

Frei zirkulierende DNA als diagnostischer Marker beim Harnblasenkarzinom

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

Monika Kogej

aus Troisdorf

2015

Angefertigt mit der Genehmigung
der Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: PD Dr. med. Jörg Ellinger
2. Gutachter: Prof. Dr. med. Christof Burger

Tag der Mündlichen Prüfung: 19.03.2015

Aus der Klinik und Poliklinik für Urologie und Kinderurologie
Direktor: Prof. Dr. med. Dr. h.c. Stefan C. Müller

Für meine Eltern

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	7
1. Einleitung	9
1.1 Harnblasenkarzinom.....	9
1.1.1 Anatomie und Histologie der Harnblase	9
1.1.2 Histopathologische Aspekte und Klassifikationen.....	10
1.1.3 Epidemiologie	13
1.1.4 Risikofaktoren.....	14
1.1.5 Symptome und Diagnostik.....	14
1.1.6 Prognostische Einflüsse	15
1.1.7 Therapie und Nachsorge	16
1.2 Frei zirkulierende DNA im Blut.....	17
1.3 DNA-Hypermethylierung.....	19
1.3.1 DNA-Hypermethylierung bei malignen Erkrankungen	20
1.4 Promotorhypermethylierung beim Harnblasenkarzinom	22
1.5 Zielsetzung	25
2. Material und Methoden.....	27
2.1 Materialien	27
2.1.1 Geräte	27
2.1.2 Labormaterialien	28
2.1.3 Chemikalien.....	28
2.1.4 Kits	29
2.1.5 Enzyme.....	30
2.1.6 Primer	30
2.1.7 Software	32
2.1.8 Probenmaterial	32
2.2 Methoden.....	35
2.2.1 Aufreinigung und Isolierung der DNA	35
2.2.2 Kontrollproben	36
2.2.3 Behandlung mit Restriktionsenzymen	37

2.2.4	Primerdesign	39
2.2.5	Quantitative Polymerase-Kettenreaktion	41
2.2.6	Gelelektrophorese	48
2.2.7	Quantifizierung der zellfreien DNA und ihre Methylierung	49
2.2.8	Statistische Auswertung	50
3.	Ergebnisse	51
3.1	Zellfreie DNA Konzentration und DNA-Integrität.....	51
3.2	DNA-Methylierung	55
3.3	Diagnostische Aussagekraft	59
3.3.1	ROC-Analysen für kleine und große Fragmente sowie DNA-Integrität.....	59
3.3.2	ROC-Analysen der Methylierungslevel aller untersuchten Gene.....	63
3.3.3	Korrelation der frei zirkulierenden DNA-Menge mit klinisch-pathologischen Parametern.....	66
3.3.4	Korrelation der Methylierungslevel mit klinisch-pathologischen Parametern	67
4.	Diskussion	68
4.1	Ursprung der zellfreien DNA im Serum	69
4.2	Diagnostische Bedeutung der zellfreien DNA im Serum	70
4.3	Prognostische Bedeutung der zellfreien DNA im Serum	72
4.4	Limitationen	72
5.	Zusammenfassung.....	74
6.	Anhang	76
7.	Tabellenverzeichnis	77
8.	Abbildungsverzeichnis	78
9.	Literaturverzeichnis	79
10.	Danksagung	90

Abkürzungsverzeichnis

ACTB	Actin beta
AJCC	American Joint Committee on Cancer
APC	Adenomatosis polyposis coli
AUC	Area under the curve
BCA	Blasenkarzinom
BCG	Bacillus Calmette-Guerin
bp	Basenpaare
BPH	Benigne Prostata Hyperplasie
CT	Computertomographie
CT-Wert	Cycle Threshold-Wert
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNMT	DNA-Methyltransferasen
EAU	European Association of Urology
EDTA	Ethylendinitrilotetraacetat
GSTP1	Glutathion-S-Transferase Protein 1
Hb	Hämoglobin
MIBC	Muscle invasive bladder cancer
MRT	Magnetresonanz-Tomographie
M.Sssl	CpG-Methyltransferase
NMIBC	Non muscle invasive bladder cancer
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PTGS2	Prostaglandin Endoperoxid Synthase 2
qPCR	Quantitative Polymerase-Kettenreaktion
RAR- β	Retinoid Acid Receptor β
RAS	Rat Sarcoma

RASSF1	RAS-association domain family 1
ROC	Receiver Operator Curve
RT-PCR	Real-Time Polymerase-Kettenreaktion
SSSI-DNA	Mit M.Sssl behandelte DNA
TBE-Puffer	TRIS-Borat-EDTA-Puffer
TIG-1	Tazarotene-induced gene 1
TIMP-3	Tissue inhibitor of metalloproteinase
TUR-B	Transurethrale Resektion der Blase
UICC	Union internationale contre le cancer
WHO	World Health Organization
95%-KI	95%-Konfidenzintervall

1. Einleitung

1.1 Harnblasenkarzinom

1.1.1 Anatomie und Histologie der Harnblase

Die menschliche Harnblase (*Vesica urinaria*) ist ein glattmuskuläres Hohlorgan, das beim Erwachsenen hinter der Symphyse dem Beckenboden aufliegt. Die Harnblase ist subperitoneal, wird jedoch an ihrer Oberseite von der beweglichen vorderen Umschlagfalte des Bauchfells (*Peritoneum parietale*) überzogen. Sie sammelt den durch die Nieren gebildeten Harn, der durch die beiden Harnleiter schubweise in die Harnblase einfließt, bevor er dann über die Harnröhre ausgeschieden wird. Die Größe der Harnblase ist abhängig vom Füllungszustand, wobei bei circa 350 ml Blaseninhalt Harndrang entsteht. Willkürlich ist es jedoch möglich, die doppelte Menge zurück zu halten.

Das Dach der Harnblase wird vom Blasenkörper (*Corpus vesicae*) gebildet und der Blasengrund (*Fundus vesicae*) ist gegen den Beckenboden gerichtet. An der Hinterwand des Blasengrundes münden die beiden Harnleiter, deren Einmündungsstellen zusammen mit dem Abgang der Harnröhre das sogenannte Blasendreieck (*Trigonum vesicae*) bilden. Im Bereich des Trigonums ist die Schleimhautoberfläche glatt, während sie im Bereich des Korpus abhängig vom Grad des Füllungszustandes mehr oder weniger stark gefaltet ist (Frick et al., 1992).

Das komplette harnableitende System wird von dem Urothel ausgekleidet, welches die innerste Schicht der Blasenwand bildet. Es steht in direktem Kontakt mit den Bestandteilen des Urins. Das Urothel ist ein mehrschichtiges Epithel, das aus zwei bis sechs Zelllagen besteht, wobei alle Zellen an der Basallamina verankert sind. Die oberste Zellreihe besteht aus großen, oft zweikernigen Deckzellen (*Umbrella cells*), von denen sich jede schirmartig über mehrere Zellen der tieferen Reihen legt, während die basalen und mittleren Zellen (*Basal- und Intermediärzellen*) sich platt bis kubisch darstellen. Eine weitere wichtige Komponente der Blasenwand ist der *Musculus detrusor vesicae*, der sich aus mehreren, parasymphatisch innervierten Schichten glatter Muskulatur zusammensetzt und für die Kontraktion der Blase während des Wasserlassens verantwortlich ist (Stevens und Lowe, 1997).

1.1.2 Histopathologische Aspekte und Klassifikationen

Rund 90% der malignen Tumoren der ableitenden Harnwege zeigen den histologischen Phänotyp eines Urothelkarzinoms, die anderen 10% bilden Plattenepithelkarzinome und selten auch Adenokarzinome. Die Harnblase ist dabei die häufigste Lokalisation. Typisch für das Urothelkarzinom ist das synchrone Auftreten von mehreren Tumoren in der Harnblase (Böcker et al., 2004).

Im Staging wird nicht nur die Ausdehnung des Primärtumors, sondern auch die Existenz von Lymphknoten- oder Fernmetastasen laut der offiziellen TNM-Klassifikation der Union Internationale Contre le Cancer (UICC) mit einbezogen (Tab. 1).

Tab. 1: TNM-Klassifikation des Harnblasenkarzinoms (UICC/AJCC, 2002)

TNM-Klassifikation der Harnblasenkarzinome nach WHO 2004		
Primärtumor		
Ta	Nichtinvasives papilläres Urothelkarzinom	
Tis	Carcinoma in situ	
T1	Infiltration der Lamina propria	T1a: oberhalb der Muscularis mucosae
		T1b: innerhalb/unterhalb der Muscularis mucosae; nicht etabliert
T2	Infiltration der Muscularis propria	T2a: innere Hälfte
		T2b: äußere Hälfte
T3	Infiltration des perivesikalen Fettgewebes	T3a: mikroskopisch erkennbar
		T3b: makroskopisch erkennbar
T4	Infiltration anderer Organe	T4a: Prostata, Uterus oder Vagina
		T4b: Becken- oder Bauchwand
Regionäre Lymphknoten		
N1	Befall eines Lymphknotens, maximal 2 cm durchmessend	
N2	Befall eines Lymphknotens, 2,1 bis maximal 5 cm durchmessend oder multiple Lymphknotenmetastasen ≤ 5 cm	
N3	Lymphknotenmetastase ≥ 5 cm	
Fernmetastasen		
Mx	Fernmetastasen können nicht beurteilt werden	
M0	Kein Anhalt für das Vorhandensein von Fernmetastasen	
M1	Fernmetastasen vorhanden	
Residualtumor		
Rx	Tumorreste können nicht beurteilt werden	
R0	Keine Tumorreste erkennbar nach Operation	
R1	nur mikroskopisch erkennbare Tumorreste nach Operation	
R2	auch makroskopisch erkennbare Tumorreste nach Operation, Metastasen	

Etwa 70-80 % der Harnblasenkarzinome gehören zu den genetisch stabilen, meist nicht invasiven, gut differenzierten Urothelkarzinomen, die restlichen 20-30 % sind den schlecht differenzierten, instabilen und meist muskelinvasiv wachsenden Urothelkarzinomen zugehörig. Häufig ist der erste Schritt aller Urothelläsionen eine Deletion von Chromosom 9 bei papillären Tumoren, während früh eine Mutation des Chromosoms 17 (p53-Mutation) bei den flachen Urothelneoplasien auftritt. Es können weitere Chromosomenaberrationen für die Entwicklung invasiven Verhaltens verantwortlich gemacht werden (Lindemann-Docter et al., 2008).

Nach den aktuellen Guidelines der European Association of Urology werden Blasenkarzinome in die von der WHO im Jahre 2004 neu eingeteilten Stadien unterteilt:

1. Low-grade papillary urothelial carcinoma (LGPUC)
2. High-grade papillary urothelial carcinoma (HGPUC)

Diese Klassifikation unterscheidet nur noch zwischen zwei großen Gruppen, den low und den high grade Karzinomen. Die nicht invasive papilläre urotheliale Neoplasie niedriger maligner Potenz (PUNLMP) wird zu einer Untergruppe gezählt, die als gutartig betrachtet wird und nicht mehr zu den Karzinomen zählt (Lindemann-Docter et al., 2008)

Das 3-stufige Gradingssystem ist 2004 von der WHO durch ein 2-stufiges ersetzt worden, jedoch ist eine genaue 1:1-Übersetzung der Gradingssysteme nicht durchführbar. Zu der Low-grade-Gruppe gehören nun die früheren G1-Stadien sowie einen Teil der G2-Stadien, folglich ist der andere Teil der G2-Tumore sowie die früheren G3-Tumore der High-grade-Gruppe zuzuordnen. Schon ein kleines Tumoreal mit hochgradig atypischen Zellen bzw. geringe stark pleomorphe Tumorzellen reichen zur Einordnung in die High-grade-Gruppe aus (Lindemann-Docter et al., 2008). Da das neue WHO Grading noch nicht ausreichend validiert ist, wird eine gleichzeitige Verwendung von neuer und alter Klassifikation empfohlen (Abb. 1). In der aktuellen Studie wurde nur das alte WHO Grading verwendet, da nur dieses von allen Pathologen angegeben worden war.

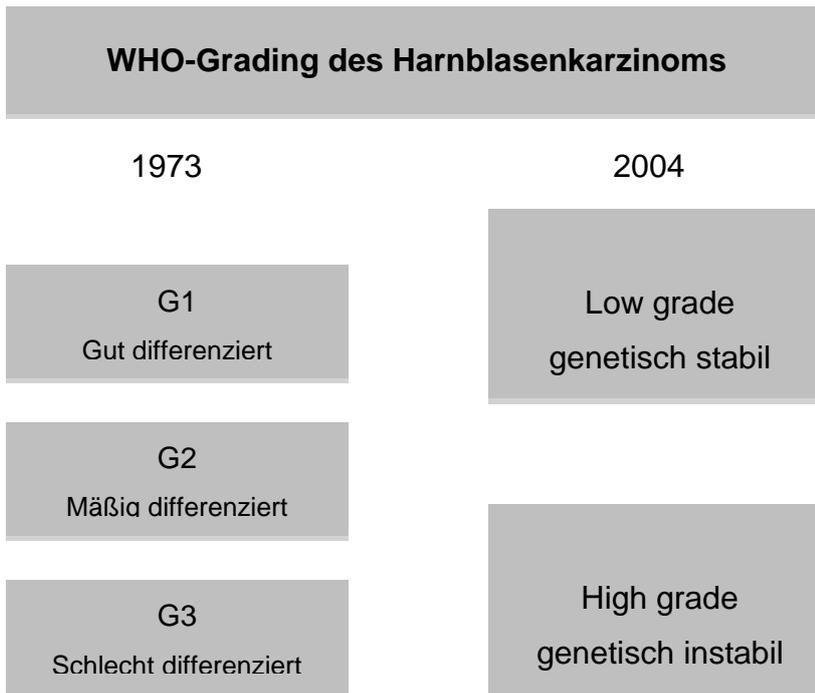


Abb. 1: Grading des Harnblasenkarzinoms

1.1.3 Epidemiologie

Dem Robert-Koch-Institut zufolge erkrankten in Deutschland im Jahre 2006 etwa 27.450 Menschen an einer malignen Erkrankung der Harnblase. Das sind im Vergleich zum Jahre 2002 1.500 Erkrankungsfälle mehr. Im Jahre 2006 waren mehr als zwei Drittel der Erkrankten Männer (Inzidenz: 19.360 Männer und 8.090 Frauen). Die Mortalität betrug für das Jahr 2006 5.442 Sterbefälle mit 3.549 männlichen und 1.893 weiblichen Patienten. Im Vergleich zum Jahre 2002 mit 5451 Fällen ist die Sterberate jedoch leicht rückläufig. Für Männer liegt das mittlere Erkrankungsalter bei 70 Jahren und für Frauen bei 73 Jahren (Bertz et al., 2006).

Im Jahre 2002 fanden sich weltweit 357.000 Neuerkrankungen sowie 145.000 Sterbefälle. Auch weltweit zeigt sich die Erkrankungsrate unter männlichen Patienten um das Drei- bis Vierfache größer als bei den weiblichen Patienten (Parkin et al., 2005). Das Harnblasenkarzinom ist in der westlichen Welt der vierthäufigste maligne Tumor unter Männern sowie das achthäufigste Karzinom unter Frauen (Kirkali et al., 2005).

1.1.4 Risikofaktoren

Der häufigste und wesentlichste Risikofaktor für das Harnblasenkarzinom ist der Tabakkonsum. Nicht nur der aktive Konsum, sondern auch das Passivrauchen steigert das Karzinomrisiko. Der aktive Tabakkonsum ist ursächlich für etwa 50% der Blasenkarzinome bei Männern und Frauen. Der hohe Anteil bei Männern ist schon länger bekannt, jedoch hatten frühere Untersuchungen bei Frauen das attributable Risiko nur bei 20 bis 30 Prozent vermutet. Der prozentuale Anstieg könnte dabei durch die höhere Rate von aktiven und ehemaligen Raucherinnen erklärt werden (Freedman et al., 2011). Außerdem spielt die biochemische Metabolisierung der Karzinogene im Tabakrauch eine wesentliche Rolle. Denn Studien zeigen, dass das Verhältnis von Zigarettenrauchen und dem Blasenkarzinomrisiko bei Schnell-Azetylierern niedriger ist als bei Langsam-Azetylierern (Marcus et al., 2000)

Ein weiterer Risikofaktor kommt aus der chemischen Industrie in Form von aromatischen Aminen, insbesondere das β -Naphthylamin und Benzidin. Obwohl man einen Großteil der kanzerogenen Stoffe aus der Industrie sowie der Gummi-, Textil-, und Lederverarbeitung ersetzt hat und die Arbeitssicherheit um ein vielfaches erhöht hat kommen aufgrund einer hohen Latenzzeit von bis zu 40 Jahren heute noch berufsbedingte Blasenkarzinome sporadisch vor. Auch besonders betroffen sind die Arbeiter der Chemie-, und Stahlindustrie, Automechaniker, sowie Zahntechniker und Friseure. Durch Kopplung mit Hydroxygruppen und Glucuronsäure werden die aromatischen Amine in der menschlichen Leber wasserlöslich gemacht, damit sie mit dem Urin schließlich ausgeschieden werden können. Dabei entfalten sie ihre kanzerogene Potenz (Huland et al., 2006).

Einen niedrigeren Rang, jedoch nicht zu vernachlässigen in der Liste der Risikofaktoren, bekleiden die chronisch-entzündlichen Schädigungen der Blasenschleimhaut, eine Infektion mit *Schistosoma haematobium* sowie Medikamente in Form von Chemotherapeutika (Kirkali et al., 2005).

1.1.5 Symptome und Diagnostik

Die schmerzlose Makrohämaturie ist das klassische Symptom des Blasenkarzinoms. Hinter dysurischen Beschwerden kann auch ein Karzinom stecken und ist bei

rezidivierenden Symptomen weiter abklärungsbedürftig. Das Auftreten von Flankenschmerzen kann Zeichen einer Harnabflussstörung im oberen Harntrakt sein und deutet auf ein fortgeschrittenes Tumorstadium hin, ebenso wie die Symptome Beckenschmerz, Gewichtsabnahme und Anämie.

Die Diagnostik beginnt mit der typischen Anamnese (Miktionsverhalten, Hämaturie, Dysurie, Drang- oder Pollakisurie) und klinischen Untersuchung inklusive rektaler und vaginaler Palpation. Fortsetzend kommen insbesondere die Sonographie, Urographie, Urinzytologie sowie letztlich die Zystoskopie als standardisierte diagnostische Verfahren zum Einsatz. Bei lokal fortgeschrittenen Karzinomen wird die Computertomographie des Beckens als diagnostische Bildgebung zur Abschätzung des Tumorstadiums und zur Planung der Therapie eingesetzt. Zum Ausschluss von Fernmetastasen dienen neben dem CT, auch eine Sonographie der Leber sowie eine Röntgenuntersuchung des Thorax und eine Knochenszintigraphie als diagnostische Mittel, da die Metastasen des Blasenkarzinoms häufig den Weg über die Blutbahn in Lunge, Leber und das Skelett finden.

Auf der Suche nach einem möglichen Tumormarker wurde ein Test zum Nachweis des nukleären Matrixproteines 22 (NMP 22) im Urin entwickelt. Dieser Test hat im Vergleich zur Urinzytologie eine höhere Sensitivität bei jedoch geringer Spezifität, sodass der Nachweis dieses Biomarkers im Rahmen von Routineuntersuchungen nicht geeignet ist (Glas et al., 2003).

Die endgültige Diagnose des Blasenkarzinoms steht erst nach einer histologischen Untersuchung von im Rahmen der Zystoskopie gewonnenen Gewebeproben.

1.1.6 Prognostische Einflüsse

Maßgeblich an der Prognose des Urothelkarzinoms beteiligt sind Faktoren wie die Eindringtiefe, der Differenzierungsgrad, Größe, Multifokalität sowie das Rezidiv Verhalten. Meist besteht dabei eine enge Beziehung zwischen Differenzierungsgrad und Infiltrationstiefe, denn mehr als 60 % der nichtinvasiven Urothelkarzinome sind hochdifferenziert. Umgekehrt sind die meisten Fälle von muskelinvasiv wachsenden Tumoren mäßig bis schlecht differenziert. Nur etwa 0,7 % der Fälle mit nichtinvasiven Tumoren (pTa) entwickeln eine Metastasierung. Häufig ist bei Patienten mit Low-risk Tumoren die

Metastasierung ein Ergebnis der lokalen Tumorprogression. Diese verschlechtert v.a. bei pT1G3-Tumoren die Prognose wesentlich. Rezidive des pT1G3-Urothelkarzinoms haben einen nachgewiesenen Einfluss auf die Überlebensrate der Patienten (Goebell et al., 2006, Gschwend et al., 2002). Eine mögliche Metastasierung korreliert vor allem mit der Infiltrationstiefe. Die 5-Jahres-Überlebensraten von pT2-Tumoren beträgt nach Zystektomie ca. 90 %. Bei blasenwandüberschreitenden Malignomen (>pT3b) ist die Langzeitüberlebensrate deutlich vermindert. Bei lokal fortgeschrittenen Tumoren ohne Lymphknotenmetastasen (pT3b, N0, M0) beträgt die Heilungsrate etwa 60 %, welche bei Lymphknotenbefall auf 20 % absinkt (Goebell et al., 2006).

1.1.7 Therapie und Nachsorge

Bei den nicht-muskelinvasiven Tumoren ist die transurethrale Resektion (TUR) die Therapiemethode der Wahl. Dabei besteht bei den Tumoren pTa und pT1 die Indikation zur Nachresektion, wenn beim Ersteingriff der Tumor nicht vollständig erfasst wurde, oder aber eine Resektion eines G3 Tumor erfolgte.

Ein Tumorrezidiv und eine Progression des Tumors nach TUR-B soll durch eine adjuvante Therapie vermieden werden. Als Rezidivprophylaxe dient die intravesikale Zytostatika Applikation mit Thiotepa, Mitomycin, Doxorubicin oder Epodyl im unmittelbaren Anschluss an die transurethrale Resektion; dies soll die Implantation von frei flottierenden Tumorzellen und somit die mögliche Gefahr von Rezidiven vermindern. In Abhängigkeit von der Rezidiv/Progressionswahrscheinlichkeit kann eine intravesikale Langzeit-Instillationstherapie mit Chemotherapeutika oder dem Immunmodulator BCG (Bacillus Calmette-Guerin) erfolgen. Aufgrund des hohen Rezidiv Risikos sowie der guten Prognose der Rezidive bei sofortiger Therapie ist eine konsequente, lebenslange Nachsorge notwendig (Goebell et al., 2006).

