einer Sensitivität von 100% und einer Spezifität von 78%.

In der Literatur gibt es mehrere Studien, die Urinproben von Harnblasenkarzinompatienten mittels SELDI-TOF-MS untersucht haben. So konnten Müller et al. z.B. in ihrem Trainingset eine Sensitivität von 80% und eine Spezifität von 90-97% und in ihrem Testset von 52-57% bzw. 57-62% [Mueller et al., 2005]. Vlahou et al. erreichten in ihrer Studie eine Sensitivität von 87% und eine Spezifität von 66% [Vlahou et al., 2001]. Die im Rahmen dieser Arbeit erzielten Werte für die Sensitivität und Spezifität liegen damit leicht über den übrigen Werten. Jedoch waren die Fallzahlen der anderen Studien größer, wodurch die etwas schlechteren Werte erklärt werden könnten.

4.4 Vergleich der Ergebnisse aus MALDI- und SELDI-TOF-MS

Beim Vergleich der sowohl mittels MALDI- als auch mittels SELDI-TOF-MS vermessenen Probenkollektive (Seren von Harnblasenkarzinompatienten und Patienten der urologischen Poliklinik) fällt auf, daß die Ergebnisse für die Sensitivität und Spezifität für die MALDI-Analyse mit 97% bzw. 98% deutlich über denen der SELDI-Analyse (beide 70%) liegen. Die Oberflächeneigenschaften der Beads und der ProteinChips sind einander ähnlich, so daß man eigentlich von dieser Werte aus Ergebnisse erwarten würde, die näher zusammen liegen. Jedoch ist das PBS IIc Instrument im Gegensatz zu dem Reflex IV Gerät ein Massenspektrometer mit geringerer Auflösung und relativ schlechter Massengenauigkeit [Ornstein et al., 2004], was die deutlichen Unterschiede zwischen den Ergebnissen beider Methoden erklären könnte.

4.5 MALDI imaging

In der Suche nach neuen Markermolekülen, die die Diagnostik des Harnblasen- und des Prostatakarzinoms verbessern sollen, wurden Gewebe-basierte Ansätze zum Teil durch die nur in limitierter und nicht immer ausreichender Anzahl zur Verfügung stehenden Zellen behindert. Für die Mehrzahl der sowohl genomischen als auch proteomischen Studien müssen die Zellen von Interesse zunächst aus einem heterogenen Gewebeverband isoliert werden. Die Anzahl der Zellen, die für die suffiziente massenspektrometrische Analyse benötigt werden, schwankt je nach Protokoll zwischen 1.000 bis 50.000 Zellen [Krieg et al., 2004; Zheng et al., 2003]. Bezogen auf einige Tumorentitäten ist es nahezu unmöglich, diese Zellzahlen durch Mikrodissektion zu erreichen (z.B. Carcinoma in situ der Harnblase, Zellen aus dem Bereich der Perineuralscheideninfiltration des Prostatakarzinoms, Hodgkin- und Reed-Sternberg-Zellen des Morbus Hodgkin). Die Methode des MALDI imaging ermöglicht jedoch durch die direkte massenspektrometrische Analyse eines Gefrierschnittes eine Korrelation zwischen den erzeugten Massenspektren und der Histologie [Caprioli et al., 1997], so daß eine Mikrodissektion nicht mehr von Nöten ist. Damit eignet sich diese Methode im Besonderen für die Analyse der zuvor beschriebenen Tumorentitäten. So konnte z.B. auch zwischen Lymphknoten mit Infiltraten eines Hodgkin Lymphom und normalen bzw. entzündlich veränderten Lymphknoten mit einer Sensitivität von 84% und einer Spezifität von 89% differenziert werden [Schwamborn et al., in submission].

4.5.1 Harnblasenbiopsien

Durch die Analyse von Harnblasenbiopsien mittels MALDI imaging konnten mit Hilfe der Software ClinProTools beim Vergleich aller ROIs der Tumorproben mit allen ROIs der Normalurothelproben 118 Peaks in einem Bereich zwischen 1-20 kDa detektiert werden. Basierend auf 1-23 Peaks war die Software in der Lage, Algorithmen zu finden, wobei jeder für sich genommen entweder eine hohe Sensitivität oder eine hohe Spezifität aufwies. Dabei erreichten die Werte für die Sensitivität maximal 98% und die Werte für die Spezifität maximal 100%. Der Vergleich des Normalurothels mit den nach ihrem T-Stadium getrennten Tumoren zeigte für alle drei untersuchten T-Stadien-Gruppen (pTa, pTis und pT1+2) eine Zunahme der Sensitivität und Spezifität. Hierbei wurden die besten Werte beim Vergleich der *low-grade* pTa Tumoren mit den Normalurothelproben erzielt („Eigener GA“: Sensitivität 94% und Spezifität 95%). Die schlechtesten Werte ergab der Vergleich zwischen Carcinomata in situ und dem Normalgewebe. Die schlechtere Klassifizierbarkeit der Carcinomata in situ kann durch das histologische Bild erklärt werden. Während bei den anderen T-Stadien die

Tumorzellen überwiegend in großen Gruppen zusammen liegen, finden sich beim Carcinom in situ zum Teil nur einzelne zytologisch deutlich auffällige Zellen, die zwischen einer überwiegenden Mehrzahl von Normalurothel liegen. Der Vergleich der drei verschiedenen T-Stadien untereinander zeigte Werte für die Sensitivität um die 90%.

Die sogenannten *class images* wurden durch die Anwendung des Algorithmus auf jedes Spektrum des gesamten Schnittpräparates erzeugt, wobei das Harnblasenkarzinom durch rote Pixel und das Normalurothel bzw. Normalgewebe durch grüne Pixel repräsentiert wurde. Das *class image* zeichnete sich durch eine hohe Deckungsgleichheit mit dem zugehörigen H&E-Bild desselben Schnittpräparates aus. In jedem *class image* finden sich jedoch auch schwarze Pixel, die nicht klassifizierbaren Spektren entsprechen. Bei diesen handelt es sich entweder um Spektren, die keiner der Klassen zugeordnet werden konnten, oder um Spektren von unzureichender Qualität. Letztere können zum einen durch den Prozeß der Matrixapplikation verursacht sein, zum anderen durch das nicht ausreichend entfernte OCT-Polymer. Aufgrund der kleinen Probendurchmesser der Biopsien müssen diese in reichlich OCT-Polymer eingebettet werden.

Derzeit gibt es in der Literatur keine Studien zu MALDI imaging von Harnblasentumoren und lediglich eine massenspektrometrische Analyse an Lysaten von Harnblasengewebe [Langbein et al., 2006]. Aufgrund der bereits erwähnten Schwierigkeiten, die das Carcinoma in situ in Bezug auf die Mikrodissektion mit sich bringt, sind in dieser Studie auch nur pTa, G2 Tumoren (7) und invasive Tumoren mit einem T-Stadium größer als 3 (5) untersucht worden. Dabei konnten in sechs der pTa, G2 Tumoren zwei in ihrer Intensität deutlich über denen der invasiven Tumoren liegende Peaks bei 6,7 und 10,1 kDa identifiziert werden. Alle invasiven Tumoren zeigten wiederum einen deutlichen Peak bei 9,5 kDa.

4.5.2 Prostatagewebeblöcke

Die Anwendung der Technik des MALDI imaging (IMS) an Gefrierschnitten von Prostatagewebeblöcken erbrachte 85 Peaks in einem Bereich von 1-20 kDa. Insbesondere im Bereich zwischen 1-15 kDa konnte eine Reihe Peaks identifiziert werden, die zwischen den Arealen mit Prostatakarzinom und denen mit normalem Prostatagewebe differentiell exprimiert waren. Die Auswertung der Spektren dieser Regionen mit und ohne Karzinomnachweis erbrachte Algorithmen, die in der Lage waren, zwischen den beiden Klassen (Karzinom und gesund) zu unterscheiden. Die besten Ergebnisse erzielte die SVM mit einer Sensitivität von 85,21% und einer Spezifität von 90,74% basierend auf 22 Peaks mit einer

Masse zwischen 1,4 und 12,4 kDa. Vier dieser Peaks grenzten sich hierbei durch ihren größeren Einfluß auf die Klassifikation von den übrigen 18 Peaks ab: 2.753 Da und 6.704 Da für die normalen Prostatadrüsen sowie 4.964 Da und 5.002 Da für das Karzinom. Ausgehend von diesen vier Peaks und unter Einbeziehung eines fünften Peaks (8.450 Da) konnte ein fünf-dimensionaler GA mit einer Sensitivität von 70,04% und einer Spezifität von 84,42% generiert werden.