Die radikale Zystektomie mit pelviner Lymphadenektomie stellt heutzutage den Goldstandard in der Therapie der muskulinvasiven Blasenkarzinome ohne offensichtliche lymphogene oder hämatogene Metastasierung dar. Ziel der Operation ist primär die kurative Heilung, kann jedoch auch einer Steigerung der Lebensqualität bei tumorbedingten Schmerzen, Blutung oder Funktionsstörungen dienen. Neben der Blase, den distalen Harnleitern und ggf. der Harnröhre werden beim männlichen Geschlecht

noch Prostata, Samenblase und proximale Samenleiter entfernt. Bei der Frau werden Uterus, Adnexen und ventrales Scheidendrittel reseziert. Die Dissektion der Lymphknoten erfolgt in der Fossa obturatoria sowie in der Umgebung der externen Iliakalgefäße. Bei Patienten mit inoperablem Tumor oder aufgrund von Nebenerkrankungen, die eine Operation zur Kontraindikation machen, steht noch eine Bestrahlungstherapie als Ultima ratio zur Wahl.

Eine neoadjuvante Therapie mittels systemischer Chemotherapie zum Downstaging wird häufig bei fortgeschrittenen Tumorstadien vor radikaler Zystektomie durchgeführt. Die dabei am häufigsten angewendeten Therapieschemata sind das MVAC-Protokoll (Methotrexat, Vinblastin, Adriamycin und Cisplatin) sowie das GC-Protokoll (Gemcitabine und Cisplatin).

1.2 Frei zirkulierende DNA im Blut

Der erstmalige Nachweis von frei zirkulierenden Nukleinsäuren im menschlichen Blutplasma wurde vor über 60 Jahren und noch 5 Jahre vor der Erstbeschreibung der DNA-Doppelhelix Struktur durch Watson und Crick im Jahre 1948 von Mandel und Metais erbracht (Mandel und Metais, 1948). Es dauerte jedoch noch weitere 18 Jahre bis das Thema erneut aufgegriffen und weiter bei Patienten mit systemischem Lupus Erythematodes untersucht wurde (Anker et al., 1999, Tan et al., 1966). Weitere 11 Jahre später erfolgte dann durch eine Studie von Leon et al. im Jahre 1977 ein bahnbrechender Fortschritt auf diesem Gebiet. Sie zeigte signifikant erhöhte freie DNA-Mengen im Serum von Patienten mit unterschiedlichen malignen Tumorerkrankungen im Vergleich zu gesunden Versuchsteilnehmern. Des Weiteren zeigten sich in dieser Arbeit auch Differenzen der DNA-Mengen zwischen den einzelnen Tumorerkrankungen mit besonders hoher Konzentration bei Kopf-, Hals-, Brust- und Lungenkarzinomen sowie Lymphomen im Vergleich zu Tumoren des Verdauungstraktes und des Urogenitalsystems mit niedrigeren Werten. Ebenfalls ist bei metastasierten Tumoren die Konzentration der freien DNA im Vergleich zu nicht metastasierten Tumoren erhöht. Auch nach der Therapie spiegelten sich Unterschiede in der DNA-Konzentration zwischen Patienten wieder, bei denen die Strahlentherapie erfolgreich war im Vergleich zu den

Therapieversagern, bei denen die Werte zum Teil sogar weiter anstiegen (Leon et al., 1977).

Somit stellte sich die Frage, ob die zellfreie DNA im Serum eines Menschen ein möglicher Biomarker zur Früherkennung sowie zum Therapie Monitoring einsetzbar ist. In der weiteren Zukunft wurde diese Fragestellung in diversen Arbeiten aufgegriffen, wobei jeweils bestätigt wurde, dass die zellfreie DNA bei malignen Erkrankungen immer erhöht war im Vergleich zu Erkrankungen anderer Genese sowie mit gesunden Studienteilnehmern, wobei die jeweils gemessene DNA-Konzentration auch in klinisch vergleichbarer Situation in einem Teil jedoch deutlich variierten (Jahr et al., 2001, Shapiro et al., 1983, Wu et al., 2002). Die Studien der Bonner Arbeitsgruppe zeigten durch die Untersuchung von verschiedenen Tumorarten des Urogenitaltraktes (Prostata, muskelinvasives Harnblasenkarzinom), dass die Bestimmung der zellfreien DNA sowohl zur Diagnostik als auch zur prognostischen Zwecken genutzt werden kann (Ellinger et al., 2008 und 2009).

Die Ursache für die Freisetzung von Nukleinsäuren in das Blutserum ist noch nicht vollständig geklärt. Man vermutet, dass ein Teil des Erbgutes aus Lymphozyten sowie anderen zirkulierenden DNA-haltigen Zellen entstammt, sowie der andere Teil aus Tumorzellen hervorgeht, mutmaßlich apoptotischen oder nekrotischen Ursprungs (Anker et al., 1999, Jahr et al., 2001). Im Blut werden die frei zirkulierenden Nukleinsäuren durch Enzyme abgebaut, die Desoxyribonukleasen (Wang et al., 2003), sodass die im Blutserum frei zirkulierende DNA unterschiedlich stark fragmentiert ist. Die aus Apoptose hervorgehenden Anteile zeigen eine Fragmentlänge von etwa 180 Basenpaaren oder mehr, wobei die Fragmente nekrotischen Ursprungs um vielfaches länger sind, nämlich über 1000 Basenpaare lang (Jahr et al., 2001). Die Muster von Gelelektrophoresen zeigten bei Tumorpatienten ein gehäuftes Vorkommen kleiner DNA-Fragmente von ca. 100-200 Basenpaaren im Gegensatz zu gesunden Kontrollprobanden, jedoch zeigten beide Gruppen größere DNA-Fragmente in fast gleicher Menge. Dieses Verhältnis zwischen großem und kleinem Fragment wird durch den Begriff DNA-Integrität definiert. Eine Arbeit von Wu et al. aus dem Jahre 2002 beschrieb stärker fragmentierte DNA bei Tumorpatienten, die somit laut Theorie ihre Wurzel in der Apoptose finden. Jedoch die Arbeitsgruppe von Wang et al. zeigte ein Jahr später, nämlich 2003, gegenteilige Ergebnisse. Hierbei stellten sich in den Untersuchungen

größere Mengen weniger fragmentierter DNA bei Tumorpatienten im Vergleich zu gesunden Versuchsteilnehmern dar, was dann auch hier der Theorie zufolge auf Tumornekrosen zurückzuführen ist.

1.3 DNA-Hypermethylierung

Epigenetische Veränderungen sind ein häufiges Ereignis in der Karzinogenese zahlreicher Tumoren; die am besten charakterisierte epigenetische Veränderung ist die DNA-Hypermethylierung, welche am Ringsystem der Base Cytosin in C-5-Position auftritt. Sie tritt nur bei Sequenzen auf, bei der eine Guaninbase in 3'-Richtung unmittelbar auf eine Cytosinbase folgt, das sogenannte CpG-Dinukleotid. Solch eine chemische Reaktion wird durch Methyltransferasen katalysiert, von denen bisher drei verschiedene entdeckt wurden DNMT1, DNMT3A und DNMT3B. Sie übertragen die Methylgruppen von S-Adenosyl-Methionin auf die DNA. Für die Beibehaltung schon vorhandener Methylierungsmuster nach DNA-Replikation sorgt die DNMT1, den beiden anderen Methyltransferasen wird eine de novo Methylierung zugeschrieben. Die CpG-Dinukleotide finden sich nur zu einem kleinen Prozentsatz im menschlichen Genom. Dort sind sie aber wiederum auf nur zwei Orte im Bereich der DNA beschränkt: Zum einen in methylierter Form in den langen repetitiven Sequenzen nicht-kodierter DNA-Abschnitte als Schutzmechanismus vor fremder DNA (zum Beispiel viralen Ursprungs) und zum anderen im Promotorbereich eines Gens, wo sie oftmals nicht methyliert sind (Robertson und Wolffe, 2000). Eine Anhäufung von CpG-Dinukleotiden wird als CpG-Insel bezeichnet.

Die Aufgabe der Methylierung besteht darin, Transkriptionsprozesse im menschlichen Erbgut zu regulieren. Das durch die Methyltransferasen erstellte individuell typische Methylierungsmuster wird auch nach Replikation der DNA beibehalten. Durch eine Methylierung im Promotorbereich wird das zugehörige Gen „abgeschaltet“ und somit nicht mehr exprimiert. Diese Transkriptionshemmung kommt im Rahmen des genetischen Imprinting zum Einsatz. Weiterhin scheint vor allem die DNA-Methylierung im perizentromerischen Chromosomenabschnitt wesentlich für die Stabilität und den Erhalt einer geordneten Vervielfältigung des Erbguts zu sein (Herman et al., 2003).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass in einer gesunden menschlichen Zelle methylierte und nicht-methylierte Abschnitte essentiell für den Erhalt der stabilen Zellfunktion sind. Ein Großteil der CpG-Dinukleotide außerhalb von Promotorbereichen ist stark methyliert, wohingegen die CpG-Inseln der Promotorbereiche meist unmethyliert sind. Das weibliche inaktivierte X-Chromosom stellt hier eine Besonderheit dar, bei dem die vollständig methylierten CpG-Inseln hier den abgeschalteten Genen vorangehen sowie die im Rahmen des genomischen Imprintings ebenso methylierten inaktivierten Allelen (Herman et al., 2003)

1.3.1 DNA-Hypermethylierung bei malignen Erkrankungen

Im Vergleich zur gesunden Zelle zeigt die maligne entartete Tumorzelle bezüglich ihres Methylierungsstatus ein umgekehrtes Muster. Hier kann man einen deutlichen Verlust der Methylierung in dem sonst stark methylierten Bereich nicht-kodierender DNA-Abschnitte identifizieren sowie eine deutliche Zunahme der Methylierung im eigentlich unmethylierten Promotorbereich eines Genabschnittes, was auch als Promotorhypermethylierung bezeichnet wird. Als Folge dieser Umkehrung ergibt sich zum einen die Gefahr für den Organismus, dass eingeschleuste Fremd-DNA z.B. viralen Ursprungs exprimiert wird und somit den Organismus schädigt und zum anderen dass die Stabilität in den perizentromerischen Chromosomenabschnitten gefährdet ist. Vor allem aber ist eine weitere Konsequenz eine Inaktivierung bestimmter Gene, besonders der Tumorsuppressoren (Herman et al., 2003).

Pathologische Veränderungen in der Promotorhypermethylierung können ähnliche Konsequenzen im kodierenden Abschnitt der DNA haben wie Mutationen, wobei nach der Zwei-Treffer-Hypothese von Knudson beide Allele des Tumorsuppressorgens von der Inaktivierung in Form von Mutation, Hypermethylierung oder chromosomalen Deletion betroffen sein müssen um zur malignen Entartung einer Zelle zu führen.

Die Geninaktivierung im Rahmen der Karzinogenese infolge von Hypermethylierung ist laut Jones und Baylin (2002) mindestens genauso häufig wie infolge von Mutationen und ist prinzipiell ein frühes Ereignis in der malignen Entartung. Des Weiteren gehen Jones und Baylin davon aus, dass dies im Rahmen der Karzinogenese ein schrittweise ablaufender Prozess ist - im Vergleich zum abrupten Auftreten einer Mutation,

beginnend bei wenigen CpG-Inseln mit Ausbreitung auf weitere im Promotorbereich. Hierdurch wird dann schließlich die Transkription eines Gens zunehmend gedrosselt.

Ein Ziel der gegenwärtigen Forschung und auch dieser Arbeit ist es für maligne Erkrankungen ein charakteristisches Profil von hypermethylierten Promotoren zu erstellen, um aus deren Nachweis in körpereigenem Material Rückschlüsse auf potentiell vorhandene Tumorerkrankungen schließen zu können. Es existieren bereits einige Profile von Tumorerkrankungen, bei denen solche DNA-Veränderungen im Serum, Urin, Sputum sowie anderen Körperflüssigkeiten nachgewiesen wurde. Vorteil dieser Nachweismethode ist, dass die untersuchten DNA-Fragmente wesentlich stabiler sind als bisher untersuchte RNA-Fragmente und diverse Proteine. Weiterhin wird der Nachweis dadurch erleichtert, dass die Hypermethylierung immer an derselben Stelle des Gens, nämlich im Promotor zu finden ist, im Gegensatz zu Mutationen (Esteller et al., 2001, Herman et al., 2003)

Fakt ist, dass die Hypermethylierungen prinzipiell reversibel sind und dies versucht man sich in der Therapie zunutze zu machen, indem man Stoffe wie 5-Azacytidin und 5-Aza-2'-Deoxycytidin einsetzt. Diese versuchen die Methyltransferasen zu inhibieren und somit zur Re-Expression vorherig inaktivierter Gene zu führen (Issa et al., 2004, Jones und Baylin, 2002, Plimack et al., 2007, Winquist et al., 2006).

1.4 Promotorhypermethylierung beim Harnblasenkarzinom

Parallel zu anderen Tumorentitäten wurden auch beim Harnblasenkarzinom unterschiedliche Tumorsuppressorgene auf ihren Methylierungsstatus hin untersucht. Hier ist jedoch zwischen Untersuchungen am Tumorgewebe direkt und Untersuchungen an anderem vom Patienten gewonnen Material wie Blut/Serum, Sputum und Urin zu differenzieren. Die Tab. 2 gibt einen Überblick über die hier in dieser Arbeit betrachteten Gene und deren Stand der wissenschaftlichen Untersuchungen.

Tab. 2: Methylierungsfrequenz ausgewählter Gene im Urin/Blut von Harnblasenkarzinom-Patienten

Genort	Publikation (Autor, Jahr)	Material	Fallzahl	% positiv
APC	Berrada et al., 2012	Urinsediment	32	79,3
	Eissa et al., 2011	Urinsediment	210	59,5
	Serizawa et al., 2011	Urinsediment	101	24
	Ellinger et al., 2008	Serum	45	59
	Pu et al., 2006	Urinsediment	37	55
	Hoque et al., 2006	Urinsediment	15	53,3
	Yates et al., 2006	Urinsediment	104	24
	Dulaimi et al., 2004	Urinsediment	45	69
	Ellinger et al., 2008	Serum	45	59
GSTP1	Yu et al., 2007	Urinsediment	11	9,1
	Yu et al., 2007	Urinsediment	143	3,5
	Hoque et al., 2006	Urinsediment	175	42,8
	Yates et al., 2006	Urinsediment	104	1
	Chen et al., 2011	Urinsediment	30	27,6
p14	Lin et al., 2010	Urinsediment	57	33
	Dulaimi et al., 2004	Urinsediment	45	35
	Yu et al., 2007	Urinsediment	11	0
	Domínguez et al., 2002	Serum	27	48,1
	Yates et al., 2006	Urinsediment	104	0
	Zhong et al., 2013	Urinsediment	49	0
	Chan et al., 2002	Urinsediment	22	13,6
p16	Lin et al., 2010	Urinsediment	57	35
	Dulaimi et al., 2004	Urinsediment	45	7
	Jabłonowski et al., 2011	Serum	42	40,5
	Valenzuela et al., 2002	Serum	86	22
	Yu et al., 2007	Urinsediment	11	0

	Domínguez et al., 2002	Serum	27	7,4
	Yates et al., 2006	Urinsediment	104	0
PTGS2	Ellinger et al., 2008	Serum	45	24
RAR-β	Berrada et al., 2012	Urinsediment	32	70,8
	Eissa et al., 2011	Urinsediment	210	62,8
	Serizawa et al., 2011	Urinsediment	101	8
	Hoque et al., 2006	Urinsediment	15	60
	Chan et al., 2002	Urinsediment	22	68,2
	Negraes et al., 2008	Zelllinien	23	8,6
	Yates et al., 2006	Urinsediment	104	1
RASSF1A	Lin et al., 2010	Urinsediment	57	65
	Chen et al., 2011	Urinsediment	30	30
	Serizawa et al., 2011	Urinsediment	101	18
	Hoque et al., 2006	Urinsediment	15	53,3
	Yates et al., 2006	Urinsediment	104	40
	Dulaimi et al., 2004	Urinsediment	45	51
	Zhong et al., 2013	Urinsediment	49	28,5
	Negraes et al., 2008	Zelllinien	16	50
	Yu et al., 2007	Urinsediment	11	36,4
	Friedrich et al., 2004	Urinsediment	37	94,6
	Yu et al., 2007	Urinsediment	143	35,6
	Chan et al., 2003	Urinsediment	14	50
TIG1	Ellinger et al., 2008	Serum	45	32
TIMP3	Zhong et al., 2013	Urinsediment	49	14,3
	Hoque et al., 2006	Urinsediment	15	7

1.5 Zielsetzung

Von entscheidender Bedeutung für die Prognose des Blasenkarzinoms ist der Zeitpunkt der Diagnosestellung, da eine blasenerhaltene Therapie nur in einem frühen Stadium möglich ist. Bei muskelinvasiven Karzinomen ist eine Zystektomie vonnöten. Bei organ-überschreitenden bzw. metastasierten Karzinomen ist die Prognose trotz aggressiver Therapie ungünstig. Die derzeitig zur Verfügung stehenden diagnostischen Mittel ohne Invasivität haben eine begrenzte Sensitivität oder besitzen nur eine eingeschränkte prognostische Aussagekraft.

Im Rahmen dieser Arbeit soll im Blutserum zirkulierende zellfreie DNA auf ihren Nutzen in der Diagnostik des Harnblasenkarzinoms hin überprüft werden. Zu diesem Zweck erfolgte die prospektive, multizentrische Sammlung von Serum von 95 Patienten mit histologisch gesichertem Harnblasenkarzinom, von 16 Patienten mit einer benignen urologischen Erkrankung, von 34 Patienten mit Blasenkarzinom in der Anamnese ohne jetzt erneutem histologischen Nachweis eines Karzinoms, von 29 Patienten mit einer Entzündung der Harnblase sowie von 53 gesunden Kontrollpatienten. Auf der Basis der dargestellten Erfahrungen bezüglich der zellfreien DNA sollen folgende Fragestellungen bearbeitet werden:

1. Mit Hilfe der quantitativen Real-Time-PCR soll die Konzentration von zellfreier DNA bestimmt werden. Hierbei sollen bei jedem Patienten kleine sowie große DNA-Fragmente ermittelt werden. Aus dem Verhältnis der gemessenen Konzentration beider Fragmente soll jeweilig auf die Integrität der freien DNA und deren möglichen Ursprung geschlossen werden.
2. Die zellfreie DNA soll des Weiteren auf Hypermethylierung in den Promotor-bereichen verschiedener Genorte untersucht werden. Hierbei erfolgt zunächst die Behandlung mit methylierungssensitiven Restriktionsenzymen um im Anschluss den Methylierungsgrad der zellfreien DNA per quantitativer Real-Time-PCR bestimmen zu können. Es werden insgesamt neun Genorte betrachtet: APC, GSTP1, P14, P16, PTGS2, RAR- β , RASSF1A, TIG1 und TIMP3.

Die ermittelten Werte zu Konzentration, Integrität und Methylierungsstatus der zellfreien DNA werden mit Hilfe von Receiver Operator Curve Analysen auf ihre diagnostische Eignung hin untersucht. Des Weiteren erfolgt die Überprüfung eines möglichen

Zusammenhangs zwischen den detektierten Parametern und den erhobenen klinisch-pathologischen Parametern mit Unterstützung weiterer statistischer Tests.

In dieser Methode besteht der Vorteil in der vor allem nur wenig invasiven Gewinnung des Untersuchungsmaterials durch eine einfache Blutentnahme und könnte langfristig zu einer Vereinfachung und Erleichterung der Diagnostik des Harnblasenkarzinoms führen.

2. Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Geräte

Tab. 3: Geräte mit Herstellerangabe

Geräte	Hersteller
ABI Prism 7900 HT Sequence Detection System	Applied Biosystems, Foster City California, USA
Absauggerät miniport	KNF Neuberger GmbH Freiburg i. Br., GER
Absorptionsspektrometer Nanodrop ND1000®	Thermo Fisher Scientific Waltham, USA
Analysenwaage BP 2100 S	Sartorius, Göttingen, GER
Einkanal-Pipetten Research® (0,5-10 µl, 2-20 µl, 10-100 µl, 20-200 µl, 100-1000 µl)	Eppendorf, Hamburg, GER
Gel Dokumentationsanlage mit Kamera Classic Uno	Intas, Göttingen, GER
Horizontalelektrophoresekammer Sub-cell GT Basic	Biorad Laboratories, Hercules California, USA
Mikrozentrifuge Sigma 1-15	Sigma-Aldrich, Seelze, GER
Spannungsquelle PowerPac 100	Biorad Labor., Hercules, California, USA
Thermocycler UNO-Thermoblock	Biometra, Göttingen, GER
Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg, GER
Tischzentrifuge Universal 30 RF	Hettich Zentrifugen, Tuttlingen, GER
Vortex-Genie 2	Scientific Industries, New York, USA
8-Kanal-Pipette (1-10 µl)	Biozym Scientific, Oldendorf, GER

2.1.2 Labormaterialien

Tab. 4: Labormaterialien mit Herstellerangabe

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

2.1.3 Chemikalien

Die hier verwendeten Chemikalien wurden im höchsten verfügbaren Reinheitsgrad sowie in Analysequalität erstanden. Ihre Lagerung erfolgte nach Herstellervorschriften.

Tab. 5: Chemikalien mit Herstellerangabe

Chemikalien	Hersteller
Deionisiertes Wasser aus Reinstwasser-systemanlage Milli-Q biocel	Millipore, Molsheim, Frankreich
Dekontaminationsmittel RNase AWAY®	Molecular BioProducts, Inc., San Diego, USA
DEPC-Wasser	Ambicon, Austin, Texas, USA
DNA Längenstandard Track It 100 bp DNA ladder	Invitrogen, Carlsbad, USA
Ethanol absolut	VWR, Darmstadt, GER
Ethylendinitrilotetraacetat (EDTA)	Sigma-Aldrich, Seelze, GER
Fluoreszenzfarbstoff PicoGreen® dsDNA Quantitation Reagent	Invitrogen, Carlsbad, USA
PCR-Wasser WATER	Sigma Chemical CO, Irvine, UK
Phosphatpuffer PBS	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich
Tris-Hydrochlorid (Tris-HCL)	Fluka, Buchs, Schweiz
Ultrapure 10xTBE-Buffer	Invitrogen, Paisley, England

2.1.4 Kits

Tab. 6: Kits mit Herstellerangabe

Kits	Hersteller
ChargeSwitch® gDNA 1ml Serum Kit	Invitrogen, Carlsbad, USA
Illustra GenomiPhi V2 DNA Amplification Kit	GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg, GER
PureLink™ Genomic DNA Mini Kit	Invitrogen, Carlsbad, USA
QIAamp Ultra Sens Virus	Qiagen, Hilden, GER
SYBR® GreenER™ qPCR SuperMix	Invitrogen, Carlsbad, USA

2.1.5 Enzyme

Tab. 7: Enzyme mit Herstellerangabe

Enzyme	Hersteller
Bsh1236I (FnuDII)	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, GER
CpG Methyltransferase (M.SssI)	New England Biolabs, Ipswich, USA
Hin6I (HinP1I)	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, GER
HpaII	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, GER

2.1.6 Primer

Die in Tab. 8 dargestellten genutzten Primersequenzen wurden im Reinheitsgrad „desalted“ der Firma Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland bezogen. Es wurde eine Stocklösung mit der Konzentration von 100 pmol/µl aus dem initial gefriergetrockneten Material durch Lösung in einer entsprechenden Menge eines einfach konzentrierten Tris-EDTA-Puffers (TE-Puffer) hergestellt. Die Lagerung der Stocklösung erfolgte bei einer Temperatur von -20 °C. Direkt vor Gebrauch musste noch die Stocklösung in einem Verhältnis von 1:10 mit PCR-Wasser verdünnt werden, um eine gebrauchsfertige Lösung mit einer Konzentration von 10 pmol Primer/µl zu erhalten.

Aus den Ensemble Human Gene View-Einträgen sowie mit Unterstützung des Primer 3-Programms (Rozen und Skaletsky, 2000) erfolgte die Abteilung der Primer Sequenzen.

Tab. 8: Primersequenzen

Primer	Laufriichtung	Sequenzen
<i>ACTB-106</i>	Forward Reverse	TCG TGC GTG ACA TTA AGG AG GGC AGC TCG TAG CTC TTC TC
<i>ACTB-384</i>	Forward Reverse	GCT ATC CCT GTA CGC CTC TG AGG AAG GAA GGC TGG AAG AG
<i>APC</i>	Forward Reverse	GGA GAG AGA AGC AGC TGT GTA AT CAG CCA CAT GTC GGT CAC
<i>GSTP1</i>	Forward Reverse	GGG ACC CTC CAG AAG AGC ACT CAC TGG TGG CGA AGA CT
<i>p14</i>	Forward Reverse	AGT TAA GGG GGC AGG AGT G GGA GGG TCA CCA AGA ACC TG
<i>p16</i>	Forward Reverse	AGC ACC GGA GGA AGA AAG AG CTG CCT GCT CTA CCC CTC TC
<i>PTGS2</i>	Forward Reverse	GGA GAG GAA GCC AAG TGT CC GGT TTC CGC CAG ATG TCT TT
<i>RAR-β</i>	Forward Reverse	ATG CGA GCT GTT TGA GGA CT AAT GCG TTC CGG ATC CTA C
<i>RASSF1A</i>	Forward Reverse	GCT TGC TAG CGC CCA AAG CAG CTC CCG CAG CTC AAT
<i>TIG1</i>	Forward Reverse	ACG CGG TAC GAG GTA GCA C CGG GCT TAG TGC TAG GAT GC
<i>TIMP3</i>	Forward Reverse	GCA CGG CAA CTT TGG AGA G GAG CCA AGG GGT CAT TGC

2.1.7 Software

Tab. 9: Software mit Herstellerangabe

Software	Hersteller
MS Office 2007	Microsoft, Seattle, USA
Primer 3	Whitehead Institute for Biomedical Research, Cambridge, MA, USA
SDS Software 2.2	Applied Biosystems, Foster City, California, USA
SPSS Statistics 20.0	SPSS Inc., Chicago, Illinois, USA

2.1.8 Probenmaterial

Nach Aufklärung gaben die Probanden ihre schriftliche Einwilligung zur Teilnahme an dieser Studie. Die Studie erfolgte unter Berücksichtigung der revidierten Deklaration von Helsinki des Weltärztebundes aus dem Jahre 2000 sowie der aktuellen gesetzlichen Richtlinien. Die Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Universität Bonn erteilte die Genehmigung zur Durchführung dieser Studie (Votum Nummer 019/03).

Die Serumproben stammten von 5 verschiedenen Untersuchungskollektiven, wobei das Kollektiv der Karzinompatienten in muskelinvasive (MIBC) und nicht muskelinvasive (NMIBC) Blasenkarzinome unterteilt wird. Die insgesamt 95 Blasenkarzinompatienten sowie die 16 Patienten mit einer benignen urologischen Erkrankung, den 29 Patienten mit einer Entzündung der Harnblase und den 34 Patienten mit einem Blasenkarzinom in der Anamnese unterzogen sich im Zeitraum zwischen November 2006 und Juli 2007 einer operativen Therapie. Die Proben wurden multizentrisch gesammelt, zum einen in der Klinik und Poliklinik für Urologie des Universitätsklinikum Bonn sowie in den urologischen Abteilungen des St. Josef-Hospitals in Troisdorf, des Waldkrankenhauses in Bonn und der katholischen Kliniken Oberberg in Lindlar. Das Kontrollkollektiv besteht aus 54 gesunden Probanden, die Mitarbeiter des Universitätsklinikum Bonn sind. Einen Überblick über Patienten, Probanden und ausgewählte klinisch-pathologische Parametern gibt Tab. 10. Das einzige Ausschlusskriterium für die Teilnahme an der Studie bildete ein Zweitmalignom in der Anamnese der Patienten.

Bei stationärer Aufnahme des Patienten zur operativen Therapie erfolgte die Blutentnahme präoperativ mit Hilfe von Serum S-Monovetten mit Gel und Gerinnungs-

aktivator (Firma Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland). Nach Abnahme wurde das Patientenblut für insgesamt 60 Minuten kühl gelagert, um anschließend bei 1800 g über einen weiteren Zeitraum von 10 Minuten zentrifugiert zu werden. Anschließend erfolgte das präzise Abpipettieren des vom Blutkuchen abgetrennten Serums in Aufbewahrungsröhrchen. Diese wurden in sogenannten Aliquots zu je 1,5 ml bei einer Temperatur von -80 °C gelagert.

Außerdem wurden klinische Daten der Patienten sowie die pathologischen Merkmale der Tumoren miterfasst. Dies sind im Einzelnen: Geschlecht, Alter, Symptomatik, Tumorstadium, Differenzierungsgrad (Grading) und Raucherstadium (Tab. 10).

Tab. 10: Klinisch-pathologische Parameter des Patientenkollektivs

	NMIBC n = 75	MIBC n = 20	Benigne n = 16	Gesunde n = 53	BCA Anamnese n = 34	Entzündung n = 29
Alter						
Median	74	77	65,5	28	67,5	67
Mittelwert	72,3	73,5	59,7	31	68	65,4
Spannweite	38-91	44-94	27-83	18-56	44-86	36-84
Geschlecht						
männlich	51	18	13	35	28	22
weiblich	24	2	3	18	6	7
Raucherstatus						
Nichtraucher	24	2				
Raucher	15	3				
Ex-Raucher	32	10				
pT-Stadium						
pT0	1					
pTis	3					
pTa	49					
pT1	22					
pT2		15				
pT3		4				
pT4		1				
Nodalstatus						
Nx	73	13				
N0	2	2				
N1		3				
N2		2				
Grading						
G1	17	0				
G2	40	2				
G3	18	18				

2.2 Methoden

2.2.1 Aufreinigung und Isolierung der DNA

Der erste Schritt zur Gewinnung der freien DNA aus den Serumproben ist die Isolation mit Hilfe von ChargeSwitch® gDNA 1 ml Serum Kit (Invitrogen, Carlsbad, USA). Das Kit besitzt kleine magnetische „Kügelchen“ von weniger als 1 µm Größe als funktionellen Bestandteil, die in Abhängigkeit vom Umgebungs-pH-Wert unterschiedliche Bindungseigenschaften für Nukleinsäuren besitzen. So ist zum Beispiel bei niedrigem pH die Oberfläche der Kügelchen positiv geladen und kann somit Nukleinsäuren negativer Ladung binden. Wird nun der Umgebungs-pH angehoben, werden die so gebundenen Nukleinsäuren wieder freigesetzt. Vorteil des magnetischen Charakters ist, dass Kügelchen mit gebundener DNA leicht an einem Punkt des Reaktionsgefäßes konzentriert werden können durch einen von außen aufgesetzten Magneten, wodurch dann nach Herstellerangaben zum Kit die jeweilige Reaktionslösung ausgewechselt werden kann. Weitere Zusätze des Kits sind die Proteinase K zur Verdauung von kontaminierenden Proteinen und hinderlichen Enzymen wie DNAsen sowie unterschiedliche Puffer, damit je nach Arbeitsschritt der pH-Wert variiert werden kann (Lysispuffer, Aufreinigungspuffer, Waschpuffer, Elutionspuffer).

Der erste Schritt der DNA-Isolation ist die Zugabe von Lysispuffer und Proteinase K zu 1 ml des zuvor aufgetauten Blutserums. Das Gemisch wird insgesamt 20 Minuten inkubiert. Anschließend erfolgt die Versetzung des Gemischs mit den Magnetkügelchen sowie mit Aufreinigungspuffer, der den pH auf unter 6,0 senkt und somit die Bindung der DNA an die Kügelchen bewirkt. Nun werden Verunreinigungen durch Wegnahme des Aufreinigungspuffers sowie zweimalige Zugabe und Wegnahme von Waschpuffer entfernt. Durch Hinzufügen von Elutionspuffer im letzten Schritt wird der pH-Wert des Gemischs auf 8,5 angehoben und somit die gebundene DNA an den Kügelchen aufgrund von Ladungsumpolung und mit Hilfe eines Magneten von den Kügelchen getrennt und freigesetzt. Die Lösung mit der freigesetzten DNA wird nun in ein separates Gefäß überführt und bis zur Weiterverarbeitung bei einer Temperatur von -20° C gelagert (Zahalka, 2010).

2.2.2 Kontrollproben

Die Herstellung der Kontrollproben für die Methylierungsanalysen erfolgt aus einer Blutprobe von gesunden Freiwilligen. Dabei werden 9 ml Blut des gesunden Probanden in einem EDTA-Röhrchen abgenommen und anschließend bei 1900 g bei einer Temperatur von +4° C für insgesamt 20 Minuten zentrifugiert. Die nun sichtbare Leukozytenfraktion, der sogenannte „Buffy Coat“ wird abpipettiert und mit dem PureLink Genomic DNA Mini Kit (Invitrogen, Carlsbad, USA) versetzt, um die enthaltene genomische DNA zu isolieren. Dem Buffy Coat wird dabei PBS, Lyse-/Bindepuffer, RNase A sowie Proteinase K zugefügt und dann für 10 Minuten bei 55° C im Thermomixer inkubiert. Im Anschluss wird Ethanol hinzugegeben und die Lösung auf Aufreinigungssäulen aufgetragen und zentrifugiert. Durch Zugabe von zwei unterschiedlichen Waschpuffern werden verunreinigende Elemente entfernt. Anschließend kann die an das Säulenmaterial gebundene DNA durch Elutionspuffer gelöst werden. Die Konzentration der nun gelösten DNA kann bei einer Wellenlänge von 260 nm am Nanodrop photometrisch bestimmt werden. Auch hier erfolgt die Lagerung bei -20° C. Auf der einen Seite erfolgt hiermit die Herstellung einer Negativkontrolle für die methylierungssensitiven PCRs als nicht methylierte DNA-Probe sowie auf der anderen Seite eine Positivkontrolle als universell an CpG-Sequenzen methylierenden DNA (Sssl-DNA).

Durch Anwendung des GenomiPhi Amplification Kit (Amersham Bioscience, Freiberg, Deutschland) wird die Negativkontrolle durch unspezifische Primer und DNA-Polymerasen hergestellt. Dieses Kit enthält weder Methyltransferasen noch Methylendonatoren, sodass nach anschließender PCR somit eine vollständig unmethylierte DNA vorliegt. Zur Erstellung der Positivkontrolle benötigt man die Hilfe des Enzyms CpG-Methyltransferase (M.Sssl) sowie des Methyldonators S-Adenosyl-Methionin (New England Biolabs Inc., Ipswich, Massachusetts, USA). Beide Stoffe müssen mit dem mitgelieferten Puffer sowie mit PCR-Wasser bei 37° C für insgesamt 60 Minuten inkubiert werden. Durch anschließendes Erhitzen auf 65° C für weitere 20 Minuten wird die Methyltransferase inaktiviert. Auch hier erfolgt die Lagerung der Positiv- und Negativkontrolle bei -20° C (Zahalka, 2010).

2.2.3 Behandlung mit Restriktionsenzymen

Der entscheidende Schritt in der hier vorliegenden Arbeit zur Differenzierung zwischen methylierten und nicht methylierten DNA-Fragmenten ist die Behandlung der Serumproben mit Restriktionsenzymen (Ellinger N, 2008).

Restriktionsenzyme zerschneiden die doppelsträngige DNA-Helix an spezifischen Basensequenzen. Schlussfolgernd erkennen diese Enzyme für das jeweilige Enzym spezifische Sequenzen innerhalb des DNA-Strangs und zerteilen diesen dort in gewisse Fragmente, die mit einer charakteristischen Basenfolge enden (Koecke, 2000, Roberts, 2005). Die hier verwendeten Restriktionsenzyme sind methylierungssensitiv, das bedeutet, dass sie die DNA nur an Stellen zerteilen, an denen vorhandene Cytosinreste nicht methyliert sind. Dies sind die Endonukleasen Bsh1236I, Hin6I und HpaII, welche in 5'→3'-Richtung den DNA-Strang an den Sequenzen CGCG (Bsh1236I), GCGC (Hin6I) und CCGG (HpaII) schneiden, vorausgesetzt es sind keine CpG-Methylierungen anwesend.

Die Behandlung der gewonnenen Serumproben mit den Restriktionsenzymen verläuft wie folgt: es werden 20 µl von dem aus einer Probe gewonnenen DNA-Eluat in ein Reaktionsgefäß überführt und mit je 2 µl entsprechend 20 Einheiten der 3 Restriktionsenzyme versetzt. Außerdem werden noch 4,5 µl 10x Tango-Puffer sowie 14,5 µl Wasser hinzugegeben und durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren durchmischt. Die anschließende Inkubation erfolgt bei 37° C. Nach insgesamt 3,5 Stunden werden dann jeweils 0,5 µl entsprechend 10 Einheiten der 3 Restriktionsenzyme mit Tango-Puffer und Wasser hinzugefügt, sodass ein Gesamtvolumen von 50 µl entsteht. Grund für die erneute Zumischung der Enzyme ist die Vorstellung, dass es zu einer möglichst kompletten Zerteilung der nicht methylierten DNA-Sequenzen kommt. Nun folgt die erneute Inkubation bei 37° C für weitere 12 Stunden. Um jetzt die Enzyme zu inaktivieren wird das Reaktionsgemisch für 20 Minuten auf 65° C erhitzt. Anschließend folgt die Aufteilung der Proben in Aliquots zu je 3,3 µl in separate Reaktionsgefäße, die bis zur Weiterverarbeitung bei -20° C gelagert werden.

Der gleiche Reaktionsschritt wird auch für die Positiv- und Negativkontrollen durchlaufen.

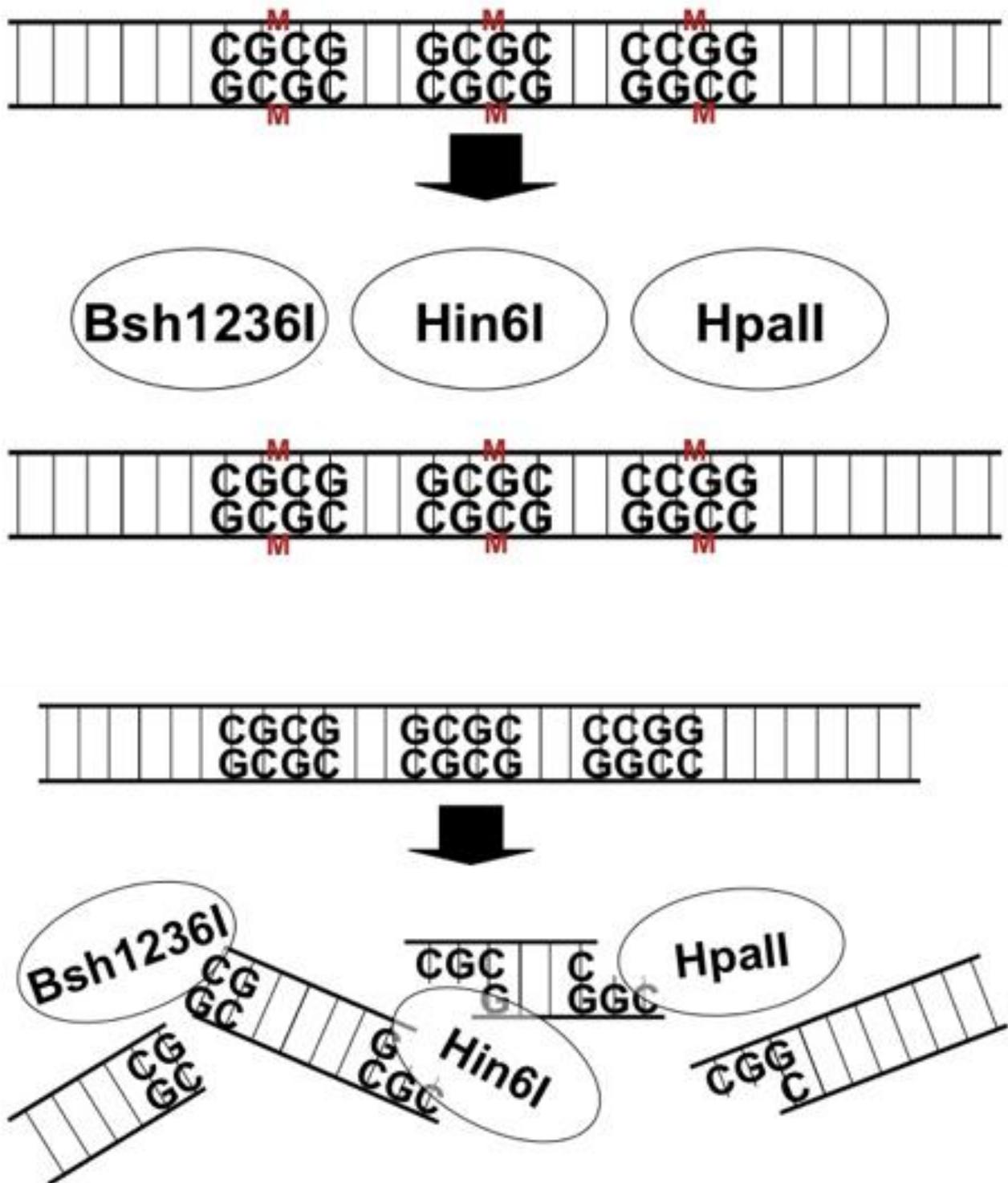


Abb. 2: Funktionsweise der Restriktionsenzyme
 Die Restriktionsenzyme schneiden die DNA an ihrer Erkennungssequenz (Bsh1236I: CGCG, Hin6I: GCGC und HpaII: CCGG), wenn die DNA an dieser Stelle nicht methyliert ist. Methylierte DNA bleibt unverändert.

2.2.4 Primerdesign

Die hier verwendeten Primer sollten verschiedene Funktionen besitzen:

1) ACTB-106 dient zur Quantifizierung der zirkulierenden zellfreien DNA, mit dessen Hilfe kleine DNA-Fragmente bestimmt werden können bei einer Produktgröße von 106 Basenpaaren. Große DNA-Fragmente innerhalb desselben Gens werden durch das Primerpaar ACTB-384 bestimmt, wobei die Produktgröße hier 384 Basenpaare beträgt. Schlussfolgernd ist ACTB-106 ein Teil des großen Fragmentes ACTB-384 (Abb. 3). Es kann letztendlich aus dem Verhältnis der bei der qPCR ermittelten Produktkonzentrationen von ACTB-384 und ACTB-106 auf die DNA-Integrität geschlossen werden. Ferner soll in dem Primer-Paar ACTB-106 keine Schnittstelle für die verwendeten Restriktionsendonukleasen enthalten sein, damit ACTB-106 zur Normalisierung der methylierten Zielgene heran-gezogen werden kann.

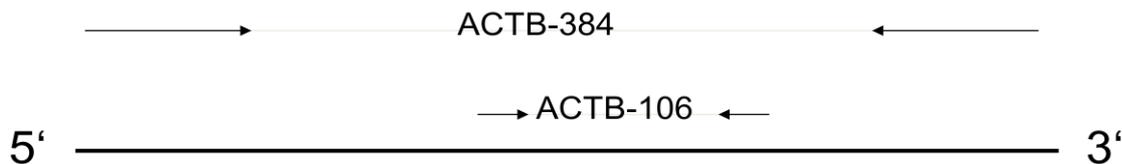


Abb. 3: Lagebeziehung ACTB-106 und ACTB-384 Primer

Das kleine Fragment ACTB-106 ist ein Teil des großen Fragments ACTB-384.

2) Des Weiteren benötigt man Primer, dessen Produkte mindestens eine Erkennungssequenz der verwendeten Restriktionsendonukleasen enthalten, damit die CpG-Hypermethylierung in den zu untersuchenden Gene detektiert werden können.

Die Entwicklung der Primersequenzen der zu untersuchenden Gene erfolgt mit Unterstützung des Programms Primer 3 (Tab. 9). Einen Überblick über die Primerbindungsstellen, Erkennungssequenzen sowie Schnittstellen der Restriktionsenzyme und die flankierenden Promotorsequenzen der untersuchten Gene gibt Abb. 4.