Durch die Anwendung des Algorithmus auf jedes Spektrum des gesamten Schnittpräparates konnte das sogenannte *class image* erzeugt werden, wobei das Prostatakarzinom durch rote Pixel und normales Gewebe durch grüne Pixel repräsentiert wurde. Das *class image* zeichnete sich durch eine hohe Deckungsgleichheit mit dem zugehörigen H&E-Bild desselben Schnittpräparates aus. Auffällig sind jedoch auch die schwarzen Pixel, die nicht klassifizierbaren Spektren entsprechen. Diese stellen zum einen Spektren dar, die weder in die Klasse der Karzinome noch in die Klasse des normalen Gewebes sortiert werden konnten, zum anderen Spektren von unzureichender Qualität. Diese sind verursacht durch den Prozeß der Matrixapplikation auf den Gefrierschnitt. Da die Matrixlösung von Hand mittels eines TLC-Spüheres aufgetragen wird, kommt es trotz sehr sorgfältiger und standardisierter Durchführung zu einer nicht vollständig homogenen Bedeckung des Schnittes mit Matrix. An den Stellen, an denen nicht ausreichend oder zu viel Matrix vorhanden ist, entstehen bei der Analyse im MS-Gerät in ihrer Qualität unzureichende Spektren. Dieses Problem kann behoben werden, indem die Matrixlösung mit Hilfe einer Maschine erfolgt, die sich allerdings noch in der Entwicklungsphase bzw. frühen Testphase befindet.

Da dies die ersten Ergebnisse der Anwendung dieser vergleichsweise neuen Technik an Prostatagewebe darstellen, gibt es keine Studien, die einen direkten Vergleich ermöglichen, sondern lediglich Studien, die massenspektrometrische Analysen an Lysaten von Prostatagewebe durchgeführt haben. In einer Studie an normalen, benignen, präneoplastischen und malignen Prostataepithelien konnten Cazares et al. mehrere differentiell exprimierte Peptide und Proteine mittels SELDI-TOF-MS identifizieren [Cazares et al., 2002]. Im Vergleich mit den normalen Epithelien zeigten 22% der präneoplastischen und 29% der malignen Epithelien eine Überexpression eines Proteins mit einer Masse von 8.445 Da. Daneben fanden sich zwei weitere Proteine mit einer Masse von 3.448 Da und 4.749 Da, die in den malignen Epithelien überexprimiert waren. Durch die IMS Analyse konnten drei Proteine mit einer Masse von 3.441 Da, 8.450 Da und 4.747 Da identifiziert werden, die in den Regionen mit Prostatakarzinom eine leicht erhöhte bis erhöhte Expression aufwiesen. Die geringen Unterschiede in den Angaben der Massen können hierbei durch die Unterschiede beider Analyseverfahren bedingt sein. Ein weiteres, 5.666 Da schweres Protein fanden Cazares et al. vor allem in den Proben mit BPH überexprimiert. Die

IMS Analyse konnte ein 5.652 Da Protein identifizieren, das jedoch eine leicht erhöhte Expression in den Regionen mit Prostatakarzinom zeigte. Aufgrund der in diesem Fall doch etwas deutlicheren Unterschiede in der Masse sowie in den Ergebnissen bezogen auf die Expression, ist nicht auszuschließen, daß es sich um zwei verschiedene Proteine handelt.

Wright et al. beschrieben unter Verwendung der SELDI-TOF-MS ein Protein mit einer Masse von 3.574 Da, welches in den Karzinomproben im Gegensatz zu den normalen Proben heraufreguliert ist [Wright et al., 1999]. In der IMS basierend Analyse fand sich ein 3.588 Da schweres Protein, welches sich jedoch in den normalen Regionen überexprimiert zeigte. Da sich die Ansätze bzw. Techniken, die verwendet wurden, sowie die Ergebnisse bezüglich der Masse des Proteins und des Verteilungsmusters deutlicher unterschieden, ist auch hier nicht sicher zu sagen, ob es sich um das gleiche Protein handelt.

Eine Reihe anderer Studien konnten verschiedene Proteine identifizieren, die in den Drüsen des Prostatakarzinoms und im angrenzenden Stroma herauf oder herunter reguliert waren [Liu et al., 2005; Cheung et al., 2004; Wellmann et al., 2002]. Jedoch konnte keines dieser Proteine durch die IMS-basierten Ergebnisse verifiziert werden.

4.5.3 Prostatastanzen

Die Anwendung des MALDI imaging auch an kleinen Gewebeproben wie Biopsien zeigte sich am Beispiel der Harnblase sehr gut realisierbar. Das Problem, das sich mit zunehmend kleinerer Probengröße ergibt, ist die Notwendigkeit der Verwendung von OCT-Polymer. Die Probe muß komplett in das Polymer eingebettet werden, damit sie im Kryostat schneidbar ist. Das OCT-Polymer verringert jedoch die Qualität des Massenspektrums durch Reduktion der Intensität.

Bei den Prostatastanzen handelt es sich um kleinste Gewebeproben (im Durchschnitt 0,8 x 0,1 cm). Diese sind damit überwiegend kleiner als die Biopsien der Harnblase. Aufgrund dessen müssen sie komplett von OCT-Polymer umgeben sein, um zum einen das Gewebe beim Einfrieren zu schonen und zum anderen um schneidbar zu sein.

Die Spektren der Prostatastanzen zeigten trotz der Verwendung des Protokolls zur Entfernung des OCT-Polymers im Allgemeinen eine deutlich geringere Qualität der Spektren im Vergleich zu denen der Harnblasenbiopsien oder der Prostatagewebeblöcke. Durch die Anwendung des anhand der Untersuchung der Prostatagewebeblöcke erstellten SVM-Algorithmus konnte nur ein kleiner Teil der Spektren (etwa 1/8) klassifiziert werden. Unter

den klassifizierbaren Spektren erfolgte jedoch die Zuordnung zu der richtigen Klasse in etwa 75% der Spektren.

4.5.4 Formalin-fixiertes und paraffin-eingebettetes Gewebe

Formalin-fixiertes und paraffin-eingebettetes (FFPE) Gewebe bildet die Grundlage für die Diagnostik in der überwiegenden Mehrzahl aller pathologischen Institute weltweit [Hood et al., 2006]. Diese Methode der Gewebefixation und -einbettung eignet sich in besonderer Weise, da das Gewebe zum einen nur geringe Schrumpfungsartefakte erleidet und zum anderen in stabiler Form bei Raumtemperatur über einen langen Zeitraum lagerfähig ist [Becker et al., 2007]. Aufgrund der Eigenschaft des Formalins, die Proteine quervernetzen, ging man bisher davon aus, daß mit Formalin behandeltes Gewebe nicht für proteomische Analysen verwendet werden kann. Lediglich immunhistochemische Untersuchungen stellen die einzige Methode dar, „proteomische“ Informationen aus FFPE-Gewebe zu erhalten [Hood et al., 2005]. FFPE Gewebe ist jedoch weltweit in deutlich größerem Maßstab vorhanden als Gefriergewebe, eine Tatsache, die vor allem bei seltenen Erkrankungen von großer Bedeutung ist.

Um FFPE Gewebe dem MALDI imaging zugänglich zu machen, wurden insgesamt sechs verschiedene Methoden der Antigendemaskierung angewendet und untereinander sowie mit Gefriergewebe des gleichen Tumors verglichen. Dadurch sollte versucht werden, die Proteine für die anschließende massenspektrometrische Untersuchung verfügbar zu machen. Es konnte jedoch mit keiner der Methoden eine suffiziente Antigendemaskierung erreicht werden, die eine Voraussetzung für eine aussagekräftige massenspektrometrische Analyse wäre.

In der Literatur gibt es vor allem in der jüngsten Zeit einzelne Studien, die eine erfolgreiche massenspektrometrische Analyse von FFPE Gewebe beschreiben [Hwang et al., 2007; Hood et al., 2005]. Jedoch handelt es sich bei beiden Studien nicht um IMS Analysen, sondern um MS Analysen von Gewebelysaten, die zudem mit Trypsin verdaut wurden. Eine vergleichbare Anwendung direkt an Schnittpräparaten ist bisher noch nicht beschrieben.

Zudem gibt es seit neuestem auch in Deutschland zwei kommerziell erhältliche Kits, die eine Isolierung von Proteinen aus FFPE Gewebe ermöglichen sollen (Qproteome FFPE Tissue Kit, Qiagen [Becker et al., 2007] und ProteoExtract® Formalin Fixed Tissue Kit, Merck). Beide verwenden aber auch mikrodissiziertes Gewebe und eignen sich nicht für die Anwendung an Schnittpräparaten direkt. Eine Testreihe mit dem ProteoExtract® Formalin

Fixed Tissue Kit erzielte in der Proteomic Core Facility des UKA im Vergleich zum Gefriergewebe eine deutlich schlechtere Proteinausbeute im Western Blot, 2D-SDS-PAGE und SELDI-TOF-MS.