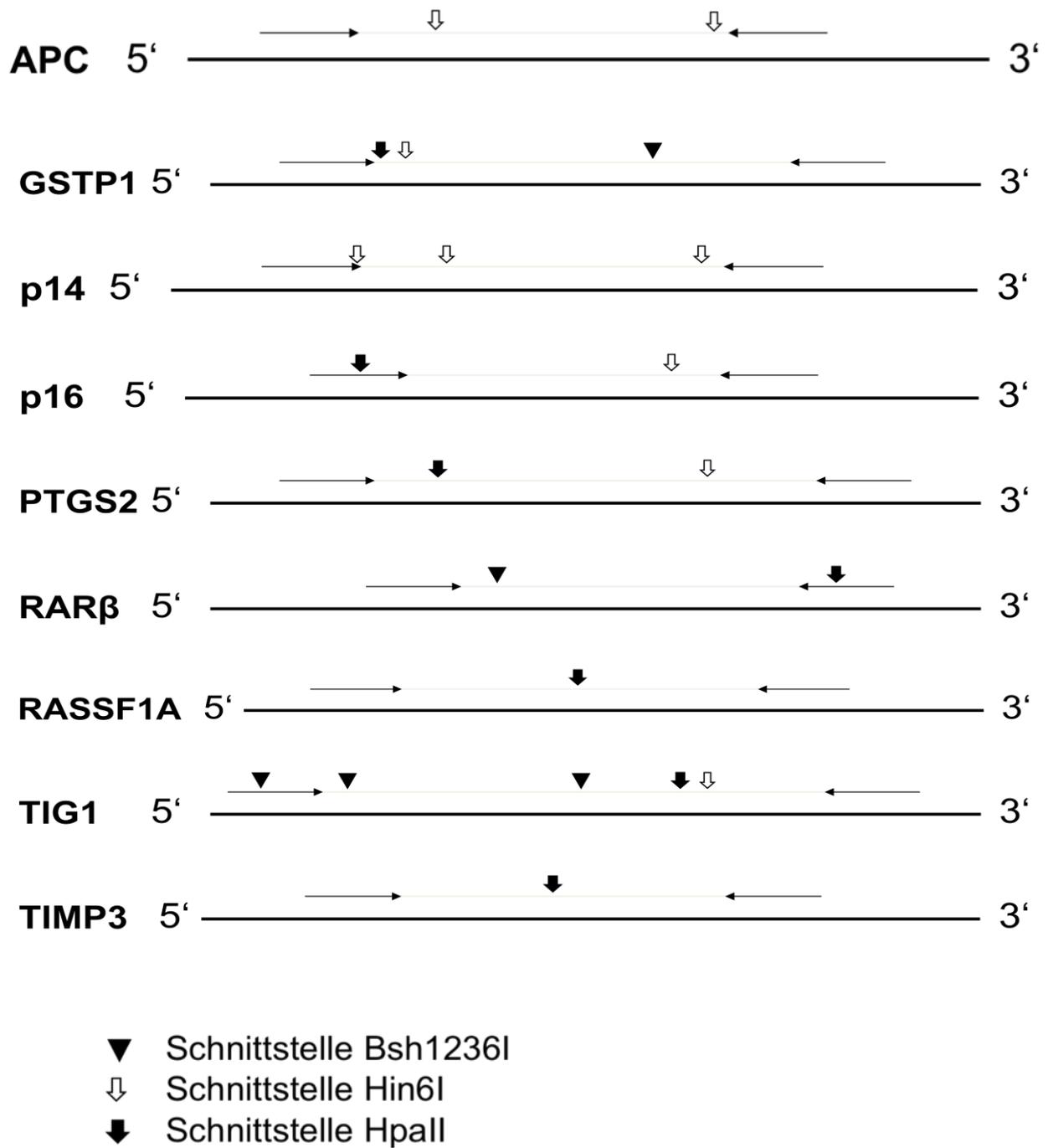


Abb. 4: Lokalisation der Restriktionsenzym-Schnittstellen

2.2.5 Quantitative Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ist ein Verfahren zur Amplifikation einer bestimmten DNA-Sequenz, welches man sich zum Nachweis der untersuchten Gene zu Nutze macht. Es werden Primerpaare zum Ablauf der PCR benötigt, die sich als sogenannte Oligonukleotidsequenzen an die zu amplifizierende DNA-Sequenz komplementär anlagern und somit den Startpunkt für die DNA-Polymerase bilden. Sie ist ein hitzestabiles Enzym, die die darauffolgende DNA-Synthese katalysiert. Des Weiteren werden noch die Bausteine in Form von Desoxyribonukleotidtriphosphate benötigt.

Die gesamte Reaktion wird über zyklische Veränderungen der Reaktionstemperatur gesteuert. Als erster Schritt benötigt man zur Denaturierung der DNA-Doppelhelix im Sinne einer Aufschmelzung in zwei Einzelstränge eine Temperatur von 95° C. Im zweiten Schritt folgt die Anlagerung der Primer komplementär an die entsprechenden Sequenzen der DNA-Mutterstränge, wobei die Temperatur abgesenkt werden muss. In diesem Vorgang, der auch als Annealing bezeichnet wird, ist die erforderliche Temperatur abhängig von der Schmelztemperatur der Primer und sollte knapp darunter liegen, um eine stabile Bindung an komplementäre Sequenzen auszubilden, dagegen unbeabsichtigte weniger stabile Verbindungen an ähnliche Sequenzen zu vermeiden. Als letzter Schritt erfolgt die Einstellung der Temperatur dicht am Temperaturoptimum der DNA-Polymerase, um eine möglich suffiziente Elongation des neuen DNA-Strangs sicherzustellen.

Nach Abschluss eines solchen Zyklus folgt direkt der nächste Zyklus mit gleicher Folge aus Denaturierung, Annealing und Elongation. Im günstigsten Fall wird die vorhandene DNA-Menge im Reaktionsansatz innerhalb eines Zyklus verdoppelt, dass die amplifizierte DNA-Menge (D_1), anhängig von der ursprünglich vorhandenen Menge (D_0) und der Anzahl der durchlaufenen Zyklen (Z) ergibt als $D_1 = D_0 \times 2^Z$.

Der Fortschritt der ursprünglichen PCR ist die von Higuchi et al. (1993) entwickelte Methode der quantitativen Real-Time-PCR (RT-PCR). Hierbei wird ein fluoreszierender Farbstoff verwendet, der an den DNA-Doppelstrang bindet und in Abhängigkeit von dieser Bindung ein Signal übermittelt, welches gemessen wird und somit die vorhandene DNA quantifiziert werden kann. Der im Rahmen dieser Arbeit verwendete Farbstoff ist SYBR®GreenER™.

Das Fluoreszenzsignal wird in der Reaktion nach jedem Zyklus aufgenommen und in seinem Verlauf graphisch dargestellt, wobei die Höhe des Signals mit der jeweils vorhandenen DNA-Menge korreliert. Ein klassischer Vorgang ist in Abb. 5 demonstriert. Anfangs ist das fluoreszierende Signal noch schwach und kann vom unspezifischen „Hintergrund“ nicht abgegrenzt werden. Jedoch mit ansteigender Produktmenge wird ein bestimmter Schwellenwert der Fluoreszenz überschritten, sodass es sich von den „Hintergrundsignalen“ absetzen kann. Es erfordert eine gewisse Anzahl von Zyklen, bis dass das Signal erstmals die Hintergrundfluoreszenz überschreitet, sie werden als CT-Wert (Cycle Threshold) bezeichnet.

Das Fluoreszenzsignal nimmt zu Beginn exponentiell zu, was gleichzeitig das exponentiell stattfindende Wachstum der DNA-Menge darstellt. Zum späteren Zeitpunkt verlangsamt sich die Zunahme und sistiert am Ende sogar, was durch den Aufbrauch einer oder mehrerer Komponenten des Reaktionsansatzes wie z.B. Primer, Nukleotide etc. bedingt ist.

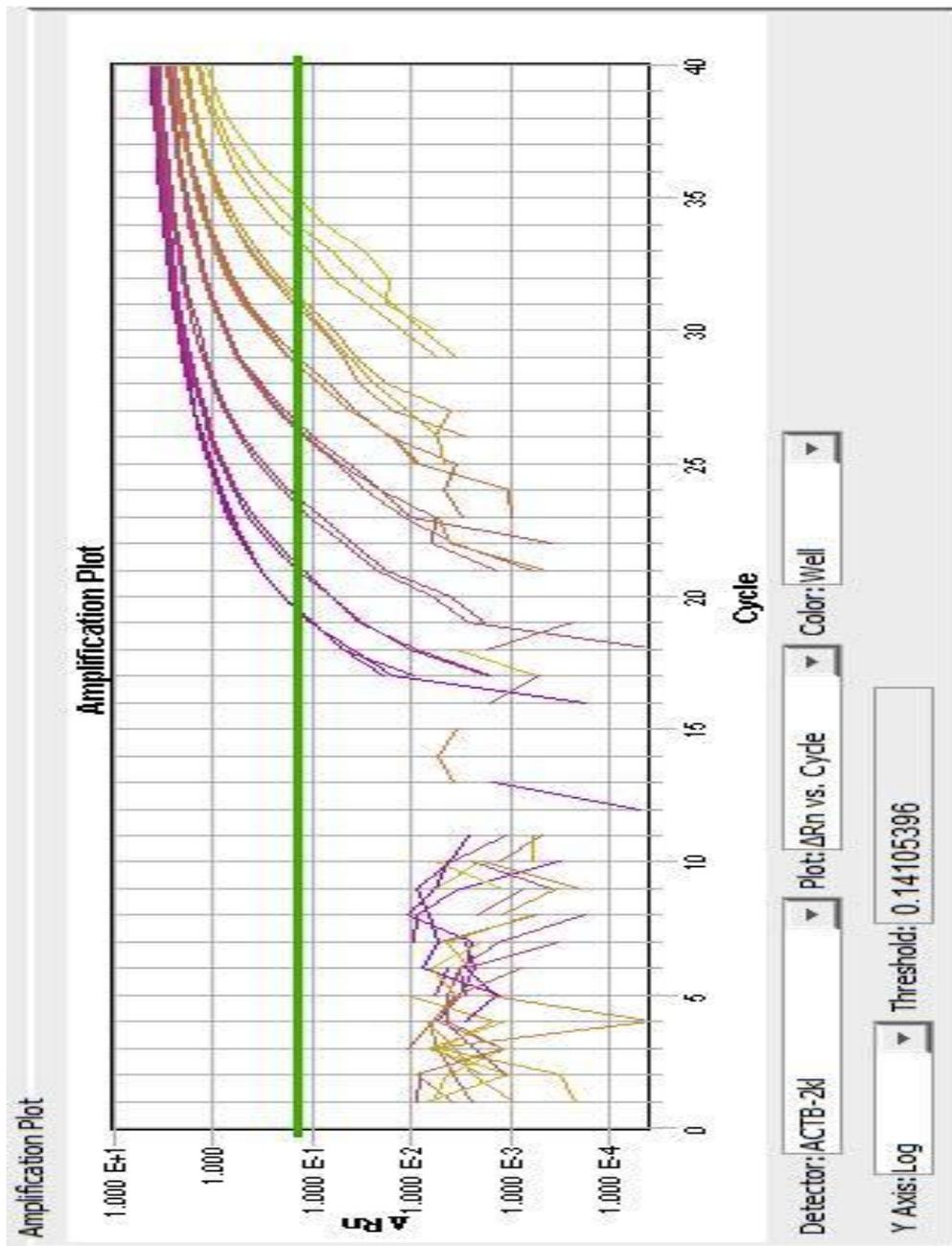


Abb. 5: PCR

Darstellung der PCR mit 7 unterschiedlicher Proben, jeweils mit Dreifachbestimmung; grüne Linie = Threshold.

Mit Hilfe der Standardverdünnungsreihe kann man die vorhandene DNA-Menge in einer Probe quantifizieren. Hierbei wird eine Probe definierter DNA-Menge in festgelegten Schritten verdünnt und im Anschluss folgt auf jede Verdünnungsstufe die Amplifikation via RT-PCR. Folgend werden die resultierenden CT-Werte der Verdünnungen gegen die jeweilig vorhandene Konzentration graphisch aufgetragen und somit wird via linearer

Regression eine Standardgerade erzeugt. Durch die Geradengleichung kann anhand des CT-Wertes die DNA-Konzentration einer zu untersuchenden Probe errechnet werden (Abb. 6)

Für das in dem vorliegenden Versuch verwendete ABI Prism 7900 HAT Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, California, USA) wird der Reaktionsansatz auf 384-Well-Platten mit jeweils einem Probenvolumen von 10 µl pro Well aufgetragen. Es erfolgt eine Dreifachbestimmung für jede Probe mit jeweils Probenmaterial eines Probanden in 3 aufeinanderfolgenden Wells. Das Reaktionsgemisch pro Well besteht aus 1 µl hergestellter Probe (wie oben aufgeführt), je 0,3 µl Lösung mit Forward und Reverse Primer, gemäß 3,3 pmol eines jeden Primers, sowie 5 µl qPCR-SuperMix und 3,4 µl PCR-Wasser. Zusätzlich zu den zu untersuchenden Proben werden auf jede Platte noch die definierten Verdünnungen zur Ermittlung der Standardgeraden und eine Positivkontrolle aus White Buffy Coat sowie eine Negativkontrolle in Form von PCR-Wasser aufgetragen. Des Weiteren wird bei Durchführung der methylierungssensitiven PCR eine Positivkontrolle mit Restriktionsenzym-behandelter methylierter CpG-DNA sowie eine Negativkontrolle in Form einer Verdünnung enzymbehandelter nicht methylierter DNA verwendet.

Der PCR-Automat wurde entsprechend des PCR-Protokolls programmiert:

- Hotstart zur Aktivierung der DNA-Polymerase: 95° C über 10 Minuten
- 40 Zyklen:
 - (1) Denaturierung bei 95° C über 15 Sekunden
 - (2) Annealing und Elongation bei 60° C über 60 Sekunden
- Schmelzkurvenanalyse

Die Schmelzkurvenanalyse stellt einen wichtigen abschließenden Punkt in diesem Vorgang dar. Eine Schwierigkeit der PCR ist die Bildung sogenannter Primer-Dimere, bei dem sich komplementäre Primerstücke aneinanderlagern. Diese Dimere werden auch vom Fluoreszenzfarbstoff als DNA-Doppelstrang verstanden und es entsteht somit ein Signal, welches das Vorhandensein eines PCR-Produktes vortäuscht. Um diese Reaktion zu erkennen ist die Schmelzkurvenanalyse von Relevanz. Hierbei wird die Temperatur im Reaktionsgemisch kontinuierlich erhöht und das dabei entstehende Fluoreszenzsignal erfasst. Mit zunehmender Temperatur nimmt das Signal langsam kontinuierlich ab, bis dass die DNA-Doppelhelix des Produktes in seine beiden

Einzelstränge zerfallen ist. Die an diesem Punkt gemessene Temperatur bezeichnet man als Schmelztemperatur, welche spezifisch für einen bestimmten DNA-Strang ist in Bezug auf Länge und Basenzusammensetzung. Nachdem die Schmelztemperatur überschritten ist und sich der Doppelstrang in zwei Einzelstränge teilt wird der Fluoreszenzfarbstoff wieder freigesetzt, wobei das Signal abrupt abnimmt. Durch den Verlauf des Fluoreszenzsignals kann somit die Schmelztemperatur ermittelt werden. Eine typische Schmelzkurve ist in Abb. 7 dargestellt. Primer-Dimere haben aufgrund ihrer geringeren Länge im Vergleich zum gewünschten PCR-Produkt einen niedrigeren Schmelzpunkt und können somit identifiziert werden.

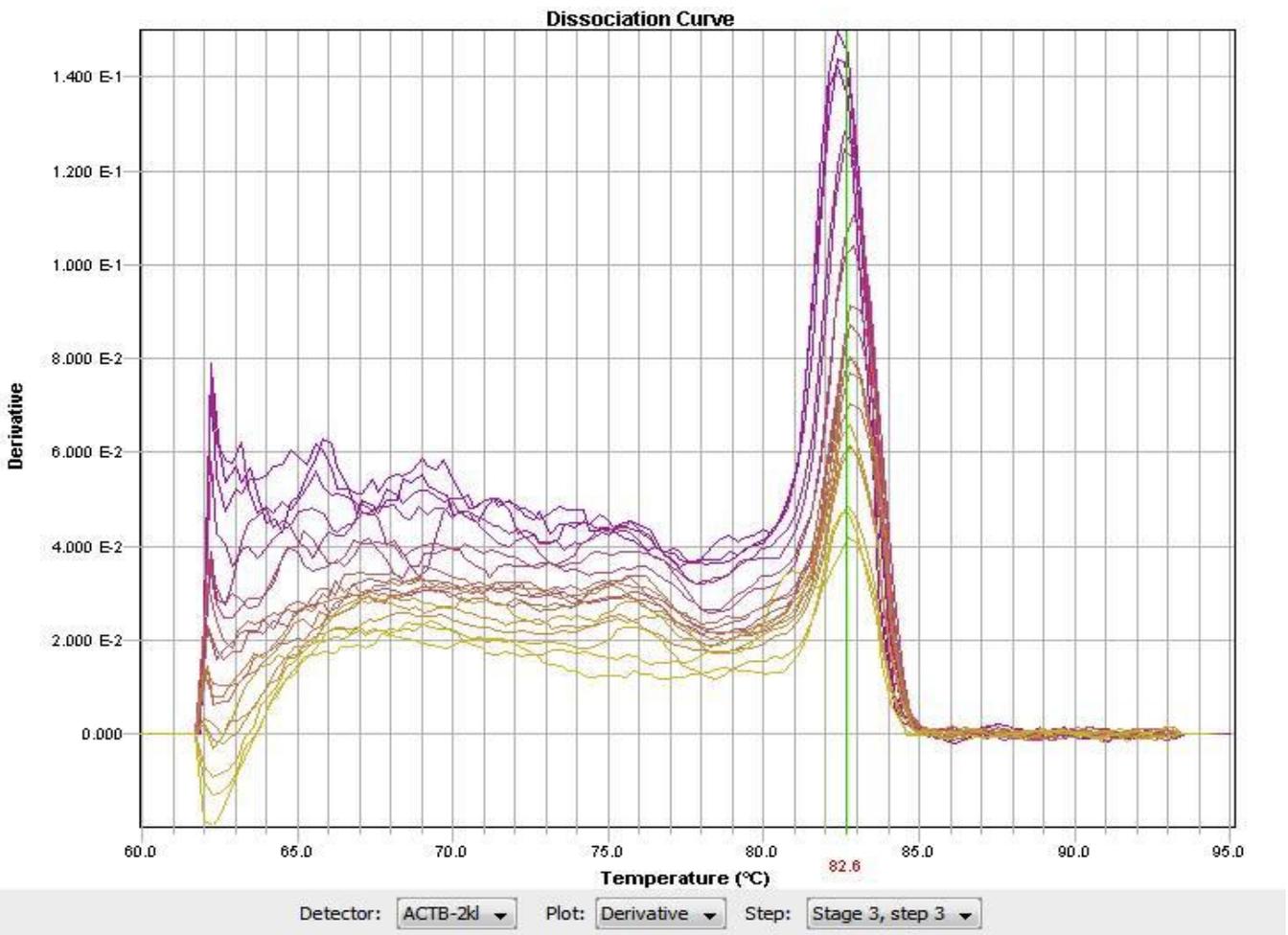


Abb. 7: Schmelzkurvenanalyse
Dargestellt sind die nahezu deckungsgleichen Schmelzkurven der 7 getrennten Bestimmungen.

2.2.6 Gelelektrophorese

Vor Beginn der eigentlichen Versuchsreihe sind beispielhaft Amplifikationen an Verdünnungen des White Buffy Coat durchgeführt worden, um die Primer auf ihre Tauglichkeit zur Amplifikation eines spezifischen Produktes zu testen. Es wird darauf geachtet, ob die jeweiligen Produkte die zu erwartende Größe aufweisen, was im positiven Fall auf das Vorhandensein des spezifischen Produktes schließen lässt. Diese Darstellung erfolgt durch die Gelelektrophorese. Zur Produktion des 1,7%igen Agarosegels werden 200 ml 1xTBE-Puffer mit 3,4 g Agarosepulver aufgeköcht und in den Gelgießstand ausgegossen. Nach Erhärten des Gels wird in die entstandenen Vertiefungen ein Gemisch aus 20 µl der gelösten PCR-Produkte mit 1 µl des Fluoreszenzfarbstoffes PicoGreen® sowie 1 µl Ladepuffer pipettiert. Gleichzeitig wird eine DNA-Leiter mit PicoGreen® und Ladepuffer zur Bestimmung der Fragmentgrößen aufgebracht. Als Negativkontrolle dient PCR-Wasser mit den gleichen Bestandteilen (PicoGreen® und Ladepuffer). Nun erfolgt die elektrophoretische Auftrennung der Substanzen bei einer Spannung von 100 Volt über einen Zeitraum von 90 Minuten. Zum Schluss wird das ermittelte Ergebnis unter UV-Licht sichtbar gemacht und zu Dokumentationszwecken fotografiert. Die Gelelektrophorese demonstriert für die hier verwendeten Primer, dass es sich um die jeweils gewünschten Produkte handelt.

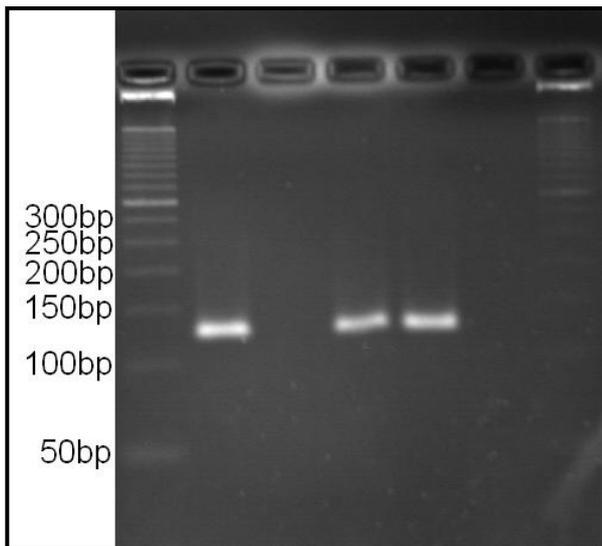


Abb. 8: Gelelektrophorese.

Beispielhafte Darstellung einer Gelelektrophorese. Hier jedoch anders als oben beschrieben nach Behandlung der Proben mit Restriktionsenzymen und darauffolgender PCR mit dem Primer von GSTP1. Durch einen Fluoreszenzfarbstoff werden die DNA-Banden sichtbar gemacht. Die Geltaschen sind von links nach rechts gefüllt gewesen mit: Lösung der Standard DNA-Leiter, Sssl-DNA, Leukozyten-DNA („Buffy Coat“), zwei Patientenproben, Negativkontrolle, Standard-DNA-Leiter. Aufgrund vorhandener Methylierungen sind die Sssl-DNA und die Patientenproben nicht enzymatisch verdaut worden und liefern somit ein Fluoreszenzsignal. Die Produktgröße stimmt mit der zu erwartenden Größe des GSTP1-Fragmentes überein (134 bp). (Zahalka, 2010)

2.2.7 Quantifizierung der zellfreien DNA und ihre Methylierung

Die Ermittlung der vorhandenen DNA-Konzentrationen in den ausgewählten Proben erfolgte im oben erläuterten Verfahren mittels der Verdünnungsreihe automatisch mit der Software SDS 2.2.