5 Zusammenfassung und Ausblick

Das Harnblasenkarzinom und das Prostatakarzinom zählen zu den drei häufigsten urologischen Tumorerkrankungen. Beiden ist gemeinsam, daß die derzeitigen Standardmethoden der Diagnostik (Zystoskopie und Zytologie für das Harnblasenkarzinom, PSA-Wert-Bestimmung, digital-rektale Untersuchung und histologische Untersuchung von Stanzbiopsien für das Prostatakarzinom) sich durch zu niedrige Werte in ihrer Sensitivität und Spezifität auszeichnen. Eine sichere und frühzeitige Diagnose ist aber, wie bei der Mehrzahl der malignen Erkrankung, für den Patienten mit besseren Heilungschancen verbunden. Insbesondere beim Urothelkarzinom spielt auch die zum Teil lebenslange sensitive Nachsorge eine entscheidende Rolle, da die Karzinome häufig rezidivieren.

Basierend auf der Hypothese, daß das Proteom sich aufgrund seiner im Gegensatz zum Genom größeren Komplexität und Flexibilität besser zu einer Suche nach potentiellen Tumormarkern eignet, wurden an beide Tumorentitäten für Gewebe und Körperflüssigkeiten verschiedene proteomische Analysemethoden (2D-SDS-PAGE, MALDI- und SELDI-TOF-MS sowie MALDI imaging) getestet.

Insbesondere die Analysen von mittels magnetischer Beads fraktionierten Serumproben von Patienten beider Entitäten im Vergleich untereinander sowie mit verschiedenen Kontrollkollektiven erbrachte Werte für die Sensitivität und Spezifität die über denen der Standardmethoden lagen. Auch die Gewebeanalysen beider Entitäten mittels MALDI imaging zeigten gute Ergebnisse bezüglich ihrer Klassifizierungen.

Auf der Grundlage der Ergebnisse dieser Arbeit kann versucht werden, durch die Identifizierung der potentiellen Markermoleküle valide und sensitive Tests für die Erstdiagnose des Harnblasen- und Prostatakarzinoms sowie deren Nachsorge zu entwickeln.

6 Literaturverzeichnis

- 1 **Adam** BL, Qu Y, Davis JW, et al. Serum protein fingerprinting coupled with a pattern-matching algorithm distinguishes prostate cancer from benign prostate hyperplasia and healthy men. *Cancer Res* 62:3609-3614, 2002.
- 2 **Advanced Bladder Cancer (ABC) Meta-analysis Collaboration**: Adjuvant chemotherapy in invasive bladder cancer: a systematic review and meta-analysis of individual patient data Advanced Bladder Cancer (ABC) Meta-analysis Collaboration. *Eur Urol* 48:189-199, 2005.
- 3 **Aebersold** R, Mann M. Mass spectrometry-based proteomics. *Nature* 422:198-207, 2003.
- 4 **Alaiya** A, Al-Mohanna M, Linder S. Clinical cancer proteomics: promises and pitfalls. *J Proteome Res* 4(4):1213-1222, 2005.
- 5 **Alberti** C. Prostate cancer progression and surrounding microenvironment. *Int. J. Biol. Markers*, 21(2): 88-95, 2006.
- 6 **Al-Sukhun** S, Hussain M. Current Understanding of the biology of advanced bladder cancer. *Cancer* 97(8 Suppl):2064-2075, 2003.
- 7 **Anderson** NL, Anderson NG. The human plasma proteome. History, character, and diagnostic prospects. *Mol Cell Proteomics* 1:845-867, 2002.
- 8 **Aus** G, Abbou CC, Bolla M, et al. EAU guidelines on prostate cancer. *Eur Urol* 48:546-551, 2005.
- 9 **Ayala** GE, Dai H, Tahir SA, et al. Stromal antiapoptotic paracrine loop in perineural invasion of prostatic carcinoma. *Cancer Res.* 66(10): 5159-5164, 2006.
- 10 **Baggerly** KA, Morris JS, Edmonson SR, Coombes KR. Signal in noise: evaluating reported reproducibility of serum proteomic tests for ovarian cancer. *J Natl Cancer Inst* 97(4):307-309, 2005.
- 11 **Baillargeon** J, Rose DP. Obesity, adipokines, and prostate cancer. *Int J Oncol* 28:737-745, 2006.
- 12 **Bangma** CH, Verhagen PCMS. Blood and serum substances for markers of prostate cancer. *Microsc Res Tech* 51(5):430-435, 2000.

- 13 **Banks** RE, Dunn MJ, Hochstrasser DF, Sanchez JC, Bickstock W, Pappin DJ, Selby PJ. Proteomics: new perspectives, new biomedical opportunities. *Lancet* 356:1749-1756, 2000.
- 14 **Becker** KF, Schott C, Hipp S, et al. Quantitative protein analysis from formalin-fixed tissues: implications for translational clinical research and nanoscale diagnosis. *J Pathol* 211:370-378, 2007.
- 15 **Bedwani** R, El-Khwsy F, La Vecchia C, Boffetta P, Levi F. Descriptive epidemiology of bladder cancer in Egypt. *Int J Cancer* 55:351-352, 1993.
- 16 **Belanger** A, van Halbeek H, Graves HC, et al. Molecular mass and carbohydrate structure of prostate specific antigen: studies for establishment of an international PSA standard. *Prostate*, 27(4):187-197, 1995.
- 17 **Birch** BR, Harland SJ. The pT1 G3 bladder tumour. *Br J Urol* 64:109-116, 1986.
- 18 **Bjellqvist** B, Ek K, Righetti PG, Gianazza E, Görg A, Westermeier R, Postel W. Isoelectric focussing in immobilized pH gradients: principle, methodology and some applications. *J Biochem Biophys Methods* 6:317-339, 1982.
- 19 **Bjorhall** K, Miliotis T, Davidsson P. Comparison of different depletion strategies for improved resolution in proteomic analysis of human serum. *Proteomics* 5:307-317, 2004.
- 20 **Black** PC, Brown GA, Dinney CP. Molecular markers of urothelial cancer and their use in the monitoring of superficial urothelial cancer. *J Clin Oncol* 24:5528-5535, 2006.
- 21 **Black** MH, Giai M, Ponzzone R, Sismondi P, Yu H, Diamandis EP. Serum total and free prostate-specific antigen for breast cancer diagnosis in women. *Clin Cancer Res.* 6(2):467-473, 2000.
- 22 **Blomberg** A, Blomberg L, Fey SJ, et al. Interlaboratory reproducibility of yeast protein patterns analyzed by immobilized PH gradient two-dimensional gel electrophoresis. *Electrophoresis* 16:1935-1945, 1995.
- 23 **Böcker** W, Denk H, Heitz PU. *Pathologie*. 3.Auflage. Elsevier GmbH München, 2004.
- 24 **Boman** H, Hedelin H, Holmäng S. Four bladder tumor markers have a disappointingly low sensitivity for small size and low grade recurrence. *J Urol* 167:80-83, 2002.
- 25 **Borden** LS Jr, Clark PE, Hall MC. Bladder cancer. *Curr Opin Oncol* 15:227-233, 2003.

-
- 26 **Borden** LS Jr, Clark PE, Hall MC. Bladder cancer. *Curr Opin Oncol* 17:275-280, 2005.
- 27 **Brawer** MK. Prostate-specific antigen: current status. *CA Cancer J Clin*, 49:264-282, 1999.
- 28 **Brennan** P, Bogillot O, Cordier S, et al., Cigarette smoking and bladder cancer in men: a pooled analysis of 11 case-control studies. *Int J Cancer* 86:289-294, 2000.
- 29 **Breslow** N, Chan CW, Dhom G, et al. Latent carcinoma of prostate at autopsy in seven areas. *Int J Cancer* 20:680-688, 1977.
- 30 **Byar** DP, Mostofi FK. Carcinoma of the prostate: prognostic evaluation of certain pathologic features in 208 radical prostatectomies. The Veterans Administrative Cooperative Urologic Research Groups. *Cancer* 30:5-13, 1972.
- 31 **Caprioli** RM, Farmer TB, Gile J. Molecular imaging of biological samples: localization of peptides and proteins using MALDI-TOF-MS. *Anal Chem.* 69(23): 4751-4760, 1997.
- 32 **Castelao** JE, Yuan JM, Skipper PL, Tannenbaum SR, Gago-Dominguez M, Crowder JS, Ross RK, Yu MC. Gender- and smoking-related bladder cancer risk. *J Natl Cancer Inst* 93:538-545, 2001.
- 33 **Cazares** LH, Adam BL, Ward MD, Nasim S, Schellhammer PF, Semmes OJ, Wright GL Jr. Normal, benign, preneoplastic, and malignant prostate cells have distinctive protein expression profiles revealed by surface enhanced laser desorption/ionization mass spectrometry. *Clin Cancer Res* 8(8):2541-2552, 2002.
- 34 **Celis** JE, Gromoy P. Proteomics in translational cancer research: Towards an integrated approach. *Cancer Cell* 3(1):9-15, 2003.
- 35 **Chan** JM, Stampfer MJ, Giovannucci E, Gann PH, Ma J, Wilkinson P, Hennekens CH, Pollak M. Plasma insulin-like growth factor-I and prostate cancer risk: a prospective study. *Science* 279:563-566, 1998.
- 36 **Chaurand** P, Norris JL, Cornett DS, Mobley JA, Caprioli RM. New developments in profiling and imaging of proteins from tissue sections by MALDI mass spectrometry. *J Proteome Res.* 5(11):2889-2900, 2006.
- 37 **Chaurand** P, Schwartz SA, Reyzer ML, Caprioli RM. Imaging mass spectrometry: principles and potentials. *Toxicol Pathol.* 33(1):92-101, 2005.
- 38 **Chaurand** P, Sanders ME, Jensen RA, Caprioli RM. Proteomics in diagnostic pathology. Profiling and imaging proteins directly in tissue sections. *Am J Pathol* 165:1057-1068, 2004.

-
- 39** **Chaurand P**, Stoeckli M, Caprioli RM. Direct profiling of proteins in biological tissue sections by MALDI mass spectrometry. *Anal Chem.* 71(23):5263-5270, 1999.
- 40** **Cheung PK**, Woolcock B, Adomat H, et al. Protein profiling of microdissected prostate tissue links growth differentiation factor 15 to prostate carcinogenesis. *Cancer Res* 64(17): 5929-5933, 2004.
- 41** **Chu LF**, Chen Z, Stamey TA. Different molecular forms of uncomplexed prostate specific antigen (PSA) show similar immunoreactivities. *J Urol.* 161(6):2009-2012, 1999.
- 42** **Clavel J**, Cordier S, Boccon-Gibod L, Hemon D. Tobacco and bladder cancer in males: increased risk for inhalers and smokers of black tobacco. *Int J Cancer* 44:605-610, 1989.
- 43** **Cohen SM**. Role of urinary physiology and chemistry in bladder carcinogenesis. *Food Chem Toxicol* 33:715-730, 1995.
- 44** **Condon M.S**. The role of the stromal microenvironment in prostate cancer. *Semin. Cancer Biol.*, 15(2): 132-137, 2005.
- 45** **Corbett J**, Dunn MJ, Posch A, Görg A. Positional reproducibility of protein spots in two-dimensional polyacrylamid gel electrophoresis using immobilized pH gradient isoelectric focussind in the first dimension: an interlaboratory comparison. *Electrophoresis* 15:1205-1211, 1994.
- 46** **Cordingley HC**, Roberts SL, Tooke P, Armitage JR, Lane PW, Wu W, Wildsmith SE. Multifactorial screening design and analysis of SELDI-TOF ProteinChip® array optimization experiments. *Biotechniques* 34:364-373, 2003.
- 47** **Cornett DS**, Mobley JA, Dias EC, Andersson M, Arteaga CL, Sanders ME, Caprioli RM. A novel histology-directed strategy for MALDI-MS tissue profiling that improves throughput and cellular specificity in human breast cancer. *Mol Cell Proteomics* 5(10):1975-1983, 2006.
- 48** **Craven RA**, Totty N, Harden P, Selby PJ, Banks RE. Laser capture microdissection and two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis: evaluation of tissue preparation and sample limitations. *Am J Pathol* 160(3):815-822, 2002.
- 49** **Curry JL**, Wojcik EM. The effects of the current World Health Organization and International Society of Urologic Pathologists bladder neoplasm classification system in urine cytology results. *Cancer* 96:140-145, 2002.

-
- 50 **Datta** SN, Allen GM, Evans R, Vaughton KC, Lucas MG. Urinary tract ultrasonography in the evaluation of haematuria – a report of over 1,000 cases. *Ann R Coll Surg Engl* 84:203-205, 2002.
- 51 **Davis** JW, Sheth SI, Doviak MJ, Schellhammer PF. Superficial bladder carcinoma treated with bacillus Clamette-Guerin: progression-free and disease specific survival with minimum 10-year followup. *J Urol* 167:494-500, 2002.
- 52 **De Marzo** AM, Platz EA, Sutcliffe S, et al. Inflammation in prostate carcinogenesis. *Nat Rev Cancer* 7(4):256-269, 2007.
- 53 **De Marzo** AM, Marchi VL, Epstein JI, Nelson WG. Proliferative inflammatory atrophy of the prostate: implications for prostatic carcinogenesis. *Am J Pathol* 155:1985-1992, 1999.
- 54 **Denis** L, Morton MS, Griffiths K. Diet and its preventive role in prostatic disease. *Eur Urol* 35:377-387, 1999.
- 55 **Dinney** CPN, McConkey DJ, Millikan RE, et al. Focus on bladder cancer. *Cancer Cell* 6:111-116, 2004.
- 56 **Draisma** G, Boer R, Otto SJ, van der Crujisen IW, Damhuis RAM, Schröder FH, de Koning HJ. Lead times and overdetection due to prostate-specific antigen screening: estimates from the European Randomized Study of screening for prostate cancer. *J Natl Cancer Inst* 95(12):868-878, 2003.
- 57 **Droller** MJ. Bladder cancer: state-of-the-art care. *CA Cancer J Clin* 48(5):269-284, 1998.
- 58 **Duggan** B, Williamson K. Molecular markers for predicting recurrence, progression and outcomes of bladder cancer (do the poster boys need new posters?). *Curr Opin Urol* 14(5):277-286, 2004.
- 59 **Dutta** SC, Smith JA Jr, Shappell SB, Coffey CS, Chang SS, Cookson MS. Clinical understaging of high risk non-muscle invasive urothelial carcinoma treated with radical cystectomy. *J Urol* 166:490-493, 2001.
- 60 **Eble** JN, Sauter G, Epstein JI, Sesterhenn IA. *Pathology and genetics of tumours of the urinary system and male genital organs*. IARC Press Lyon 2004.
- 61 **Eichenauer** R, Sandmann J, Vanherpe H. *Klinikleitfaden Urologie*. Urban & Fischer Verlag München, 2003.
- 62 **Elo** JP, Visakorpi T. Molecular genetics of prostate cancer. *Ann Med* 33:130-141, 2001.

-
- 63** **Frohneberg** D. Muskelinvasives Harnblasenkarzinom. *Dtsch Arztebl* 104(13):A868-872, 2007.
- 64** **Giovannucci** E, Michaud D. The role of obesity and related metabolic disturbances in cancers of the colon, prostate and pancreas. *Gastroenterology* 132:2208-2225, 2007.
- 65** **Giovannucci** E, Rimm EB, Colditz GA, Stampfer MJ, Ascherio A, Chute CC, Willett WC. A prospective study of dietary fat and risk of prostate cancer. *J Natl Cancer Inst* 85(19):1571-1579, 1993.
- 66** **Gleason** DF, Mellinger GT. Prediction of prognosis for prostatic adenocarcinoma by combined histological grading and clinical staging. *J Urol* 111:58-64, 1974.
- 67** **Gleason** DF. Classification of prostatic adenocarcinomas. *Cancer Chemother Rep* 50:125-128, 1966.
- 68** **Görg** A, Obermaier C, Boguth G, Harder A, Scheibe B, Wildgruber R, Weiss W. The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. *Electrophoresis* 21:1037-1053, 2000.
- 69** **Görg** A, Obermaier C, Boguth G, Csordas A, Diaz JJ, Madjar JJ. Very alkaline immobilized pH gradients for two-dimensional electrophoresis of ribosomal and nuclear proteins. *Electrophoresis* 18:328-337, 1997.
- 70** **Görg** A. Two-dimensional electrophoresis. *Nature* 349:545-546, 1991.
- 71** **Görg** A, Postel W, Günther S. The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. *Electrophoresis* 9:531-546, 1988.
- 72** **Golka** K, Goebel PJ, Rettenmeier AW. Bladder cancer: etiology and prevention. *Dtsch Arztebl* 104(11):A719-723, 2007.
- 73** **Gong** Z, Neuhauser ML, Goodman PJ, et al. Obesity, diabetes, and risk of prostate cancer: results from the prostate cancer prevention trial. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 15(10):1977-1983, 2006.
- 74** **Gronberg** H, Damber L, Damber JE. Familial prostate cancer in Sweden. A nationwide register cohort study. *Cancer* 77:138-143, 1996.
- 75** **Hanahan** D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell* 100:57-70, 2000.
- 76** **Hanash** S. Disease proteomics. *Nature* 422:226-232, 2003.
- 77** **Hanash** SM, Strahler JR, Neel JV, et al. Highly resolving two-dimensional gels for protein sequencing. *Proc Natl Acad Sci USA* 88:5709-5713, 1991.