Durch das Konzentrationsverhältnis von großen (ACTB-384) und kleinen (ACTB-106) DNA-Fragmenten kann auf die DNA-Integrität der Proben geschlossen werden.

In den mit Restriktionsenzymen behandelten Proben entspricht die gemessene DNA-Konzentration quantitativ der von methylierter DNA, da unmethylierte DNA-Bruchstücke durch die Behandlung mit Restriktionsenzymen enzymatisch verdaut werden. Dies ist wichtig zur Bestimmung der Methylierungsrate. Des Weiteren ist zu beachten, dass die Konzentration der kleinen DNA-Fragmente im Serum als Maß für die zellfreie DNA als Ganzes betrachtet werden kann, da zellfreie DNA unterschiedlicher Genorte jedoch ähnlicher Größe im Serum in gleichgroßer Menge nachgewiesen werden kann (Ellinger

et al., 2008). Dies bedeutet, dass in diesem Versuch das kleine DNA-Fragment ACTB-106 die Menge der zellfreien methylierten sowie auch unmethylierten DNA darstellt, da obwohl restriktionsenzymatisch behandelt, keine Schnittstellen für die Enzyme bestehen. Mit diesem Hintergrund wird nun für jede Probe die Methylierungsrate für jeden untersuchten Genabschnitt bestimmt. Der Methylierungsgrad entspricht also dem Mengenverhältnis der methylierten DNA zur Gesamt-DNA.

2.2.8 Statistische Auswertung

Mit Hilfe der Software IBM SPSS Statistics Version 20.0 ist die statistische Versuchsauswertung durchgeführt worden, wobei $p < 0,05$ als Signifikanzniveau festgelegt worden ist. Alle statistischen Tests sind zweiseitig durchgeführt worden. Zur Feststellung signifikanter Übereinstimmungen sowie Unterschiede zwischen den Tumorpatienten und der Vergleichsgruppe aufgrund experimentell erhobener Daten dient der Mann-Whitney-Test (U-Test). Hierbei spielen die DNA-Konzentration von Groß- und Kleinfragment, die DNA-Integrität sowie die Methylierungsrate eine entscheidende Rolle. Des Weiteren betrachtet man mittels des Kruskal-Wallis-Test sowie des Mann-Whitney-Test die Korrelationen zwischen den erhobenen klinisch-pathologischen Parametern und den gemessenen DNA-Konzentrationen.

Mit Hilfe der Durchführung von Receiver-Operator-Curve-Analysen (ROC-Analysen) kann die diagnostische Wertigkeit von den ermittelten DNA-Konzentrationen und den Methylierungsgraden erfasst werden. Hierbei werden zur Unterscheidung zwischen tumorerekrankten Patienten und gesunden Probanden Cut-Off-Werte festgelegt, um die Spezifität und Sensitivität für alle Messwerte zu berechnen. Das Ganze lässt sich graphisch in ROC-Kurven darstellen, wobei die „Area under the curve“ (AUC) ein essentieller Bestandteil ist und maximal den Wert 1,0 annehmen kann. Aus der Literatur geht hervor, dass je größer die AUC ist, umso genauer ist die Wertigkeit eines diagnostischen Tests (Weiß, 2008). In der vorliegenden Arbeit wird die diagnostische Wertigkeit mittels AUC und der ermittelten Spezifität und Sensitivität beurteilt. Aus den Werten für Spezifität und Sensitivität wird jeweils die Summe gebildet und dort, wo der Wert maximal ist, wird dieser als Cut-Off-Wert verwendet.

3. Ergebnisse

3.1 Zellfreie DNA Konzentration und DNA-Integrität

Mittels quantitativer Real-Time-PCR werden die Konzentrationen kleiner DNA-Fragmente in Form von ACTB-106 mit 106 Basenpaaren und großer Fragmente in Form von ACTB-384 mit 384 Basenpaaren ermittelt.

Das Kollektiv der untersuchten Gruppe besteht aus Patienten mit nicht muskelinvasivem (NMIBC) und muskelinvasivem (MIBC) Harnblasenkarzinom, benignen urologischen Erkrankungen, gesunde Kontrollen, Patienten mit einem Blasenkarzinom in der Anamnese sowie aus Harnblasenentzündungen.

In den Untersuchungen hat sich gezeigt, dass ACTB-106 bei Patienten mit Blasenkarzinom verglichen mit den Patienten ohne Blasenkarzinom signifikant erhöht ist ($p > 0,001$; mediane Konzentration: 6,2 ng/ml vs. 3,4 ng/ml). ACTB-384 weist in den Untersuchungen keine Signifikanz auf, aber es zeigt sich jedoch ein Trend zu höheren Konzentrationen bei fortgeschrittenen Tumorstadien im Vergleich zu oberflächlichen Tumoren ($p = 0,081$; mediane Konzentration 2,0 vs. 1,6 ng/ml). Des Weiteren zeigt sich, dass die Fragmentierung der zellfreien DNA, beschrieben durch die DNA-Integrität bei den Blasenkarzinompatienten signifikant gemindert ist ($p < 0,001$; median = 0,36 vs. 0,69).

BCA vs. nicht maligne Proben (Benigne+Gesunde+BCA Anamnese+Entzündung)

ACTB-106	$p < 0,001$
ACTB-384	$p = 0,081$
Integrität	$p < 0,001$

Innerhalb des Tumorpatientenkollektivs dominiert das nicht muskelinvasive Blasenkarzinom ($n = 75$) zahlenmäßig bei niedrigerer Anzahl muskelinvasiver Karzinome ($n = 20$). Es werden dementsprechend statistische Tests zum Vergleich der Infiltrationstiefe durchgeführt. Hierbei können aber mengenmäßig keine signifikanten Unterschiede der Infiltrationstiefe in Bezug auf kleine und große DNA-Fragmente sowie der DNA-Integrität gefunden werden (ACTB-106: $p = 0,869$; ACTB-384: $p = 0,722$ und DNA-Integrität $p = 0,960$). Es zeigt sich somit, dass die Menge an zellfreier DNA ähnlich groß ist bei

Patienten mit NMIBC und MIBC. Weitere Analysen in den Subgruppen bestätigen, dass Patienten mit einem Blasenkarzinom in der Anamnese (aktuell histologisch erfolgter Ausschluss eines BCA durch Probenentnahme während einer TURB) ähnliche DNA-Levels (ACTB-106: $p=0,732$, mediane Konzentration = 6,2 ng/ml; ACTB-384: $p=0,554$, mediane Konz. = 1,8 ng/ml) sowie eine ähnliche DNA-Integrität ($p=0,710$) aufweisen wie Blasenkarzinompatienten. Des Weiteren zeigt sich, dass die DNA-Konzentrationen und die Fragmentierungsmuster von Patienten mit einer benignen urologischen Erkrankung (ACTB-106: $p=0,002$, mediane Konz. = 3,1 ng/ml; ACTB-384: $p=0,381$, mediane Konz. = 2,5 ng/ml; DNA-Integrität: $p<0,001$) und den gesunden Probanden (ACTB-106: $p<0,001$, mediane Konz. = 1,2 ng/ml; ACTB-384: $p=0,001$, mediane Konz. = 0,9 ng/ml; DNA-Integrität: $p<0,001$) im Vergleich zu den Blasenkarzinompatienten differieren. Splittet man nun die Gruppe der Blasenkarzinompatienten weiter auf in NMIBC und MIBC und vergleicht diese mit den übrigen Subgruppen des Patientenkollektivs, ergibt dies keine Änderung der Signifikanzunterschiede wie oben beschrieben. Einen Überblick geben Abb. 9 sowie Tab. 11.

Tab. 11: p-Werte von den Vergleichen in den einzelnen Subgruppen im Hinblick auf die Konzentrationen von ACTB-106, ACTB-384 sowie der DNA-Integrität

<u>NMIBC vs.</u>	MIBC	Benigne	Gesunde	BCA Anamnese	Entzündung
ACTB-106	$p=0,869$	$p=0,007$	$p<0,001$	$p=0,779$	$p=0,352$
ACTB-384	$p=0,722$	$p=0,381$	$p=0,001$	$p=0,370$	$p=0,555$
Integrität	$p=0,960$	$p<0,001$	$p<0,001$	$p=0,351$	$p=0,002$

<u>MIBC vs.</u>	NMIBC	Benigne	Gesunde	BCA Anamnese	Entzündung
ACTB-106	$p=0,869$	$p=0,028$	$p<0,001$	$p=0,986$	$p=0,349$
ACTB-384	$p=0,722$	$p=0,588$	$p=0,014$	$p=0,405$	$p=0,729$
Integrität	$p=0,960$	$p<0,001$	$p<0,001$	$p=0,457$	$p=0,016$

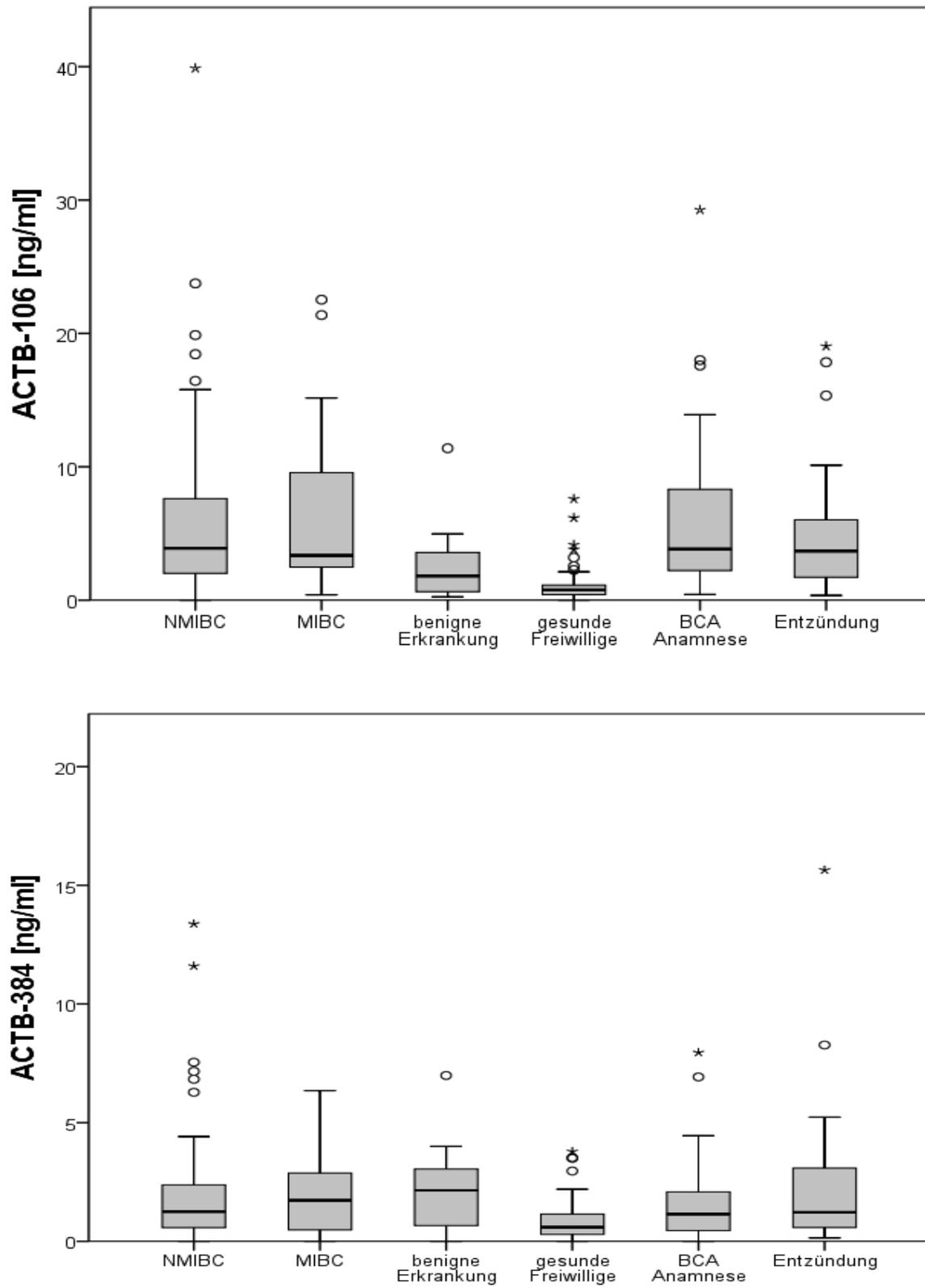


Abb. 9: Konzentration der kleinen und großen DNA-Fragmente

Die DNA-Integrität dient als Maß für die Intaktheit der DNA, durch welche Rückschlüsse auf die Herkunft der freien DNA gezogen werden können. So verursacht zum Beispiel die Apoptose überwiegend stark fragmentierte DNA und somit kleine Fragmente, während aus der Nekrose hingegen eher größere Fragmente hervorgehen.

Hierbei wird die DNA-Integrität also als Verhältnis der gemessenen Konzentrationen von großfragmentärer zu kleinfragmentärer DNA definiert. Dies bedeutet, je niedriger die Integrität ist, desto stärker fragmentiert zeigt sich die freie DNA und lässt somit eher auf Apoptose als Ursprung schließen.

Aus den Berechnungen geht hervor, dass die freie DNA der Tumorpatienten eine signifikant reduzierte Integrität aufweist im Vergleich mit den Patienten ohne Blasenkarzinom ($p < 0,001$; Median = 0,36 vs. 0,69), was somit auf einen apoptischen Ursprung schließen lässt. Aber auch hier geht aus weiteren statistischen Analysen, die Infiltrationstiefe betreffend, kein signifikanter Unterschied in der DNA-Integrität hervor.

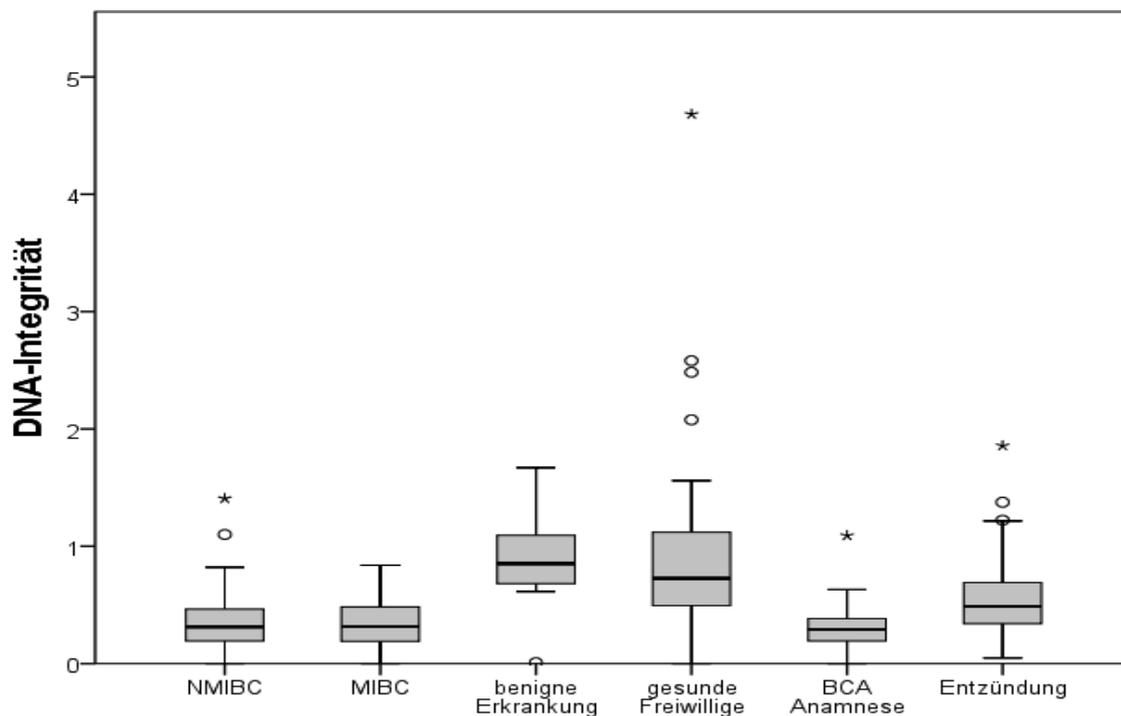


Abb. 10: DNA-Integrität

3.2 DNA-Methylierung

Im Rahmen der durchgeführten Untersuchungen werden die Promotorregionen folgender neun Gene der freien DNA auf Methylierung in den CpG-Inselbereichen betrachtet: APC, GSTP1, P14, P16, PTGS2, RAR- β , RASSF1A, TIG1 und TIMP3. Die zugehörigen Ergebnisse sind in Abb. 11 und Tab. 12 dargestellt, wobei an dieser Stelle erwähnt werden muss, dass die durchgeführte Negativkontrolle bezüglich der Methylierung sich auch als negativ erwiesen, was somit die Spezifität des Assays bestätigt.

Bei den insgesamt 95 Tumorpatienten können Methylierungen in jeweils unterschiedlicher Kombination und Häufigkeit nachgewiesen werden. Hierbei sind insgesamt alle untersuchten Genorte, jedoch in unterschiedlicher Häufigkeit, betroffen. Es fällt auf, dass sich die häufigsten Methylierungen in den Promotoren von TIMP3, RAR- β und APC befinden; mit 88 % beim NMIBC und 75 % beim MIBC für TIMP3; mit 61,4 % beim NMIBC und 45 % beim MIBC für RAR- β und mit 52 % beim NMIBC und 65 % beim MIBC für APC.

In der Gruppe der gesunden Probanden können bis auf P14 in allen Genen Methylierungen nachgewiesen werden, jedoch in deutlich niedrigerer Frequenz als in den anderen Subgruppen des Patientenkollektivs. Insbesondere zeigen sich hier deutlich weniger Methylierungen als bei den Tumorpatienten. Aber auch hier sind die häufigsten Methylierungen an TIMP3 mit 37,7 % zu finden.

Die restlichen Subgruppen des Patientenkollektivs (benigne urologische Erkrankungen, BCA in der Anamnese und Entzündung der Harnblase) zeigen wie das Blasenkarzinom auch hier den größten Methylierungsanteil in den Genorten von TIMP3 (68,8 %, 85,3 % und 69 %), RAR- β (50 %, 55,9 % und 58,6 %) und APC (56,3 %, 50 % und 51,7 %).

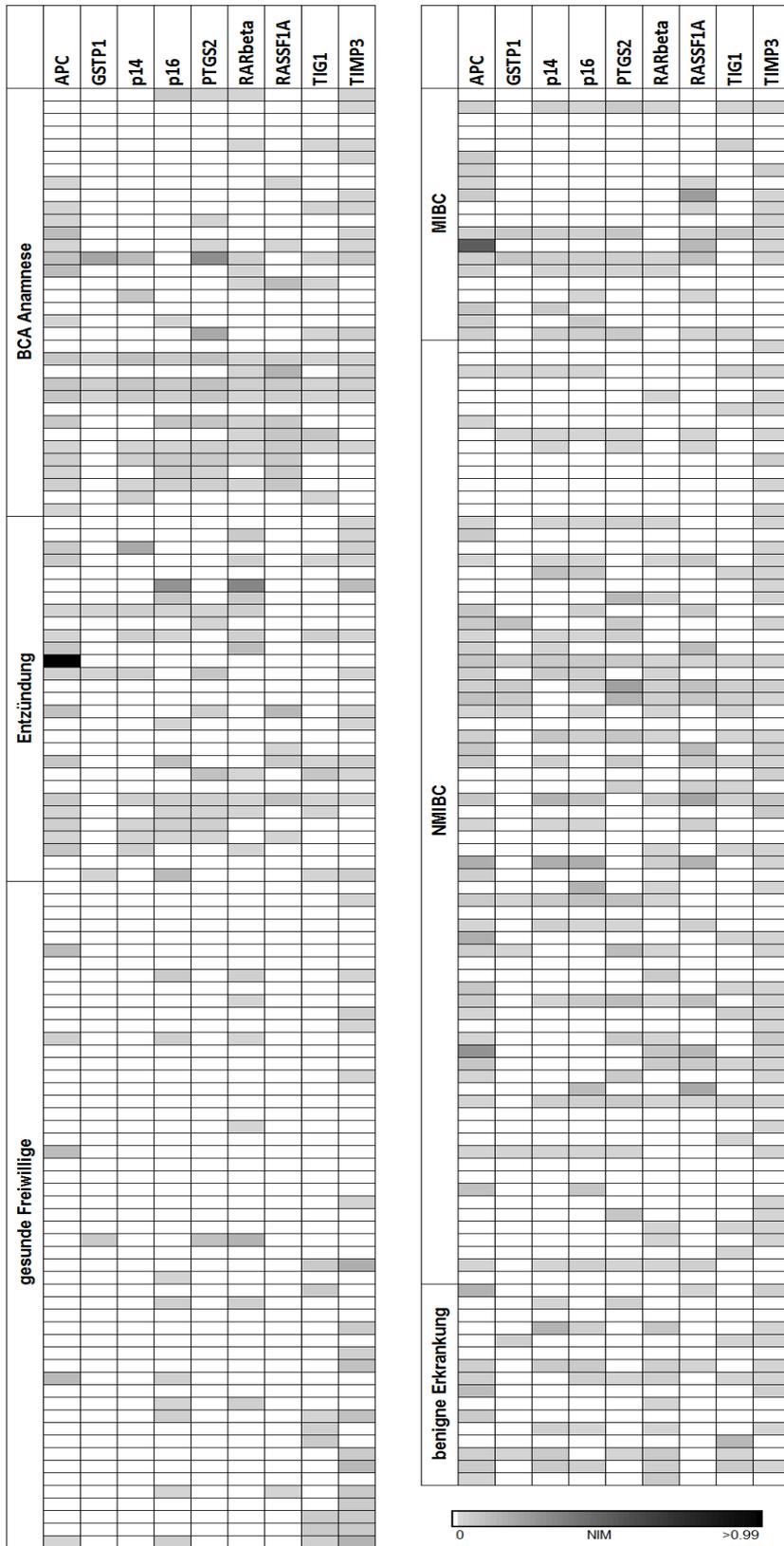


Abb. 11: Methylierungsstatus der untersuchten Genorte

Tab. 12: Methylierungspositive Fälle

	NMIBC n = 75	MIBC n = 20	Benigne n = 16	Gesunde n = 53	BCA Anamnese n = 34	Entzündung n = 29
	pos. (%)	pos. (%)	pos. (%)	pos. (%)	pos. (%)	pos. (%)
APC	52	65	56,3	9,4	50	51,7
GSTP1	18,7	20	18,8	1,9	29,4	20,7
P14	29,4	35	37,5	0	32,4	27,6
P16	34,7	35	31,3	17	32,4	38
PTGS2	32	25	31,3	1,9	38,2	31
RAR-β	61,4	45	50	13,2	55,9	58,6
RASSF1A	29,4	40	18,8	1,9	38,2	17,2
TIG1	44	40	37,5	15,1	50	27,6
TIMP3	88	75	68,8	37,7	85,3	69

Die Methylierungsrate wird für jede der untersuchten Proben berechnet, indem die gemessene Konzentration methylierter DNA eines Genortes jeweils ins Verhältnis zur gemessenen Konzentration des ähnlich großen Produktes von ACTB-106 gesetzt wird. Unter der Hypothese, dass Fragmente ähnlicher Größe jeweils in ähnlicher Konzentration im Blutserum auftreten, verkörpert ACTB-106 somit die Gesamtmenge unmethylierter und methylierter DNA des jeweilig geprüften Genortes. Dies bedeutet, dass die Methylierungsrate den Anteil an methylierter DNA an der freien Gesamt-DNA für den betrachteten Genort gibt.