-
- 78** **Hartmann** A, Schlake G, Zaak D, Hungerhuber E, Hofstetter A, Hofstaedter F, Knuechel R. Occurrence of chromosome 9 and p53 alterations in multifocal dysplasia and carcinoma in situ of human urinary bladder. *Cancer Res* 62:809-818, 2002.
- 79** **Hayat** MJ, Howlader N, Reichman ME, Edwards BK. Cancer statistics, trends, and multiple primary cancer analyses from the surveillance, epidemiology, and end results (SEER) program. *Oncologist* 12:20-37, 2007.
- 80** **Hayes** JD, Pulford DJ. The glutathione S-transferase supergene family: regulation of GST and the contribution of the isoenzymes to cancer chemoprotection and drug resistance. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 30:445-600, 1995.
- 81** **Heney** NM, Ahmed S, Flanagan MJ, Frable W, Corder MP, Hafermann MD, Hawkins IR. Superficial bladder cancer: progression and recurrence. *J Urol* 130:1083-1086, 1983.
- 82** **Holland** RD, Wilkes JG, Rafii F, Sutherland JB, Persons CC, Voorhees KJ, Lay OJ. Rapid identification of intact whole bacteria based on spectral patterns using matrix-assisted laser desorption/ionization with time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* 10:1227-1232, 1996.
- 83** **Hood** BL, Conrads TP, Veenstra T. Mass spectrometric analysis of formalin-fixed paraffin-embedded tissue: Unlocking the proteome within. *Proteomics* 6:4106-4114, 2006.
- 84** **Hood** BL, Darfler MM, Guiel TG, et al. Proteomic analysis of formalin-fixed prostate cancer tissue. *Mol Cell Proteomics* 4:1741-1753, 2005.
- 85** **Hopenhayn-Rich** C, Biggs ML, Fuchs A, Bergoglio R, Tello EE, Nicolli H, Smith AH. Bladder cancer mortality associated with arsenic drinking water in Argentina. *Epidemiology* 7:113-115, 1996.
- 86** **Hsu** CY, Joniau S, Oyen R, Roskams T, Van Poppel H. Detection of clinical unilateral T3a prostate cancer – by digital rectal examination or transrectal ultrasonography? *BJU Int* 98(5):982-985, 2006.
- 87** **Hughes** JH, Raab SS, Cohen MB. The cytologic diagnosis of low-grade transitional cell carcinoma. *Am J Clin Pathol* 114(Suppl.):S59-S67, 2000.
- 88** **Hutchens** TW, Yip TT. New desorption strategies for the mass spectrometric analysis of macromolecules. *Rapid Commun Mass Spectrom* 7:576-580, 1993.
- 89** **Hwang** SI, Thumar J, Lundgren DH, et al. Direct cancer tissue proteomics: a method to identify candidate cancer biomarkers from formalin-fixed paraffin-embedded archival tissues. *Oncogene* 26:65-76, 2007.

-
- 90** **Ideker** T, Thorsson V, Ranish JA, et al. Integrated genomic and proteomic analyses of systematically perturbed metabolic network. *Science* 292:929-934, 2001.
- 91** **Ingles** SA, Ross RK, Yu MC, Irvine RA, La Pera G, Haile RW, Coetzee GA. Association of prostate cancer risk with genetic polymorphisms in vitamin D receptor and androgen receptor. *J Natl Cancer Inst* 89:166-170, 1997.
- 92** **Jakse** G, Algaba F, Malmstrom P, Oosterlinck W. A second-look TUR in T1 transitional cell carcinoma: why? *Eur Urol* 45(5):539-546, 2004.
- 93** **Jakse** G, Loidl W, Seeber G, et al. Stage T1, grade 3 transitional carcinoma of the bladder: an unfavorable tumor? *J Urol* 137:39-43, 1987.
- 94** **Jesnowski** R, Zubakov D, Faissner R, Ringel J, Hoheisel JD, Losel R, Schnolzer M, Lohr M. Genes and proteins differentially expressed during in vitro malignant transformation of bovine pancreatic duct cells. *Neoplasia* 9:136-146, 2007.
- 95** **Jocham** D, Witjes F, Wagner S, et al. Improved detection and treatment of bladder cancer using hexaminolevulinat imaging: a prospective, phase III multicenter study. *J Urol* 174:862-866, 2005.
- 96** **Kantor** AF, Hartge P, Hoover RN, Narayana AS, Sullivan JW, Fraumeni JF Jr. Urinary tract infection and risk of bladder cancer. *Am J Epidemiol* 119:510-515, 1984.
- 97** **Karakiewicz** PI, Benayoun S, Zippe C, et al. Institutional variability in the accuracy of urinary cytology for predicting recurrence of transitional cell carcinoma of the bladder. *BJU* 97:997-1001, 2006.
- 98** **Karas** M, Hillenkamp F. Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons. *Anal Chem* 60:2299-2301, 1988.
- 99** **Katz** JE, Mallick P, Agus DB. A perspective on protein profiling of blood. *BJU Int* 96:477-482, 2005.
- 100** **Kaubisch** S, Lum BL, Reese J, Freiha F, Torti FM. Stage T1 bladder cancer grade is the primary determinant of risk of muscle invasion. *J Urol* 146(1):28-31, 1991.
- 101** **Klose** J. Protein mapping by combined isoelectric focussing and alectrophoresis of mouse tissues. A novel approach to testing for induced point mutations in mammals. *Humangenetik* 26(3):231-243, 1975.
- 102** **Knowels** MA. Molecular changes in bladder carcinogenesis. *Histopathology* 41(Suppl. 2):403-409, 2002.

-
- 103 König F, McGovern FJ, Larne R, et al.** Diagnosis of bladder carcinoma using protoporphyrin IX fluorescence induced by 5-aminolaevulinic acid. *BJU Int* 83:129-135, 1999.
- 104 Konety BR.** Molecular markers of bladder cancer: a critical appraisal. *Urol Oncol* 24(4):326-337, 2006.
- 105 Krebs in Deutschland.** Häufigkeiten und Trends. Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. in Zusammenarbeit mit dem Robert Koch Institut. 5. überarbeitet, aktualisierte Ausgabe, Saarbrücken, 2006.
- 106 Krieg RC, Fogt F, Braunschweig T, Herrmann PC, Wollscheidt V, Wellmann A.** ProteinChip Array analysis of micordissected colorectal carcinoma and associated tumor stroma shows specific protein bands in the 3.4 to 3.6 kDa range. *Anticancer Res* 24(3):1791-1796, 2004.
- 107 Kriegmair M, Baumgartner R, Knuechel R, Stepp H, Hofstädter F, Hofstetter A.** Detection of early bladder cancer by 5-aminolevulinic acid induced porphyrin fluorescence. *J Urol* 155:105-110, 1996.
- 108 Kuwata H, Yip TT, Yip CL, Tomita M, Hutchens TW.** Bactericidal domain of lactoferrin: detection, quantitation and characterization of lactoferrin in serum by SELDI affinity mass spectrometry. *Biochem Biophys Res Commun* 245:764, 1998.
- 109 Langbein S, Lehmann J, Harder A, Steidler A, Michel MS, Alken P, Badawi JK.** Protein profiling of bladder cancer using the 2D-PAGE and SELDI-TOF-MS technique. *Technol Cancer Res Treat* 5(1):67-71, 2006.
- 110 Lee SW, Lee KI, Kim JY.** Revealing urologic diseases by proteomic techniques. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 815(1-2):203-213, 2005.
- 111 Lein M, Semjonow A, Graefen M et al.,** A multicenter clinical trial on the use of (-5,-7) pro prostate-specific antigen. *J Urol* 174(6):2150-2153, 2005.
- 112 Letocha H, Ahlstrom H, Malmstrom PU, Westlin JE, Fasth KJ, Nilsson S.** Positron emission tomography with L-methyl-11C-methionine in the monitoring of therapy response in muscle-invasive transitional cell carcinoma of the urinary bladder. *Br J Urol* 74:767-774, 1994.
- 113 Li J, White N, Zhang Z, Rosenzweig J, Mangold LA, Partin AW, Chan DW.** Detection of prostate cancer using serum proteomics pattern in a histologically confirmed population. *J Urol* 171:1782-1787, 2004.
- 114 Liotta LA, Kohn EC.** The microenvironment of the tumour-host interface. *Nature* 411:375-379, 2001.

-
- 115** Liu AY, Zhang H, Sorensen CM, Diamond DL. Analysis of prostate cancer by proteomics using tissue specimen. *J Urol* 173(1):73-78, 2005.
- 116** Lokeshwar VB, Selzer MG. Urinary bladder tumor markers. *Urol Oncol* 24(6):528-537, 2006.
- 117** Lokeshwar VB, Soloway MS. Current bladder tumor tests: does their projected utility fulfill clinical necessity? *J Urol* 165:1067-1077, 2001.
- 118** Lottspeich F, Engels JW. *Bioanalytik*. Elsevier GmbH München, 2. Auflage 2006.
- 119** Marvin LF, Roberts MA, Fay LB. Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry in clinical chemistry. *Clin Chem Acta*. 337(1-2):11-21, 2003.
- 120** McNeal JE, Redwine EA, Freiha FS, Stamey TA. Zonal distribution of prostatic adenocarcinoma. Correlation with histologic pattern and direction of spread. *Am J Surg Pathol* 12:897-906, 1988.
- 121** Melia J. Part1: The burden of prostate cancer, its natural history, information on the outcome of screening and estimates of ad hoc screening with particular reference to England and Wales. *BJU Int*. 95 Suppl 3:4-15, 2005.
- 122** Messing EM, Vaillancourt A. Hematuria screening for bladder cancer. *J Occup Med* 32:838-845, 1990.
- 123** Mhawech-Fauceglia P, Cheney RT, Schwaller J. Genetic alterations in urothelial bladder carcinoma. *Cancer* 106:1205-1216, 2006.
- 124** Mikolajczyk SD, Grauer LS, Millar LS, et al. A precursor form of PSA (pPSA) is a component of the free PSA in prostate cancer serum. *Urology*, 50(5):710-714, 1997.
- 125** Mischak H, Apweiler R, Baks RE, et al. Clinical proteomics: A need to define the field and to begin to set adequate standards. *Proteomics Clin Appl* 1(2):148-156, 2007.
- 126** Mitra AP, Datar RH, Cote RJ. Molecular staging of bladder cancer. *BJU Int* 96:7-12, 2005.
- 127** Mueller J, von Eggeling F, Driesch D, Schubert J, Melle C, Junker K. ProteinChip Technology reveals distinctive protein expression profiles in the urine of bladder cancer patients. *Eur Urol* 47:885-893, 2005.
- 128** Murphy L, Clynes M, Keenan J. Proteomic analysis to dissect mitoxantrome resistance-associated proteins in squamous lung carcinoma. *Anticancer Res* 27:1277-1285, 2007.