Die statistische Berechnung zeigt, dass die DNA der Patienten mit NMIBC im Vergleich zu der gesunden Kontrollgruppe einen signifikanten Unterschied der Methylierungen im Bereich aller neun Genorte bietet (APC: $p < 0,001$, GSTP1: $p = 0,004$; P14: $p < 0,001$; P16: $p = 0,029$, PTGS2: $p < 0,001$; RAR-β: $p < 0,001$; RASSF1A: $p < 0,001$; TIG: $p = 0,008$ und TIMP3: $p = 0,006$).

Interessanterweise präsentieren die Berechnungen ein etwas anderes Ergebnis, wenn man die Methylierungsrate von Patienten mit MIBC verglichen mit der gesunden Kontrollgruppe betrachtet. Hier kann in nur sechs Genorten ein signifikanter Unterschied deutlich gemacht werden (APC: $p < 0,001$, GSTP1: $p = 0,007$; P14: $p < 0,001$; PTGS2:

$p=0,002$; RAR- β : $p=0,018$ und RASSF1A: $p<0,001$). Bei TIG1 ist ein ähnlicher Trend zu beobachten, der jedoch das Signifikanzniveau nicht erreicht ($p=0,063$). Bei P16 und TIMP3 können keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden ($p=0,112$ und $p=0,254$). In den anderen Subgruppen des Patientenkollektivs finden sich keine Signifikanzen im Vergleich zu NMIBC bzw. MIBC. Einen Überblick gibt Tab. 13.

Tab. 13: p-Werte von den Vergleichen in den einzelnen Subgruppen im Hinblick auf die Konzentrationen der Methylierungsratio

<u>NMIBC vs.</u>	MIBC	Benigne	Gesunde	BCA Anamnese	Entzündung
APC	$p=0,254$	$p=0,574$	$p<0,001$	$p=0,956$	$p=0,785$
GSTP1	$p=0,915$	$p=0,969$	$p=0,004$	$p=0,245$	$p=0,891$
P14	$p=0,634$	$p=0,320$	$p<0,001$	$p=0,649$	$p=0,993$
P16	$p=0,961$	$p=0,791$	$p=0,029$	$p=0,795$	$p=0,681$
PTGS2	$p=0,520$	$p=0,524$	$p<0,001$	$p=0,498$	$p=0,709$
RAR- β	$p=0,057$	$p=0,496$	$p<0,001$	$p=0,763$	$p=0,614$
RASSF1A	$p=0,445$	$p=0,235$	$p<0,001$	$p=0,410$	$p=0,203$
TIG1	$p=0,739$	$p=0,926$	$p=0,008$	$p=0,441$	$p=0,255$
TIMP3	$p=0,080$	$p=0,665$	$p=0,006$	$p=0,423$	$p=0,305$

<u>MIBC vs.</u>	NMIBC	Benigne	Gesunde	BCA Anamnese	Entzündung
APC	$p=0,254$	$p=0,780$	$p<0,001$	$p=0,234$	$p=0,498$
GSTP1	$p=0,915$	$p=0,927$	$p=0,007$	$p=0,443$	$p=0,977$
P14	$p=0,634$	$p=0,579$	$p<0,001$	$p=0,991$	$p=0,627$
P16	$p=0,961$	$p=0,955$	$p=0,112$	$p=0,940$	$p=0,778$
PTGS2	$p=0,520$	$p=0,952$	$p=0,002$	$p=0,272$	$p=0,759$
RAR- β	$p=0,057$	$p=0,138$	$p=0,018$	$p=0,136$	$p=0,075$
RASSF1A	$p=0,445$	$p=0,101$	$p<0,001$	$p=0,935$	$p=0,079$
TIG1	$p=0,739$	$p=0,828$	$p=0,063$	$p=0,381$	$p=0,558$
TIMP3	$p=0,080$	$p=0,688$	$p=0,254$	$p=0,327$	$p=0,719$

3.3 Diagnostische Aussagekraft

3.3.1 ROC-Analysen für kleine und große Fragmente sowie DNA-Integrität

Um zwischen den Tumorpatienten sowie den anderen Subgruppen des Patientenkollektivs unterscheiden zu können, müssen die Grenzwerte („Cut-Off-Werte“) mit Hilfe der ROC-Analysen berechnet werden. Diese Grenzwerte werden entsprechend der Analysen als Maximalwert der Summe aus Spezifität und Sensitivität ermittelt, also dort, wo die diagnostische Entscheidung maximal ist und somit die bestmögliche Unterscheidung im Patientenkollektiv bietet.

Für die Fragmente von ACTB-106 liegt der Cut-Off-Wert bei einer Konzentration von 1,12 ng/ml Serum. Dies bedeutet für den Test hier die höchste Sensitivität von 91,6 % und eine Spezifität von 43,2 % bei einer Fläche unter der Kurve (AUC) von 0,686.

Der Cut-Off-Wert für die Fragmente von ACTB-384 liegt bei 1,14 ng/ml Serum, wobei hier eine Sensitivität von 56,8 % und Spezifität von 58,3 % resultiert. Die AUC nimmt hier mit 0,568 einen niedrigeren Wert ein.

Die DNA-Integrität hat eine diagnostische Sensitivität von 59,8 % bei einer hohen Spezifität von 75,8 %, hier liegt der Cut-Off-Wert bei 0,476. Die Integrität erreicht hier die größte Fläche unter der Kurve mit 0,719.

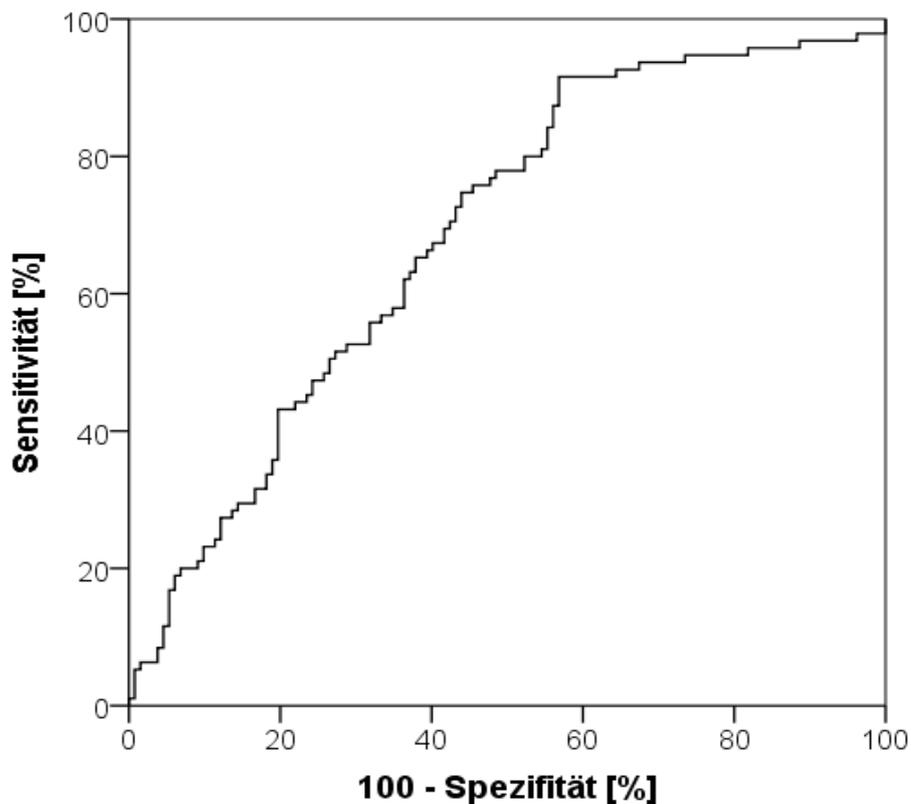
Also bietet die Betrachtung der DNA-Integrität die im Vergleich höchste AUC und somit höchste Testgenauigkeit sowie auch die höchste Spezifität mit 75,8 % in der Diagnose des Harnblasenkarzinoms. Die höchste Sensitivität erreichen bei Betrachtung die Fragmente von ACTB-106 mit 91,6 % bei vergleichsweise mittlerer AUC von 0,686.

Zusammenfassend erlauben Fragmente von ACTB-106 und die DNA-Integrität eine Abgrenzung von Patienten mit Blasenkarzinom und ohne Blasenkarzinom (inklusive Patienten mit benignen urologischen Erkrankungen und gesunden Proben). ACTB-384-Fragmente erbringen keine brauchbare Information. Einen Überblick bietet die Tab. 14 sowie die Abb. 12.

Tab. 14: ROC-Analysen

Werte zu den in Abbildung 12-14 dargestellten ROC-Kurven

	Cut-Off-Wert	Sensitivität [%]	Spezifität [%]	AUC	95%-KI
ACTB-106	1,12 ng/ml	91,6	43,2	0,686	0,617-0,755
ACTB-384	1,14 ng/ml	56,8	58,3	0,568	0,492-0,644
Integrität	0,476	59,8	75,8	0,719	0,653-0,784

**Abb. 12:** ROC-Kurven: Darstellung der ROC-Analyse für ACTB-106

Die ROC-Analyse zeigt für ACTB-106 eine Sensitivität von 91,6 % und eine Spezifität von 43,2 % bei einer Area under the curve von 0,686.

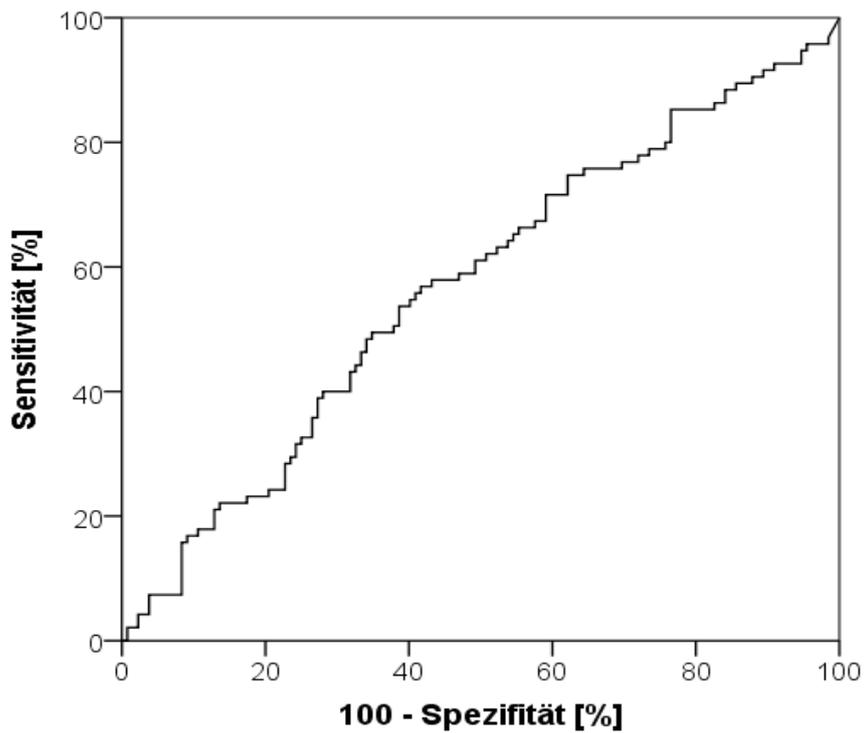


Abb. 13: ROC-Kurven: Darstellung der ROC-Analyse für ACTB-384

Die ROC-Analyse zeigt für ACTB-384 eine Sensitivität von 56,8 % und eine Spezifität von 58,3 % bei einer Area under the curve von 0,568.

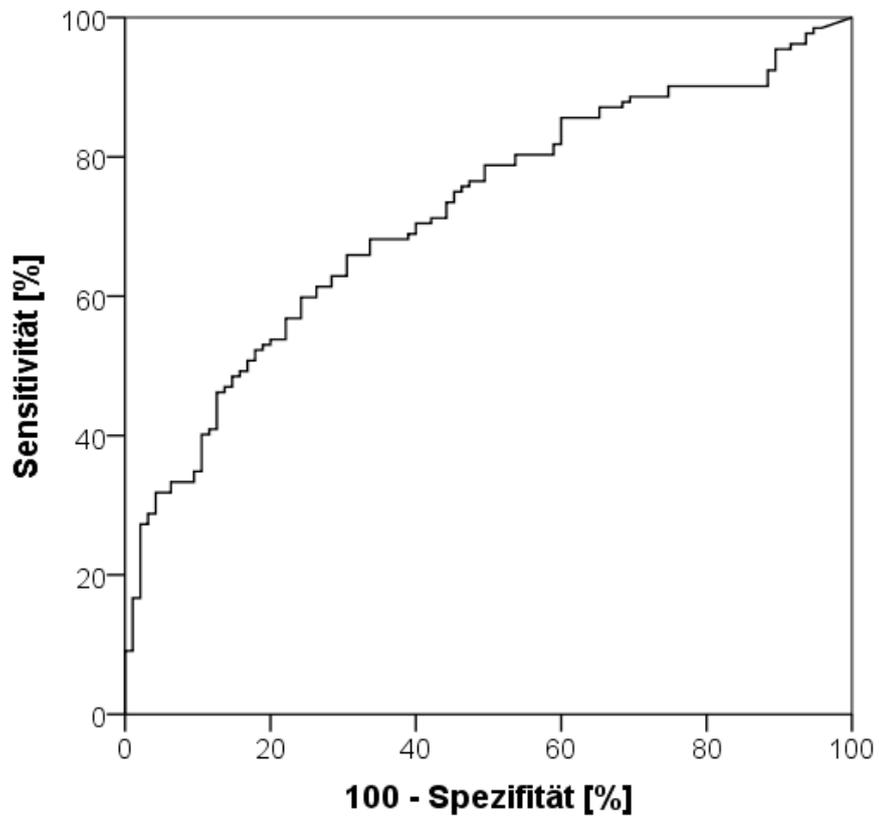


Abb. 14: ROC-Kurven: Darstellung der ROC-Analyse für die DNA-Integrität
Die ROC-Analyse zeigt für die DNA-Integrität eine Sensitivität von 59,8 % und eine Spezifität von 75,8 % bei einer Area under the curve von 0,719.

3.3.2 ROC-Analysen der Methylierungslevel aller untersuchten Gene

Des Weiteren werden in der vorliegenden Arbeit die ermittelten Methylierungslevel auf ihre diagnostische Wertigkeit untersucht. Hierbei resultiert, dass nur die Genorte APC und RASSF1A einen signifikanten Unterschied zwischen Patienten mit Blasenkarzinom und den Patienten ohne Blasenkarzinom ergeben. Die beiden Genloki zeigen eine hohe Spezifität mit 65,2 % für APC und 87,1 % für RASSF1A, was die Unterscheidung zwischen Tumorpatienten und den nicht malignen Proben angeht. Im Gegensatz dazu ist die Sensitivität mit 54,7 % für APC und 28,4 % eher mittel- bis niedrig veranschlagt. Die Fläche unter der Kurve (AUC) ist bei beiden Genorten mit 0,58 für APC und 0,57 für RASSF1A fast identisch. Interessanterweise ergibt sich aus der Summe aller Genorte (m-Score) noch eine hohe diagnostische Signifikanz ($p < 0,001$). Hierbei erreicht die Spezifität ebenfalls einen hohen Wert mit 73 %. Die Sensitivität befindet sich im mittleren Bereich mit 46,3 %. Die AUC hat in der Summe aller Genorte auch ihre größte Fläche mit 0,64 und somit die höchste Testgenauigkeit (Tab. 15, Abb. 15-17).

Tab. 15: ROC-Analysen der Methylierungslevel

*m-Summe= Methylierungslevels für die Summe aller betrachteten Genorte

	Cut-Off-Wert [ng/ml]	Sensitivität [%]	Spezifität [%]	AUC	95%-KI	p-Wert
APC	0,0038	54,7	65,2	0,589	0,51-0,66	p=0,023
GSTT1	0,2248	12,6	93,2	0,520	0,44-0,59	p=0,606
P14	0,0339	30,5	81,1	0,551	0,47-0,62	p=0,190
P16	0,1014	34,7	73,5	0,536	0,45-0,61	p=0,361
PTGS2	0,3370	27,4	84,8	0,552	0,47-0,62	p=0,182
RAR-β	0,0187	57,9	61,4	0,557	0,48-0,63	p=0,145
RASSF1A	0,2551	28,4	87,1	0,579	0,50-0,65	p=0,044
TIG1	0,0143	43,2	70,5	0,545	0,46-0,62	p=0,250
TIMP3	0,0539	84,2	41,7	0,569	0,49-0,64	p=0,780
m-Summe*	3,5	46,3	73,5	0,640	0,56-0,71	p<0,001

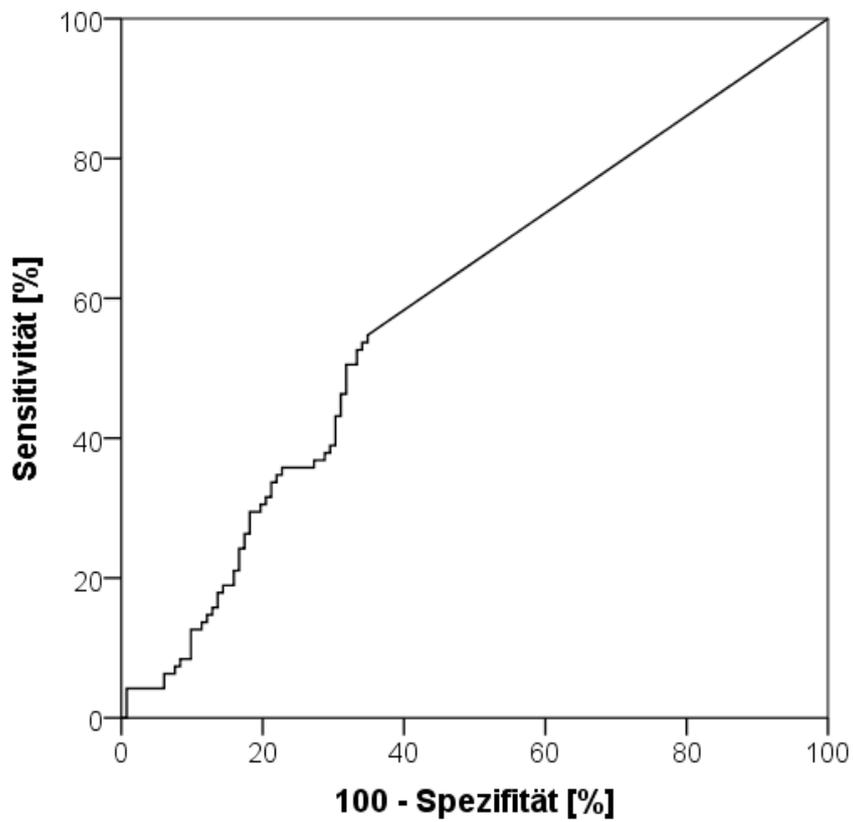


Abb. 15: ROC-Kurve des Methylierungslevels für APC
Die ROC-Analyse zeigt für APC eine Sensitivität von 54,7 % und eine Spezifität von 65,2 % bei einer Area under the curve von 0,589.

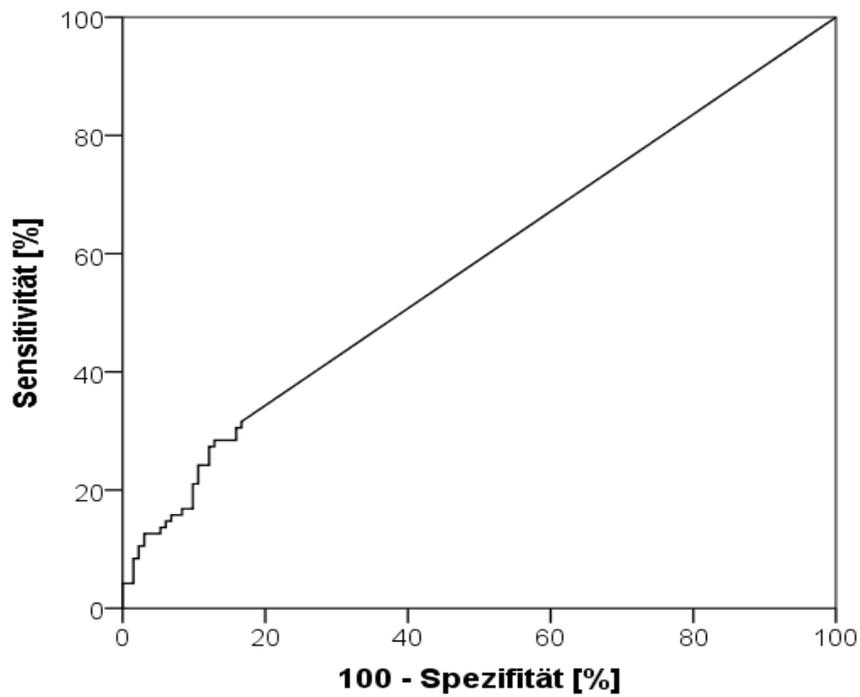


Abb. 16: ROC-Kurve des Methylierungslevels für RASSF1A

Die ROC-Analyse zeigt für RASSF1A eine Sensitivität von 28,4 % und eine Spezifität von 87,1 % bei einer Area under the curve von 0,579.