-
- 129 Nadler** RB, Humphrey PA, Smith DS, Catalona WJ, Ratliff TL. Effect of inflammation and benign prostatic hyperplasia on elevated serum prostate specific antigen levels. *J Urol.* 154(2 Pt 1):407-401, 1995.
- 130 Naya** Y, Fritsche HA, Bhadkamkar VA, Mikolajczyk SD, Rittenhouse HG, Babaian RJ. Evaluation of precursor prostate-specific antigen isoforms ratios in the
- 131 Negri** E, La Vecchia C. Epidemiology and prevention of bladder cancer. *Eur J Cancer Prev* 10(1):7-14, 2001.
- 132 Nelson** WG, De Marzo AM, Isaacs WB. Prostate cancer. *N Engl J Med* 349:366-381; 2003.
- 133 Nelson** WG, De Marzo AM, DeWeese TL. The molecular pathogenesis of prostate cancer: implications for prostate cancer prevention. *Urology* 57(4 Suppl 1):39-45, 2001.
- 134 Nishimori** T, Tomonaga T, Matsushita K, et al. Proteomic analysis of primary esophageal squamous cell carcinoma reveals downregulation of a cell adhesion protein, periplakin. *Proteomics* 6(3):1011-1018, 2006.
- 135 O'Farrel** PH. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J Biol Chem* 250, 4007-4021, 1975.
- 136 Oosterlinck** W, Lobel B, Jakse G, Malmström PU, Stöckle M, Sternberg C. Guidelines on bladder cancer. *Eur Urol* 41:105-112, 2002.
- 137 Ornstein** DK, Rayford W, Fusaro VA, et al. Serum proteomic profiling can discriminate prostate cancer from benign prostates in men with total prostate specific antigen level between 2.5 and 15.0 ng/ml. *J Urol* 172:1302-1305, 2004.
- 138 Ornstein** DK, Pruthi RS. Prostate specific antigen. *Expert Opin Pharmacother* 1:1399-1411, 2000.
- 139 Paik** ML, ScolieriMJ, Brown SL, Spirnak JP, Resnik MI. Limitations of computerized tomography in staging invasive bladder cancer before radical cystectomy. *J Urol* 163:1693-1696, 2000.
- 140 Pan** YZ, Xiao XY, Zhao, et al. Application of surface-enhanced laser desorption/ionization time-of-flight-based serum proteomic array technique for early diagnosis of prostate cancer.
- 141 Park** SY, Murphy SP, Wilkens LR, Henderson BE, Kolonel LN. Fat and meat intake and prostate cancer risk: the multiethnic cohort study. *Int J Cancer* 121(16):1339-1345, 2007.

-
- 142** **Parkin** DM, Whelan SL, Ferlay J, Teppo L, Thomas DB. Cancer incidence in five continents, Vol. III, IARC Scientific Publications No. 155, Lyon, IARC, 2003.
- 143** **Parkin** DM, Pisani P, Ferlay J. Estimates of the worldwide incidence of 25 major cancers in 1990. *Int J Cancer* 80:827-841, 1999.
- 144** **Peter** J, Unverzagt C, Hoesel W. Analysis of free prostate-specific antigen (PSA) after chemical release from the complex with alpha(1)-antichymotrypsin (PSA-ACT). *Clin Chem.* 46(4):474-482, 2000.
- 145** **Petricoin** EF, Ardekani AM, Hitt BA, Levine PJ, Fusaro VA, Steinberg SM, Mills GB, Simone C, Fishman DA, Kohn EC, Liotta LA. Use of proteomic patterns in serum to identify ovarian cancer. *Lancet.* 16; 359(9306):572-577, 2002.
- 146** **Pisitkun** T, Johnstone R, Knepper MA. Discovery of urinary biomarkers. *Mol Cell Proteomics* 5:1760-1771, 2006.
- 147** **Placer** J, Espinet B, Salido M, Solé F, Gelabert-Mas A. Clinical utility of a multiprobe FISH assay in voided urine specimens for the detection of bladder cancer and its recurrences, compared with urinary cytology. *Eur Urol* 42:547-552, 2002.
- 148** **Polascik** TJ, Oesterling JE, Partin AW. Prostate specific antigen: a decade of discovery – what have we learned and where are we going? *J Urol.* 162:293-306, 1999.
- 149** **Prout** GR Jr. Historical and modern role of cystoscopy and bladder mucosal biopsy in detecting bladder cancer in a high-risk population. *J Occup Med* 32(9):834-827, 1990.
- 150** **Prout** GR Jr, Griffin PP, Shipley WU. Bladder carcinoma as a systemic disease. *Cancer* 43:2532-2539, 1979.
- 151** **Prout** G, Marshall VF. The prognosis with untreated bladder tumors. *Cancer* 9:551-558, 1956.
- 152** **Qu** Y, Adam BL, Yasui Y, et al. Boosted decision tree analysis of surface-enhanced laser desorption/ ionization mass spectral serum profiles discriminate prostate cancer from noncancer patients. *Clin Chem* 48:1835-1843, 2002.
- 153** **Rai** AJ, Gelfand CA, Haywood BC, et al. HUPO Plasma Proteome Project specimen collection and handling: Towards the standardization of parameters for plasma proteome samples. *Proteomics* 5:3262-3277, 2005.
- 154** **Raitanen** M, Aine R, Rintala E, et al. Differences between local and review urinary cytology in diagnosis of bladder cancer. An interobserver multicenter analysis. *Eur Urol* 41:284-289, 2002.

-
- 155 Rehn L.** Blasengeschwülste bei Fuchsin-Arbeitern. Arch Klein Chir 50:588, 1895.
- 156 Reynolds MA,** Kastury K, Groskopf J, Schalken JA, Rittenhouse H. Molecular markers for prostate cancer. Cancer Lett 249(1):5-13, 2007.
- 157 Roddam AW,** Duffy MJ, Hamdy FC, et al. Use of prostate-specific antigen (PSA) isoforms for the detection of prostate cancer in men with a PSA level of 2-10 ng/ml: systematic review and meta-analysis. Eur Urol. 48(3):386-399, 2005.
- 158 Sánchez-Carbayo M,** Cordon-Cardó C. Molecular alterations associated with bladder cancer progression. Semin Oncol 34:75-84, 2007.
- 159 Sarosdy MF,** Schellhammer P, Bokinsky G, et al. Clinical evaluation of a multi-target fluorescent in situ hybridization assay for detection of bladder cancer. J Urol 168:1950-1954, 2002.
- 160 Sass-Kortsak AM,** Purdham JT, Kreiger N, Darlington G, Lightfoot NE. Occupational risk factors for prostate cancer. Am J Ind Med 50:568-576, 2007.
- 161 Schelhase T,** Rübenach SP, et al. Die Todesursachenstatistik – Methodik und Ergebnisse 2004. Statistisches Bundesamt, Wirtschaft und Statistik 6:614-629, 2006.
- 162 Schneeweiss S,** Kriegmair M, Stepp H. Is everything all right if nothing seems wrong? A simple method of assessing the diagnostic value of endoscopic procedures when a gold standard is absent. J Urol 161:1116-1119, 1999.
- 163 Schwamborn K,** Krieg RC, Jirak P, Ott G, Knüchel R, Rosenwald A, Wellmann A. MALDI imaging for the diagnosis of classical Hodgkin lymphoma. Blood, in submission.
- 164 Schwamborn K,** Krieg RC, Reska R, Jakse G, Knuechel R, Wellmann A. Identifying prostate carcinoma by MALDI-Imaging. Int J Mol Med 20(2):155-159, 2007.
- 165 Scott R Jr,** Mutchnik DL, Laskowski TZ, Schmalhorst WR. Carcinoma of the prostate in elderly men: incidence, growth characteristics, and clinical significance. J Urol 101:602-607, 1969.
- 166 Shapiro AL,** Vinuela E, Maizel JV Jr. Molecular weight estimation of polypeptide chains by electrophoresis in SDS-polyacrylamide gels. Biochem Biophys Res Commun 28(5):815-820, 1967.
- 167 Shelley MD,** Kynaston H, Court J, Wilt TJ, Coles B, Burgon K, Mason MD. A systemic review of intravesical bacillus Calmette-Guerin plus transurethral resection alone in Ta and T1 bladder cancer. BJU Int 88:209-216, 2001.