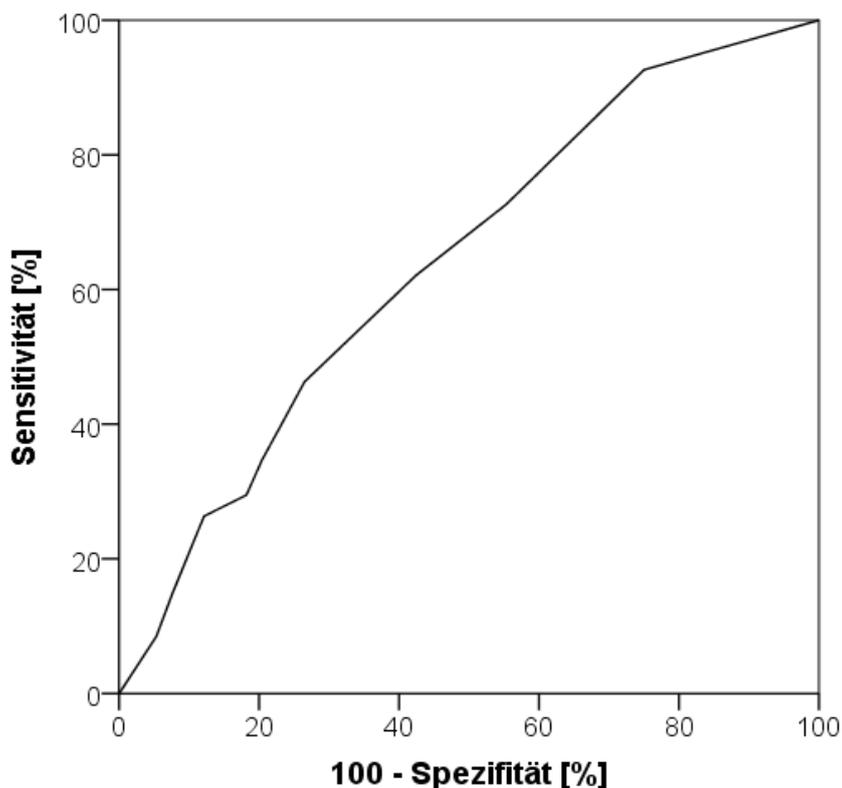


Abb. 17: ROC-Kurve des Methylierungslevels für die Summe aller betrachteten Genorte (m-score)

Die ROC-Analyse zeigt für die Summe aller betrachteten Genorte (m-score) eine Sensitivität von 46,3 % und eine Spezifität von 73,5 % bei einer Area under the curve von 0,640.

3.3.3 Korrelation der frei zirkulierenden DNA-Menge mit klinisch-pathologischen Parametern

Die in die Untersuchung einbezogenen klinisch-pathologischen Parameter sind Alter und Geschlecht der Patienten/ Probanden, die Frage nach dem Raucherstatus, das Tumorstadium nach TNM-System mit Lymphknotenbefall, sowie der Differenzierungsgrad des Tumors und die Frage nach der Infiltrationstiefe des Tumors.

Zunächst wird mit Unterstützung der statistischen Tests geprüft, ob eine Beziehung zwischen den erhobenen klinisch-pathologischen Parametern und den gemessenen DNA-Konzentrationen bzw. der DNA-Integrität festzustellen ist. Es kann kein Zusammenhang zwischen dem Geschlecht und der gemessenen DNA-Konzentration

festgestellt werden. Des Weiteren besteht ebenso keine Korrelation zwischen dem Grading, den pT- und Lymphknoten-Stadien sowie dem Raucherstatus und den gemessenen DNA-Konzentrationen bzw. der Integrität, denn in allen Fällen ist der p-Wert $>0,05$.

Die Betrachtung von muskelinvasivem ($n=75$) und nicht muskelinvasivem ($n=20$) Blasenkarzinom erbringt keinen signifikanten Unterschied in Bezug auf DNA-Konzentration und Integrität. In diesen Fällen sind die p-Werte ebenfalls über $0,05$.

3.3.4 Korrelation der Methylierungslevel mit klinisch-pathologischen Parametern

Des Weiteren wird dem Vorgehen unter 3.3.3 entsprechend untersucht, ob ein Zusammenhang zwischen den klinisch-pathologischen Parametern und dem jeweils gemessenen Methylierungslevel der untersuchten Genorte besteht. Ein Zusammenhang kann für keines der betrachteten Merkmale festgestellt werden, weder für die pT- und Lymphknotenstadien noch für das Grading. Hier liegt der p-Wert weit vom Signifikanzniveau entfernt ($p>0,05$).

4. Diskussion

Das Vorkommen von freier DNA im menschlichen Blutserum ist seit 1948 bekannt. Zahlreiche Untersuchungen zu dem Thema konnten seitdem beweisen, dass bei Patienten mit unterschiedlichen malignen Erkrankungen eine signifikante Erhöhung der Konzentration an zellfreier DNA im Vergleich zur Normalbevölkerung zu vermerken war (Anker et al., 1999). Um die Hypothese, dass zellfreie DNA als diagnostischer Marker bei Tumorerkrankungen verwendet werden kann, zu bestätigen, wurden in weiterführenden Arbeiten genetische sowie epigenetische Abweichungen von Abschnitten der freien DNA bei unterschiedlichen Tumorentitäten untersucht. Ein besonderer Fokus ist dieser Ansatz bei Tumorerkrankungen, für die sich noch kein im Blut detektierbarer Tumormarker als „Frühwarnsystem“ etablieren konnte und deren Diagnostik mit der Durchführung invasiver und aufwendiger Maßnahmen verbunden ist. Eine systematische Quantifizierung frei zirkulierender DNA im Blutserum existiert in einer Arbeit mit einer geringen Fallzahl (n=45) bei fortgeschrittenen Blasenkarzinomen, wo als einzige therapeutische Option nur die Zystektomie kurativ zur Verfügung stand (Ellinger et al., 2008). Eine systematische Quantifizierung zellfreier DNA im Serum inklusive Analyse des Methylierungsstatus und Evaluation der diagnostischen Potenz blieb in der international publizierten wissenschaftlichen Literatur bei Patienten mit einem NMIBC bislang aus.

Eine häufige und derzeit im Mittelpunkt stehende epigenetische Veränderung der DNA von Tumorpatienten ist das Vorkommen von Promotor-Hypermethylierungen in den frei zirkulierenden Genabschnitten und konnte sowohl im Tumorgewebe als auch im Urin und Serum von Blasenkarzinompatienten nachgewiesen werden (Dulaimi et al., 2004, Hoque et al., 2006, Maruyama et al., 2001). Es stellte sich jedoch heraus, dass der Nachweis tumorspezifischer DNA im Urin nicht zwingend das Vorhandensein eines Urothelkarzinoms bedingt, da diese auch im Urin von Nierenzellkarzinom-, Prostatakarzinom- und Pankreaskarzinompatienten nachgewiesen werden konnte (Botezatu et al., 2000, Hoque et al., 2006).

Die Zielsetzung dieser Arbeit ist es, freie DNA bei Blasenkarzinompatienten in der Funktion als Biomarker zu analysieren, einerseits durch Bestimmung absoluter DNA-

Konzentrationen im Blutserum sowie Analyse der Fragmentgrößen (als Hinweis auf die mögliche Herkunft der DNA) und andererseits durch die Untersuchung auf Promotor-hypermethylierungen von neun ausgewählten Genorten. Es handelt sich hierbei um die Genorte APC, GSTP1, P14, P16, PTGS2, RAR- β , RASSF1A, TIG1 und TIMP3.

4.1 Ursprung der zellfreien DNA im Serum

In dieser Studie konnte gezeigt werden, dass die zellfreie DNA bei Tumorpatienten eine verminderte DNA-Integrität hatte. Während DNA nekrotischer Zellen hochmolekular ist, d.h. mehrere Kilobasen lang ist, ist die DNA aus apoptotischen Zellen in der Regel stark fragmentiert. Daher deutet die Fragmentierung der zellfreien DNA auf einen Ursprung aus apoptotischen Zellen hin. Ferner konnte gezeigt werden, dass tumorspezifische DNA, also DNA mit Nachweis einer Promotorhypermethylierung, nur einen sehr geringen Anteil der zellfreien DNA ausmacht. Daher ist davon auszugehen, dass die zellfreie DNA zu überwiegendem Teil aus gesunden Zellen abstammt. Ähnliche Beobachtungen wurden auch in Studien zum Prostatakarzinom (Chun et al., 2006, Ellinger et al., 2008), Nierenzellkarzinom (Hauser et al., 2010), Hodenkarzinom (Ellinger et al., 2009), Kolonkarzinom (Umetani et al., 2006 b), Ovarialkarzinom (Chang et al., 2002), Mamma-karzinom (Umetani et al., 2006 a und b) und Lungenkarzinom (Gautschi et al., 2004) gemacht. Die Mechanismen zur Entstehung der freien DNA scheinen sich bei anderen Tumoren zu unterscheiden: so wurde zum Beispiel für das Nierenzellkarzinom eine erhöhte DNA-Integrität nachgewiesen, was eher auf einen nekrotischen Ursprung der freien DNA schließen lässt. Dies macht deutlich, dass die DNA-Integrität von weiteren Einflussfaktoren abhängig zu sein scheint und auf unterschiedliche pathophysiologische Prozesse in den einzelnen Tumorentitäten zurückzuführen sein muss. (Ellinger et al., 2008, Jahr et al., 2001) Der Mechanismus, der zur Apoptose von gesunden Zellen führt, welcher dann einen Anstieg der zellfreien DNA im Serum bedingt, ist derzeit ungeklärt. Eine Erklärung bietet die vermehrte Freisetzung proapoptotischer Zytokine aus den Tumorzellen selbst, welche dann zum Zelltod von umgebenden gesunden Zellen führt. Dies scheint auch den geringen Anteil an methylierter freier DNA zu begründen. Für das Harnblasenkarzinom konnte zum Beispiel eine vermehrte Sekretion von Fas-Ligand

durch Tumorzellen gezeigt werden (Lee et al., 1999), was auch zu einer erhöhten Fas-Ligand Konzentration im Blut führt (Mizutani et al., 2001).

4.2 Diagnostische Bedeutung der zellfreien DNA im Serum

In der vorliegenden Arbeit zeigte sich, dass im Serum von Patienten mit einem NMIBC und MIBC erhöhte Konzentrationen zellfreier DNA (ACTB-106 und ACTB-384) im Vergleich zu Gesunden bestehen. Im Vergleich zu Patienten mit benignen urologischen Erkrankungen bestehen ferner erhöhte Konzentrationen kleinfragmentärer DNA. Im Gegensatz dazu ist die Konzentration der zellfreien DNA bei Patienten mit einem BCA und Patienten mit einem BCA in der Vorgeschichte bzw. einer entzündlichen Veränderung in der Harnblasenbiopsie nicht unterschiedlich (siehe Tab. 11, Abb. 9 und Abb. 10). Im Rahmen von ROC-Analysen wurde die diagnostische Aussagekraft der einzelnen Parameter berechnet. Es konnte gezeigt werden, dass eine Unterscheidung von Patienten mit einem BCA und ohne Malignom mit einer Sensitivität von 91,6 % und einer Spezifität von 43,2 % (AUC 0,686) aufgrund der erhöhten Konzentration der zellfreien DNA (ACTB-106) möglich ist. Die Analyse der DNA-Integrität ist sogar noch mit höherer Genauigkeit bei einer Sensitivität von 59,8 % und einer Spezifität von 75,8 % (AUC 0,719) möglich. In der Literatur konnte für das Harnblasenkarzinom gezeigt werden, dass Patienten mit einem MIBC eine höhere Konzentration zellfreier Serum-DNA haben als Patienten mit einer BPH (Sensitivität 96 %, Spezifität 62 %) (Ellinger et al., 2008). Der dort fehlende Einschluss von Kontroll-Patienten mit BCA in der Vorgeschichte könnte eine mögliche Ursache für die geringere diagnostische Genauigkeit in der vorliegenden Studie sein. Die Anwendung von zellfreier DNA als diagnostischer Marker für das Blasenkarzinom muss aufgrund der o.g. Befunde zumindest für Patienten mit entzündlichen Veränderungen oder bei bekanntem BCA in der Anamnese kritisch beurteilt werden. Weitere, größere Studien sind notwendig um die Befunde zu stützen. Interessanterweise konnte in einer Studie über die mitochondriale DNA gezeigt werden, dass der Gehalt an freier mitochondrialer DNA im Serum von Karzinompatienten einen Unterschied im Vergleich zu den gesunden Kontrollen bot mit einer Sensitivität von 84,3 % und einer Spezifität von 97,5 % (AUC 0,944), wobei das Blasenkarzinom den höchsten Gehalt an mitochondrialer DNA

aufweist im Gegensatz zum Prostata- und Nierenzellkarzinom. Des Weiteren zeigt sich dort auch bemerkenswerterweise beim NMIBC und MIBC ein annähernd gleicher Wert, sodass hier die mitochondriale DNA als früher diagnostischer Marker eine Rolle spielen könnte im Vergleich zur Prognose (Ellinger et al., 2012).

Ein ähnlicher Befund ergibt sich in der vorliegenden Studie für die DNA-Methylierung: es konnte zwar in einzelnen Serum Proben von Gesunden auch methylierte DNA nachgewiesen werden, allerdings war die Methylierungsrate für APC, GSTP1, P14, P16, PTGS2, RAR- β , RASSF1A, TIG1 und TIMP3 signifikant niedriger als bei BCA Patienten. Interessanterweise konnte kein Unterschied im Methylierungsmuster zwischen BCA Patienten, Patienten mit entzündlichen Veränderungen und Patienten mit einem BCA in der Anamnese festgestellt werden (siehe Tab. 12, Tab. 13, und Abb. 11). Für den Vergleich von BCA Patienten mit Patienten ohne Karzinom konnte gezeigt werden, dass sowohl APC (Sensitivität 54,7 %, Spezifität 65,2 %, AUC 0,589), RASSF1A (Sensitivität 28,4 %, Spezifität 87,1 %, AUC 0,579) als auch die M-Summe (Sensitivität 46,3 %, Spezifität 73,5 %, AUC 0,640) eine signifikante Unterscheidung erlaubten. Ähnlich wie für die Konzentration der zellfreien DNA als auch die DNA Integrität muss angemerkt werden, dass die Unterscheidung insbesondere der differentialdiagnostisch wichtigen Patienten mit entzündlichen Veränderungen in der Harnblase bzw. einem BCA in der Eigenanamnese nicht möglich ist. Im Gegensatz dazu konnte in einer anderen Arbeit zu Patienten mit einem MIBC eine sehr gute Unterscheidung von Patienten mit einer BPH bei Methylierung von „APC, GSTP1 oder TIG1“ (Sensitivität 80 %, Spezifität 93 %) (Ellinger et al., 2008) gezeigt werden. Allerdings muss als klare Einschränkung dieser Studie auch angemerkt werden, dass Patienten mit relevanten Differenzialdiagnosen nicht eingeschlossen wurden, und dass auch die kleine Fallzahl eine mögliche Verzerrung der Ergebnisse bewirkt hat.

Zwar wurde in der vorliegenden Arbeit kein Vergleich mit etablierten Markersystemen für das Harnblasenkarzinom durchgeführt, jedoch zeigt sich in der Literatur auch kein zuverlässiges System, oft mit falsch positiven Werten und in Abhängigkeit vom klinischen Setting des Patienten mit Screening, Erstdiagnose und Follow up. (Babjuk et al., EAU-Guidelines 2013) Im Vergleich zur Literatur ist die Bedeutung der zellfreien DNA hier als ein Marker zu sehen, der sowohl eine hohe Sensitivität in Kombination mit

hohen Spezifität aufweist und über das Serum detektiert wird und somit nicht Schwankungen unterlegen ist, wie sie bei der Urinzytologie bestehen.

4.3 Prognostische Bedeutung der zellfreien DNA im Serum

In der vorliegenden Arbeit konnte keine Korrelation der zellfreien DNA Konzentration, der DNA-Fragmentierung oder dem Nachweis methylierter DNA mit etablierten Prognose-Parametern (Grading, TNM-Stage) festgestellt werden. Im Gegensatz dazu konnte in anderen Studien eine Korrelation der Hypermethylierung von einzelnen oder mehreren in Kombination betrachteten Genorte oberhalb des Signifikanzniveaus mit klinisch-pathologischen Parametern wie pT-Stadium, Multifokalität sowie der Präsenz positiver Schnittränder festgestellt werden (Ellinger et al., 2008). Mögliche Ursachen für diese Unterschiede sind die unterschiedlich weit fortgeschrittenen Tumorstadien der untersuchten Patienten. Während in der vorherigen Studie ausschließlich die Seren von Patienten mit einem invasiven Blasenkarzinom untersucht wurden, welches insoweit fortgeschritten war, dass die Patienten sich einer radikalen Zystektomie unterziehen mussten, wurde in der vorliegenden Studie der Fokus auf ein möglichst frühes Tumorstadium gelegt.

In Relation vom Tumorstadium haben sich beim Blasenkarzinom unterschiedliche Therapiekonzepte etabliert. Deshalb könnte ein möglichst frühzeitiges Wissen über die Infiltrationstiefe des Tumors noch vor Therapiebeginn einen entscheidenden Vorteil bezüglich Langzeitprognose zugunsten der Patienten bieten. Die jedoch in der hiesigen Studie erhobenen Daten zeigen, dass eben diese vorbeschriebene Korrelation von methylierter DNA mit etablierten Prognose-Parametern (Grading, TNM-Stage) hier nur eine untergeordnete Rolle spielt und nicht zur frühzeitigen prognostischen Bedeutung beiträgt.

4.4 Limitationen

Diagnose und Therapie maligner Erkrankungen können durch standardisierte Screeningmethoden und klinische Verlaufskontrollen vereinfacht und optimiert werden. Eine essentielle Rolle wird dabei organ- und tumorspezifischen Markern zuteil. Ziel ist es, einen Marker zu detektieren, der aus leicht zu gewinnenden Körperflüssigkeiten wie

Blut und Urin kostengünstig und mit hoher Spezifität und Sensitivität nachgewiesen werden kann. Die Methode der vorliegenden Studie bietet gute Voraussetzungen um diesen Anforderungen nachzukommen. Aber die diagnostische Relevanz der zellfreien DNA wird durch fehlende Follow-Up Daten zu den Patienten limitiert, insbesondere auch zu den Patienten, die ein Blasenkarzinom in der Anamnese hatten, jedoch aktuell ohne Tumornachweis blieben. Die aktuellen Daten zeigen, dass genau diese Patienten keinen Unterschied bezüglich der Menge der zellfreien DNA im Serum im Vergleich zu den Blasenkarzinom-Patienten mit aktuellem Tumornachweis aufweisen. Die Frage nach einem Rezidiv zu einem späteren Zeitpunkt bei diesen Patienten bleibt offen und somit ob die zellfreie DNA dies als Frühmarker angedeutet hätte.

Als weitere Limitation in der diagnostischen Wertigkeit der Ergebnisse können falsch-positive Werte darstellen. Die Enzymbehandlung zur Analyse des Methylierungsstatus der zellfreien DNA ist sehr abhängig von intakter DNA. So könnte eine Fragmentierung als Ursache für unzureichenden DNA-Verdau gelten, was sich dann als falsch-positives Signal in der PCR widerspiegeln könnte.

Des Weiteren können potentiell Variationen in der Aufreinigung bei der Isolation der zellfreien DNA auftreten. In einer weiteren Studie konnte diesbezüglich bei Isolation von Micro-RNA gezeigt werden, dass die RNA-Isolation über eine Silikon-Säule mit einer hohen Variation der Wiederfindung (0-50 %, im Mittel ca. 10 %) einhergeht. (Mahn et al., 2011, Wulfken et al., 2011) So kann eine fehlende Reproduzierbarkeit der Methode möglicherweise auch als Ursache für so manche Diskrepanz in der Literatur gesehen werden. Dazu sei aber angemerkt, dass hier eine Hinzugabe von artifizieller DNA am Beginn der DNA Isolation nicht möglich ist, weil diese von den Enzymen sofort verdaut werden würde. (Mahn et al., 2011, Wulfken et al., 2011) An dieser Stelle ist unbedingt die DNA-Integrität zu beachten, weil sie ein stabiler Faktor gegen die Wiederfindung darstellt und somit einen validen Wert bildet.

Zum Schluss sei noch darauf hingewiesen, dass in der vorliegenden Studie Daten zur Urinzytologie als vergleichende Parameter fehlen. Letztendlich zeigen aber die EAU-Guidelines, dass die Urinzytologie insbesondere bei low-grade Karzinomen nicht hilfreich ist und kein repräsentatives Ergebnis bietet. (Babjuk et al., EAU-Guidelines 2013)

5. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden frei zirkulierende DNA-Fragmente mit ihrer Fragmentgröße und ihrem Methylierungsmuster im Serum von Patienten mit Blasenkarzinom bestimmt, um ihre Eigenschaft als potentieller Biomarker in der Diagnostik, Prognose und Therapie Monitoring des Blasenkarzinoms zu analysieren. Diesbezüglich wurde die zellfreie DNA aus Serumproben von insgesamt 227 Patienten gesammelt. Von diesen Patienten unterzogen sich 132 einer transurethralen Resektion der Blase mit Nachweis eines histologisch gesicherten Blasenkarzinoms in 84 Fällen, weitere 11 Patienten unterzogen sich einer radikalen Zystektomie. Des Weiteren gehören zu dem Patientenkollektiv 31 Patienten mit einer benignen urologischen Erkrankung in Form von benigner Prostatahyperplasie und Harnblaseninkontinenz, wobei ein Blasenkarzinom zystoskopisch ausgeschlossen wurde sowie den 53 gesunden Probanden als Kontrollgruppe.

Vorherige Studien zeigten, dass durch Fragmentierungsmuster eine Differenzierung von Karzinompatienten und Gesunden möglich ist und außerdem einen Rückschluss bezüglich ihrer Genese zulassen (Apoptose <200bp und Nekrose >200bp). Diesbezüglich konnte in der vorliegenden Studie mittels quantitativer RT-PCR die Menge an frei zirkulierender kleiner (ACTB-106, 106 bp) und großer (ACTB-384, 384 bp) DNA-Fragmente ermittelt werden. Aus dem Verhältnis von großen und kleinen DNA-Fragmenten wurde die Integrität der freien DNA berechnet. Es zeigte sich, dass ACTB-106 bei Patienten mit Blasenkarzinom verglichen mit den Patienten ohne Blasenkarzinom signifikant erhöht ist ($p > 0,001$), während ACTB-384 in den Untersuchungen keine Signifikanz aufweist ($p = 0,081$). Aus den Berechnungen bezüglich der DNA-Integrität geht hervor, dass die freie DNA der Tumorpatienten eine signifikant geminderte Integrität aufweist im Vergleich mit den Patienten ohne Blasenkarzinom ($p < 0,001$), was somit auf einen apoptotischen Ursprung der DNA schließen lässt.