-
- 168 Shen J**, Person MD, Zhu J, Abbruzzese JL, Li D. Protein expression profiles in pancreatic adenocarcinoma compared with normal pancreatic tissue and tissue affected by pancreatitis as detected by two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry. *Cancer Res* 64:9018-9026, 2004.
- 169 Shibata A**, Whittemore AS. Genetic predisposition of prostate cancer: possible explanations for ethnic differences in risk. *Prostate* 32:65-72, 1997.
- 170 Sohn M**, Neuerburg J, Teufl F, Bohndorf K. Gadolinium-enhanced magnetic resonance imaging in the staging of urinary bladder neoplasms. *Urol Int* 45:142-147, 1990.
- 171 Srinivas PR**, Srivastava S, Hanash S, Wright GL Jr. Proteomica in early detection of cancer. *Clin Chem* 47(10):1901-11, 2001.
- 172 Stamey TA**, Caldwell M, McNeal JE, Nolley R, Hemenez M, Downs J. The prostate specific antigen era in the United States is over for prostate cancer: what happened in the last 20 years? *J Urol*. 172(4 Pt 1):1297-1301, 2004.
- 173 Statistisches Bundesamt**. Pressemitteilung Nr. 336 vom 27.08.2007
- 174 Stein JP**, Lieskovsky G, Cote R, et al. Radical cystectomy in the treatment of invasive bladder cancer: long-term results in 1,054 patients. *J Clin Oncol* 19(3):666-675, 2001.
- 175 Steinberg GD**, Carter BS, Beaty TH, Childs B, Walsh PC. Family history and the risk of prostate cancer. *Prostate* 17:337-347, 1990.
- 176 Stenman UH**, Leinonen J, Zhang WM, Finne P. Prostate specific antigen. *Semin Cancer Biol*, 9(2):83-93, 1999.
- 177 Stewart BW** and Kleihues P. *World Cancer Report*. IARC Press Lyon. 2003.
- 178 Svatek RS**, Herman MP, Lotan Y, et al. Soluble Fas – A promising novel urinary marker for the detection of recurrent superficial bladder cancer. *Cancer* 106:1701-1707, 2006.
- 179 Tanaka K**, Ido Y, Akita S, Yoshida Y, Yoshida T. Presented at the Second Japan-China Joint Symposium on Mass Spectrometry (abstract), Takarazuka Hotel, Osaka, Japan; Sept 15-18, 1987.
- 180 Tiselius A**. Electrophoresis on serum globulin. I. *Biochem J* 31(2):313-317, 1937.
- 181 Tomonaga T**, Matsushita K, Yamaguchi S, et al. Identification of altered protein expression and post-translational modifications in primary colorectal cancer by using agarose two-dimensional gel electrophoresis. *Clin Cancer Res* 10(6):2007-2014, 2004.

-
- 182 U.S. Cancer Statistics Working Group.** United States Cancer Statistics: 2003 Incidence and Mortality. Atlanta: U.S. Department of Health and Human Services, Centers for Disease Control and Prevention and National Cancer Institute, 2006.
- 183 Van der Merwe DE, Oikonomopoulou K, Marshall J, Diamandis EP.** Mass spectrometry: uncovering the cancer proteome for diagnostics. *Adv Cancer Res* 96:23-50, 2007.
- 184 Van Le TS, Miller R, Barder T, et al.** Highly specific urine-based marker of bladder cancer. *Urology* 66:1256-1260, 2005.
- 185 Van Rhijn BWG, van der Poel HG, van der Kwast TH.** Urine markers for bladder cancer surveillance: a systematic review. *Eur Urol* 47:736-748, 2005.
- 186 Varkarakis MJ, Gaeta J, Moore RH, Murphy GP.** Superficial bladder tumor: aspects of clinical progression. *Urology* 4:414-420, 1974.
- 187 Vesterberg O, Svensson H.** Isoelectric fractionation, analysis, and characterization of ampholytes in natural pH gradients. IV. Further studies on the resolving power in connection with separation of myoglobins. *Acta Chem Scand* 20(3):820-834, 1966.
- 188 Vieweg J, Gschwend JE, Herr HW, Fair WR.** Pelvic lymph node dissection can be curative in patients with node positive bladder cancer. *J Urol* 161:449-454, 1999.
- 189 Villanueva J, Shaffer DR, Phillip J, et al.** Differential exoprotease activities confer tumor-specific serum peptidome patterns. *J Clin Invest* 116:271-284, 2006.
- 190 Vineis P, Esteve J, Hartge P, Hoover R, Silverman DT, Terracini B.** Effects of timing and type of tobacco in cigarette-induced bladder cancer. *Cancer Res* 48:3849-3852, 1998.
- 191 Vlahou A, Schellhammer PF, Mendrinos S, et al.** Development of a novel proteomic approach for the detection of transitional cell carcinoma of the bladder in urine. *Am J Pathol* 158(4): 1491-1502, 2001.
- 192 Vom Dorp F, Kausch K, Jocham D.** Diagnostik und Therapie des nichtinvasiven Harnblasenkazinoms. *Dtsch Arztebl* 104(12):A797-802, 2007.
- 193 Von Eschenbach AC.** The biologic dilemma of early carcinoma of the prostate. *Cancer* 78(2):326-329, 1996.
- 194 Vorderwülbecke S, Cleverley S, Weinberger SR, Wiesner A.** Protein quantification by the SELDI-TOF-MS-based ProteinChip® System. *Nat Methods* 2(5):393-395, 2005.
- 195 Ward AM, Catto JWF, Hamdy FC.** Prostate specific antigen: biology, biochemistry and available commercial assays. *Ann Clin Biochem* 38:633-651, 2001.

-
- 196** **Wellmann A**, Wollscheid V, Lu H, et al. Analysis of microdissected prostate tissue with ProteinChip® arrays – a way to new insights into the carcinogenesis and to diagnostic tools. In *J Mol Med* 9:341-347, 2002.
- 197** **Wilkins MR**, Williams KL, Appel RD, Hochstrasser DF. *Proteome Research: New Frontiers in Functional Genomics*. Springer Berlin Heidelberg New York, 1997.
- 198** **Witjes JA**. Bladder carcinoma in situ in 2003: State of the art. *Eur Urol* 45:142-146, 2004.
- 199** **Wittekind C**, Meyer HJ, Bootz F. *TNM Klassifikation maligner Tumoren*. 6. Auflage, Springer- Verlag Berlin Heidelberg New York, 2002.
- 200** **Wright GL Jr**, Cazares LH, Leung SM, et al. Proteinchip® surface enhanced laser desorption/ionization (SELDI) mass spectrometry: a novel protein biochip technology for detection of prostate cancer biomarkers in complex protein mixtures. *Prostate Cancer Prostatic Dis* 2(5/6):264-276, 1999.
- 201** **Wu XR**. Urothelial tumorigenesis: a tale of divergent pathways. *Nat Rev Cancer* 5:713-725, 2005.
- 202** **Wu JT**, Zhang P, Wang T, Wilson L, Astill M. Evaluation of free PSA isoforms, PSA complex formation, and specificity of anti-PSA antibodies by HPLC and PAGE-immunoblotting techniques. *J Clin Lab Anal*, 9(1):1-14, 1995.
- 203** **Wulfschle JD**, Paweletz CP, Steeg PS, Petricoin EF 3rd, Liotta L. Proteomic approaches to the diagnosis, treatment, and monitoring of cancer. *Adv Exp Med Biol* 532:59-68, 2003.
- 204** **Yanagisawa K**, Shyr Y, Xu BJ, et al. Proteomic pattern of tumor subsets in non-small-cell lung cancer. *Lancet* 362:433-439, 2003.
- 205** **Zaak D**, Kriegmair M, Steep H, et al. Endoscopic detection of transitional cell carcinoma with 5-aminolevulinic acid: results of 1012 fluorescence endoscopies. *Urology* 57:690-694, 2001.
- 206** **Zaak D**, Hungerhuber E, Schneede P, et al. Role of 5-aminolevulinic acid in the detection of urothelial premalignant lesions. *Cancer* 95(6):1234-1238, 2002.
- 207** **Zheng Y**, Xu Y, Ye B, et al. Prostate carcinoma tissue proteomics for biomarker discovery. *Cancer* 98(12):2576-2582, 2003.

7 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die mich bei der Durchführung und Erstellung dieser Arbeit unterstützt haben.

Mein besonderer Dank gilt Frau Prof. Knüchel-Clarke für die interessante Themenstellung, die gute Betreuung, die Möglichkeit der Durchführung dieser Arbeit, ihre Ermutigungen, ihr Interesse am Fortgang sowie für das in mich gesetzte Vertrauen.

Herrn Prof. Jakse möchte ich für seine Betreuung und Unterstützung vor allem in urologischen Fragestellungen und seine Bemühungen um die gemeinsame Tumorbank danken.

Herrn Prof. Bernhagen gilt mein Dank für die Übernahme der Betreuung dieser Arbeit und für seine Unterstützung.

Mein Dank gilt auch in ganz besonderer Form Herrn Dr. rer. nat. Krieg für die hervorragende Zusammenarbeit und Einweisung in die Grundlagen und Methodik der Proteomics, die vielen Ratschläge und das stets offene Ohr für alle Probleme.

Bei Frau P. Jirak, N. Reulen und S. Uhlig bedanke ich mich für ihre Unterstützung in so vieler Hinsicht, ihre Geduld und die tolle Arbeitsatmosphäre.

Allen Doktoranden und Diplomanden der Proteomics Core Facility, insbesondere Frau Krapohl, Frau Schaumann, Herrn Breil und Herrn Reska, gilt mein Dank für die Unterstützung und die gute Zusammenarbeit.

Allen Mitarbeitern des Instituts für Pathologie möchte ich für die Unterstützung danken.

Mein Dank gilt den Mitarbeitern der Urologischen Klinik, allen voran Herrn Dr. Grosse, für das unermüdliche Engagement für die Tumorbank.

Zu Dank verpflichtet bin ich auch dem Institut für Klinische Chemie und Pathobiochemie sowie der Blutbank bzw. Transfusionsmedizin für die Bereitstellung der Blutproben und die Angaben zu den Spendern.

Im Besonderen gilt mein Dank meiner Mutter, meiner Schwester und meinen Freunden, die mich in jeder Phase der Promotion ermutigt haben und immer mit Rat und Tat zur Seite standen.

8 Abkürzungsverzeichnis

2D-SDS-PAGE	zweidimensionale Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
5-ALA	5-Aminolävulinsäure
ACN	Acetonitril
APS	Ammoniumpersulfat
BCA	bicinchonic acid
BCG	Bacillus Calmette-Guérin
Bcl-2	B-cell leukemia-/ lymphoma-2
BM	Basalmembran
BPH	benigne Prostatahyperplasie
BTA	bladder tumor antigen
CHCA	4-Hydroxy-3,5-dimethoxycinnamic acid
Cis	Carcinoma in situ
CK	Cytokeratin
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DRE	digital-rektale Untersuchung
EAM	energy absorbing molecule
ELAC2	elaC homolog 2 (E. coli)
ELISA	enzyme linked immuno sorbent assay
Fas	fibroblast associated
FFPE	formalin-fixiert und paraffin-eingebettet
FGFR3	fibroblast growth factor receptor 3
FISH	Fluoreszenz in-situ Hybridisierung
FKS	fötales Kälberserum
GA	genetischer Algorithmus
GSTP1	Glutathion-S-Transferase P1
HB-Ca	Harnblasenkarzinom
H&E	Hämatoxylin und Eosin
hK	humanes Kallikrein
HPLC	high performance liquid chromatography
IEF	isoelektrische Fokussierung
IMS	imaging mass spectrometry
IP	Isoelektrischer Punkt
IPG	immobilisierte pH-Gradienten
LCM	lasergestützte Mikrodisektion
LPC	laser pressure catapulting
MALDI	matrix-assisted laser desorption ionization
MBS	magnetic bead seperator
MS	Massenspektrometrie

MSI	Mikrosatelliteninstabilität
MSR1	macrophage-scavenger receptor 1
m/z	Masse-zu-Ladungsverhältnis
NKX3.1	NK3 homeobox 1
NMP22	nuclear matrix protein 22
OCT	optimal cutting temperature / Tissue Tek®
p16 (CDKN2)	Inhibitor der cyclin-dependent protein kinase
PCa	Prostatakarzinom
PCR	Polymersasekettenreaktion
PDA	Piperazin Diacrylamid
PIA	proliferative inflammatorische Atrophie
PPIX	Protoporphyrin IX
PSA	Prostata-spezifisches Antigen
PSAD	PSA-Density
PSAV	PSA-Velocity
PTEN	phosphatase and tensin homologue
QC	Quick classifier
RAF1	Ras-activated factor
RAS	Rat sarcoma
RB	Retinoblastom-Protein
RNA	Ribonukleinsäure
RNASEL	ribonuclease L (2',5'-oligoisoadenylate synthetase-dependent)
ROI	region of interest
RPMI	Standard-Kulturmedium (vom Roswell Parle Memorial Institute entwickelt)
RT	reverse Transkriptase
SA	sinapic acid
SDS	Natriumdodecylsulfat (sodium dodecylsulfate)
SELDI	surface enhanced laser desorption ionization
sFas	soluble Fas
SPA	Sinapinsäure, sinapinic acid
SVM	support vector machine
TCA	Trichloracid
TFA	Trifluoressigsäure
TLC	thin layer chromatography
TOF	time of flight
TPS	tissue polypeptide specific antigen
TRUS	transrektaler Ultraschall
TUR-B	transurethrale Resektion der Harnblase
UBC	urinary bladder cancer antigen
UKA	Universitätsklinikum Aachen

9 Publikationen

Veröffentlichungen:

Krieg RC, Dong Y, **Schwamborn** K, Knüchel R. Protein quantification and its tolerance for different reagents using the BCA-method with regards to SDS PAGE. J Biochem Biophys Methods 65(1):13-19, 2005

Mühlfeld AS, Ketteler M, **Schwamborn** K, Eitner F, Schneider B, Gladziwa U, Knuechel R, Floege J. Sticky platelet syndrome: an underrecognized cause of graft dysfunction and thromboembolic complications in renal transplant recipients. Am J Transplant 7(7):1865-1868, 2007

Schwamborn K, Krieg RC, Reska R, Jakse G, Knuechel R, Wellmann A. Identifying prostate carcinoma by MALDI-Imaging. Int J Mol Med 20(2):155-159, 2007.

Schwamborn K, Krieg RC, Jirak P, Ott G, Knüchel R, Rosenwald A, Wellmann A. MALDI imaging for the diagnosis of classical Hodgkin lymphoma. Blood, in submission.

3 Patentanmeldungen

10 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Kristina Schwamborn
 Anschrift: Turpinstr. 17
 52066 Aachen
 Telefon: 0241 - 9008965
 E-Mail: kschwamborn@ukaachen.de
 Geburtsdatum /-ort: 09.05.1976 in Wuppertal

Familienstand: ledig

Schulbildung:

08/1982 – 07/1986 Katholische Grundschule Südstraße in Schwelm
 08/1986 – 07/1995 Märkisches Gymnasium Schwelm, Abschluss: Abitur

Hochschulbildung:

10/1995 – 11/2002 Studium der Humanmedizin an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
 08/1997 Ärztliche Vorprüfung
 08/1998 Erster Abschnitt der ärztlichen Prüfung
 08/2001 Zweiter Abschnitt der ärztlichen Prüfung
 10/2001 – 05/2002 Praktisches Jahr: Klinikum Wuppertal Barmen
 Fächer: Innere Medizin, Radiologie
 05/2002 – 08/2002 Praktisches Jahr: Pretoria Academic Hospital, Pretoria, Südafrika, Fach: Chirurgie
 11/2002 Dritter Abschnitt der ärztlichen Prüfung

Berufsausbildung:

05/2003 – 05/2004 Ärztin im Praktikum am Institut für Pathologie des Universitätsklinikum Aachen
 05/2004 – 10/2004 Ärztin im Praktikum in der Urologischen Klinik des Universitätsklinikum Aachen
 10/2005 – 04/2005 Assistenzärztin in der Urologischen Klinik des Universitätsklinikum Aachen
 05/2005 – 04/2006 Rotationsstelle am Institut für Pathologie des Universitätsklinikum Aachen
 Seit 05/2006 Assistenzärztin am Institut für Pathologie des Universitätsklinikum Aachen

Famulaturen:

02/1998 – 03/1998 Allgemeinmedizinische Praxis in Sprockhövel
 02/1999 – 03/1999 Institut für Mikrobiologie und Virologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
 07/2000 – 08/2000 Klinik für Neurochirurgie des Krankenhaus Bethesda, Wuppertal
 09/2000 – 10/2000 Klinik für Anästhesie und Allgemeine Intensivmedizin des Allgemeinen Krankenhaus Wien

Zusätzliche Ausbildung :

10/1996 – 02/1997 Kursus der Computertomographie an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
10/1998 – 02/1999 Grundkurs Sonographie an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
04/2000 – 07/2000 Tropenmedizinischer Kurs an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Doktorarbeit:

Institut für Mikrobiologie und Virologie (Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf), Thema: Vertikale Übertragung des Humanen Herpes-Virus Typ 8

Sonstige Kenntnisse:

Sprachen Sprachkurse im Ausland (Großbritannien, Malta)

Aachen, den 29.02.2008