Um die diagnostische Information festzulegen zeigte sich in den ROC-Analysen, dass ACTB-106 (AUC 0,686, Sensitivität 91,6 %, Spezifität 43,3 %) und die DNA-Integrität (AUC 0,719, Sensitivität 59,8 %, Spezifität 75,8 %) eine Abgrenzung von Blasenkarzinompatienten und Patienten ohne Karzinom (inklusive Patienten mit benignen

Erkrankungen und gesunde Kontrollen) erlauben und somit die genaueste diagnostische Information bieten.

Des Weiteren wurde mittels methylierungssensitiver PCR die zellfreie DNA auf Hypermethylierungen in den Promotorbereichen von neun ausgewählten Genen analysiert. Die häufigsten Methylierungen im Kollektiv der Tumorpatienten finden sich in den Promotoren von TIMP3 (NMIBC:88 %, MIBC 75 %), RAR- β (NMIBC: 61,4 %, MIBC: 45 %) und APC (NMIBC: 52 %, MIBC: 65 %). Hierbei resultiert jedoch, dass nur die Genorte APC (Spezifität: 65,2 %, Sensitivität: 54,7 %, AUC: 0,58) und RASSF1A (Spezifität: 87,1 %, Sensitivität: 28,4 %, AUC 0,57) einen signifikanten Unterschied zwischen Patienten mit Blasenkarzinom und den Patienten ohne Blasenkarzinom bieten. Interessanterweise ergibt sich aus der Summe aller Genorte (m-Score) eine hohe diagnostische Signifikanz ($p < 0,001$) und erreicht eine Spezifität von 73 % mit einer mittleren Sensitivität von 46,3 %. Die AUC hat in der Summe aller Genorte auch ihre größte Fläche mit 0,64 und somit die höchste Testgenauigkeit.

Obwohl in dieser Studie ein signifikanter Anstieg von kleinfragmentärer zellfreier DNA sowie eine Erniedrigung der DNA-Integrität von Blasenkarzinompatienten verglichen zu der gesamten Gruppe von Patienten ohne Karzinom demonstriert werden konnte, ist der Enthusiasmus bezüglich zellfreier DNA als potentieller Biomarker in der Diagnostik des Blasenkarzinoms gedämpft, wenn man die Subgruppen der Nicht-Karzinom-Patienten-Kohorte genauer analysiert. Patienten mit einem Blasenkarzinom in der Anamnese, jedoch ohne aktuellen Tumornachweis in der TURB weisen die gleiche Menge an zellfreier DNA und ein gleiches Fragmentierungsmuster auf wie die Karzinompatienten. Während Patienten mit benignen urologischen Erkrankungen und die gesunden Kontrollen am ehesten ursächlich für den Anstieg der kleinfragmentären zellfreien DNA von Karzinompatienten zu betrachten sind, wenn man den Vergleich zu der gesamten Nicht-Karzinom-Kohorte zieht. Die treffsichere Vorhersagefähigkeit der zellfreien DNA mit ihrem Fragmentierungsmuster als Biomarker im Serum von Patienten, die sich einer TURB unterzogen zum Nachweis eines bestehenden Blasenkarzinoms ist limitiert und scheint diesbezüglich keine relevante zusätzliche diagnostische Information zu erbringen.

6. Anhang

Inhalte dieser Dissertation wurden als Originalarbeit publiziert:

1. Hauser S, Kogej M, Fechner G, Von Ruecker A, Bastian PJ, Von Pezold J, Vorreuther R, Lümmer G, Müller SC, Ellinger J. Cell-free serum DNA in patients with bladder cancer: results of a prospective multicenter study. *Anticancer Res* 2012; 32: 3119-3124
2. Hauser S, Kogej M, Fechner G, Von Pezold J, Vorreuther R, Lümmer G, Müller SC, Ellinger J. Serum DNA hypermethylation in patients with bladder cancer: results of a prospective multicenter study. *Anticancer Res* 2013; 33: 779-784

7. Tabellenverzeichnis

Tab. 1:	TNM-Klassifikation des Harnblasenkarzinoms (UICC/AJCC, 2002).....	11
Tab. 2:	Methylierungsfrequenz ausgewählter Gene im Urin/Blut von Harnblasenkarzinom-Patienten	23
Tab. 3:	Geräte mit Herstellerangabe	27
Tab. 4:	Labormaterialien mit Herstellerangabe.....	28
Tab. 5:	Chemikalien mit Herstellerangabe	29
Tab. 6:	Kits mit Herstellerangabe	29
Tab. 7:	Enzyme mit Herstellerangabe	30
Tab. 8:	Primersequenzen	31
Tab. 9:	Software mit Herstellerangabe	32
Tab. 10:	Klinisch-pathologische Parameter des Patientenkollektivs.....	34
Tab. 11:	p-Werte von den Vergleichen in den einzelnen Subgruppen im Hinblick auf die Konzentrationen von ACTB-106, ACTB-384 sowie der DNA-Integrität ...	52
Tab. 12:	Methylierungspositive Fälle	57
Tab. 13:	p-Werte von den Vergleichen in den einzelnen Subgruppen im Hinblick auf die Konzentrationen der Methylierungsratio	58
Tab. 14:	ROC-Analysen	60
Tab. 15:	ROC-Analysen der Methylierungslevel.....	63

8. Abbildungsverzeichnis

Abb. 1:	Grading des Harnblasenkarzinoms	13
Abb. 2:	Funktionsweise der Restriktionsenzyme	38
Abb. 3:	Lagebeziehung ACTB-106 und ACTB-384 Primer	39
Abb. 4:	Lokalisation der Restriktionsenzym-Schnittstellen	40
Abb. 5:	PCR.....	43
Abb. 6:	Standardkurve	46
Abb. 7:	Schmelzkurvenanalyse	47
Abb. 8:	Gelelektrophorese	49
Abb. 9:	Konzentration der kleinen und großen DNA-Fragmente	53
Abb. 10:	DNA-Integrität	54
Abb. 11:	Methylierungsstatus der untersuchten Genorte.....	56
Abb. 12:	ROC-Kurven: Darstellung der ROC-Analyse für ACTB-106.....	60
Abb. 13:	ROC-Kurven: Darstellung der ROC-Analyse für ACTB-384.....	61
Abb. 14:	ROC-Kurven: Darstellung der ROC-Analyse für die DNA-Integrität	62
Abb. 15:	ROC-Kurve des Methylierungslevels für APC	64
Abb. 16:	ROC-Kurve des Methylierungslevels für RASSF1A	65
Abb. 17:	ROC-Kurve des Methylierungslevels für die Summe aller betrachteten Genorte (m-score).....	66

9. Literaturverzeichnis

1. Anker P, Mulcahy H, Chen XQ, Stroun M. Detection of circulating tumour DNA in the blood (plasma/serum) of cancer patients. *Cancer Metastasis Rev* 1999; 18: 65-73
2. Babjuk M, Burger M, Zigeuner R, Shariat S, Van Rhijn B, Compérat E, Sylvester R, Kaasinen E, Böhle A, Palou J, Rouprêt M: Guidelines on Non-muscle-invasive Bladder Cancer (TaT1 and CIS) 2013. European Association of Urology (EAU), 2013
3. Berrada N, Amzazi S, Ameziane El Hassani R, Benbacer L, El Mzibri M, Khyatti M, Chafiki J, Abbar M, Al Bouzidi A, Ameer A, Attaleb M. Epigenetic alterations of adenomatous polyposis coli (APC), retinoic acid receptor beta (RAR β) and survivin genes in tumor tissues and voided urine of bladder cancer patients. *Cell Mol Biol* 2012; 10: 1744-1751
4. Bertz J, Giersiepen K, Haberland J, Hentschel S, Kaatsch P, Katalinic A, Stabenow R, Stegmaier C, Ziegler H. Harnblase. In: Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (GEKID) in Zusammenarbeit mit dem Robert Koch-Institut (RKI), Hrsg., Krebs in Deutschland. 5. überarbeitete, aktualisierte Auflage. Saarbrücken, Robert Koch Institut: 2006: 80
5. Böcker W, Denk H, Heitz PU. Pathologie. München- Jena: Elsevier, Urban&Fischer, 2004. 3. Auflage
6. Botezatu I, Serdyuk O, Potapova G, Shelepov V, Alechina R, Molyaka Y, Ananev V, Bazin I, Garin A, Narimanov M, Knysh V, Melkonyan H, Umansky S, Lichtenstein A. Genetic analysis of DNA excreted in urine: a new approach for detecting specific genomic DNA sequences from cells dying in an organism. *Clin Chem* 2000; 46: 1078-1084

7. Chan MW, Chan LW, Tang NL, Lo KW, Tong JH, Chan AW, Cheung HY, Wong WS, Chan PS, Lai FM, To KF. Frequent hypermethylation of promoter region of RASSF1A in tumor tissues and voided urine of urinary bladder cancer patients. *Int J Cancer* 2003; 104: 611-616
8. Chan MW, Chan LW, Tang NL, Tong JH, Lo KW, Lee TL, Cheung HY, Wong WS, Chan PS, Lai FM, To KF. Hypermethylation of multiple genes in tumor tissues and voided urine in urinary bladder cancer patients. *Clin Cancer Res* 2002; 8: 464-470
9. Chang HW, Lee SM, Goodman SN, Singer G, Cho SK, Sokoll LJ, Montz FJ, Roden R, Zhang Z, Chan DW, Kurman RJ, Shih I. Assessment of plasma DNA levels, allelic imbalance and CA 125 as diagnostic tests for cancer. *J Natl Cancer Inst* 2002; 94: 1697-1703
10. Chen PC, Tsai MH, Yip SK, Jou YC, Ng CF, Chen Y, Wang X, Huang W, Tung CL, Chen GC, Huang MM, Tong JH, Song EJ, Chang DC, Hsu CD, To KF, Shen CH, Chan MW. Distinct DNA methylation epigenotypes in bladder cancer from different Chinese sub-populations and its implication in cancer detection using voided urine. *BMC Med Genomics* 2011; 4: 45
11. Chun FK, Muller I, Lange I, Friedrich MG, Erbersdobler A, Karakiewicz PI, Graefen M, Pantel K, Huland H, Schwarzenbach H. Circulating tumour-associated plasma DNA represents an independent and informative predictor of prostate cancer. *BJU Int* 2006; 98: 544-548
12. Domínguez G, Carballido J, Silva J, Silva JM, García JM, Menéndez J, Provencio M, España P, Bonilla F. p14ARF promoter hypermethylation in plasma DNA as an indicator of disease recurrence in bladder cancer patients. *Clin Cancer Res* 2002; 8: 980-985

13. Dulaimi E, Uzzo RG, Greenberg RE, Al Saleem T, Cairns P. Detection of bladder cancer in urine by a tumor suppressor gene hypermethylation panel. *Clin Cancer Res* 2004; 10: 1887-1893
14. Eissa S, Swellam M, El-Khouly IM, Kassim SK, Shehata H, Mansour A, Esmat M, Nossier AI, Hamdy MA, Awad NM, El-Ahmady O. Aberrant methylation of RARbeta2 and APC genes in voided urine as molecular markers for early detection of bilharzial and nonbilharzial bladder cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2011; 20: 1657-1664
15. Ellinger J, Albers P, Müller SC, von Ruecker A, Bastian PJ. Circulating mitochondrial DNA in the serum of patients with testicular germ cell cancer as a novel noninvasive diagnostic biomarker. *BJU Int* 2009; 104: 48-52
16. Ellinger J, Albers P, Perabo FG, Müller SC, von Ruecker A, Bastian PJ. CpG island hypermethylation of cell-free circulating serum DNA in patients with testicular cancer. *J Urol* 2009; 182: 324-329
17. Ellinger J, Bastian PJ, Ellinger N, Kahl P, Perabo FG, Büttner R, Müller SC, von Ruecker A. Apoptotic DNA fragments in serum of patients with muscle invasive bladder cancer: A prognostic entity. *Cancer Lett* 2008; 264: 274-280
18. Ellinger J, Bastian PJ, Haan KI, Heukamp LC, Büttner R, Fimmers R, Müller SC, von Ruecker A. Noncancerous PTGS2 DNA fragments of apoptotic origin in sera of prostate cancer patients qualify as diagnostic and prognostic indicators. *Int J Cancer* 2008; 122: 138-143
19. Ellinger J, El Kassem N, Heukamp LC, Matthews S, Cubukluoz F, Kahl P, Perabo FG, Müller SC, von Ruecker A, Bastian PJ. Hypermethylation of cell-free serum DNA indicates worse outcome in patients with bladder cancer. *J Urol* 2008; 179: 346-352

20. Ellinger J, Haan K, Heukamp LC, Kahl P, Büttner R, Müller SC, von Ruecker A, Bastian PJ. CpG island hypermethylation in cell-free serum DNA identifies patients with localized prostate cancer. *Prostate* 2008; 68: 42-49
21. Ellinger J, Müller DC, Müller SC, Hauser S, Heukamp LC, von Ruecker A, Bastian PJ, Walgenbach-Brunagel G. Circulating mitochondrial DNA in serum: a universal diagnostic biomarker for patients with urological malignancies. *Urol Oncol* 2012; 30: 509-515
22. Ellinger J, Müller SC, Wernert N, von Ruecker A, Bastian PJ. Mitochondrial DNA in serum of patients with prostate cancer: a predictor of biochemical recurrence after prostatectomy. *BJU Int* 2008; 102: 628-632
23. Ellinger J, Wittkamp V, Albers P, Perabo FG, Mueller SC, von Ruecker A, Bastian PJ. Cell-free circulating DNA: diagnostic value in patients with testicular germ cell cancer. *J Urol* 2009; 181: 363-371
24. Ellinger N. Frei zirkulierende DNA-Fragmente im Serum als diagnostischer und prognostischer Marker beim Blasenkarzinom. 2008
25. Esteller M, Corn PG, Baylin SB, Herman JG. A gene hypermethylation profile of human cancer. *Cancer Res* 2001; 61: 3225-3229
26. Freedman ND, Silverman DT, Hollenbeck AR, Schatzkin A, Abnet CC. Association between smoking and risk of Bladder Cancer among men and women. *JAMA* 2011; 306: 737-745
27. Frick H, Leonhardt H, Starck D. Spezielle Anatomie II: Eingeweide, Nervensystem, Systematik der Muskeln und Leitungsbahnen. Stuttgart-New York: Thieme, 1992

28. Friedrich MG, Weisenberger DJ, Cheng JC, Chandrasoma S, Siegmund KD, Gonzalgo ML, Toma MI, Huland H, Yoo C, Tsai YC, Nichols PW, Bochner BH, Jones PA, Liang G. Detection of methylated apoptosis-associated genes in urine sediments of bladder cancer patients. *Clin Cancer Res* 2004; 10: 7457-7465
29. Gautschi O, Bigosch C, Huegeli B, Jermann M, Marx A, Chasse E, Ratschiller D, Weder W, Joerger M, Betticher DC, Stahel RA, Ziegler A. Circulating deoxyribonucleic Acid as prognostic marker in non-small-cell lung cancer patients under-going chemotherapy. *J Clin Oncol* 2004; 22: 4157-4164
30. Glas AS, Roos D, Deutekom M, Zwinderman AH, Bossuyt PM, Kurth KH. Tumor markers in the diagnosis of primary bladder cancer. A systematic review. *J Urol* 2003; 169: 1975-1982
31. Goebell PJ, Vom DF, Rodel C, Frohneberg D, Thuroff JW, Jocham D, Stief C, Roth S, Knuchel R, Schmidt KW, Kausch I, Zaak D, Wiesner C, Miller K, Sauer R, Rubben H. Noninvasive and invasive bladder cancer: diagnostics and treatment. *Urologe A* 2006; 45: 873-884
32. Gschwend JE, Dahm P, Fair WR. Disease specific survival as endpoint of outcome for bladder cancer patients following radical cystectomy. *Eur Urol* 2002; 41: 440-448
33. Hauser S, Zahalka T, Ellinger J, Fechner G, Heukamp LC, Von Ruecker A, Müller SC, Bastian PJ. Cell-free circulating DNA: Diagnostic value in patients with renal cell cancer. *Anticancer Res* 2010; 30: 2785-2789
34. Herman JG, Baylin SB. Gene silencing in cancer in association with promoter hypermethylation. *N Engl J Med* 2003; 349: 2042-2054
35. Higuchi R, Fockler C, Dollinger G, Watson R. Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology (N.Y.)* 1993; 11: 1026-1030

36. Hoque MO, Begum S, Topaloglu O, Chatterjee A, Rosenbaum E, Van Criekinge W, Westra WH, Schoenberg M, Zahurak M, Goodman SN, Sidransky D. Quantitation of promoter methylation of multiple genes in urine DNA and bladder cancer detection. *J Natl Cancer Inst* 2006; 98: 996-1004
37. Huland H, Friedrich M. Harnblasenkarzinom. In: Hautmann R, Huland H. *Urologie*. Heidelberg: Springer, 2006: 202-212
38. Issa JP, Garcia-Manero G, Giles FJ, Mannari R, Thomas D, Faderl S, Bayar E, Lyons J, Rosenfeld CS, Cortes J, Kantarjian HM. Phase 1 study of low-dose prolonged exposure schedules of the hypomethylating agent 5-aza-2'-deoxycytidine (decitabine) in hematopoietic malignancies. *Blood* 2004; 103: 1635-1640
39. Jabłonowski Z, Reszka E, Gromadzińska J, Wąsowicz W, Sosnowski M. Hypermethylation of p16 and DAPK promoter gene regions in patients with non-invasive urinary bladder cancer. *Arch Med Sci* 2011; 7: 512-516
40. Jahr S, Hentze H, Englisch S, Hardt D, Fackelmayer FO, Hesch RD, Knippers R. DNA fragments in the blood plasma of cancer patients: quantitations and evidence for their origin from apoptotic and necrotic cells. *Cancer Res* 2001; 61: 1659-1665
41. Jones PA, Baylin SB. The fundamental role of epigenetic events in cancer. *Nat Rev Genet* 2002; 3: 415-428
42. Kirkali Z, Chan T, Manoharan M, Algaba F, Busch C, Cheng L, Kiemeny L, Kriegmair M, Montironi R, Murphy WM, Sesterhenn IA, Tachibana M, Weider J. Bladder cancer: epidemiology, staging and grading, and diagnosis. *Urology* 2005; 66: 4-34
43. Koecke HU, Emschermann P, Haerle E. *Biologie*. Stuttgart: Schattauer, 2000

44. Lee SH, Lee JY, Park WS, Kim SY, Jang JJ, Yoo NJ. Transitional cell carcinoma expresses high levels of Fas ligand in vivo. *BJU Int* 1999; 83: 698-702
45. Leon SA, Shapiro B, Sklaroff DM, Yaros MJ. Free DNA in the serum of cancer patients and the effect of therapy. *Cancer Res* 1977; 37: 646-650
46. Lin HH, Ke HL, Huang SP, Wu WJ, Chen YK, Chang LL. Increase sensitivity in detecting superficial, low grade bladder cancer by combination analysis of hypermethylation of E-cadherin, p16, p14, RASSF1A genes in urine. *Urol Oncol* 2010; 28: 597-602
47. Lindemann-Docter K, Knüchel R. Update on urothelial carcinoma histopathology. *Pathologe* 2008; 29: 331-338
48. Mahn R, Heukamp LC, Rogenhofer S, von Ruecker A, Müller SC, Ellinger J. Circulating microRNAs (miRNA) in serum of patients with prostate cancer. *Urology* 2011; 77: 1265
49. Mandel P, Metais P. Les acides nucléiques du plasma sanguin chez l'homme. *C R Seances Soc Biol Fil* 1948; 142: 241-243
50. Marcus PM, Hayes RB, Vineis P, Garcia-Closas M, Caporaso NE, Autrup H, Branch RA, Brockmoller J, Ishizaki T, Karakaya AE, Ladero JM, Mommsen S, Okkels H, Romkes M, Roots I, Rothman N. Cigarette smoking, N-acetyltransferase 2 acetylation status, and bladder cancer risk: a case-series meta-analysis of a gene-environment interaction. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2000; 9: 461-467
51. Maruyama R, Toyooka S, Toyooka KO, Harada K, Virmani AK, Zochbauer-Muller S, Farinas AJ, Vakar-Lopez F, Minna JD, Sagalowsky A, Czerniak B, Gazdar AF. Aberrant promoter methylation profile of bladder cancer and its relationship to clinicopathological features. *Cancer Res* 2001; 61: 8659-8663

52. Mizutani Y, Hongo F, Sato N, Ogawa O, Yoshida O, Miki T. Significance of serum soluble Fas ligand in patients with bladder carcinoma. *Cancer* 2001; 92: 287-293
53. Negraes PD, Favaro FP, Camargo JL, Oliveira ML, Goldberg J, Rainho CA, Salvadori DM. DNA methylation patterns in bladder cancer and washing cell sediments: a perspective for tumor recurrence detection. *BMC Cancer* 2008; 8: 238
54. Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. Global cancer statistics 2002. *CA Cancer J Clin* 2005; 55: 74-108
55. Plimack ER, Kantarjian HM, Issa JP. Decitabine and its role in the treatment of hematopoietic malignancies. *Leuk Lymphoma* 2007; 48: 1472-1481
56. Pu RT, Laitala LE, Clark DP. Methylation profiling of urothelial carcinoma in bladder biopsy and urine. *Acta Cytol* 2006; 50: 499-506
57. Roberts RJ. How restriction enzymes became the workhorses of molecular biology. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; 102: 5905-5908
58. Robert Koch-Institut und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. Krebs in Deutschland 2003-2004. Häufigkeiten und Trends.- Berlin: Robert Koch-Institut, 2008
59. Robertson KD, Wolffe AP. DNA methylation in health and disease. *Nat Rev Genet* 2000; 1: 11-1
60. Rozen S, Skaletsky H. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. *Methods Mol Biol* 2000; 132: 365-386

61. Serizawa RR, Ralfkiaer U, Steven K, Lam GW, Schmiedel S, Schüz J, Hansen AB, Horn T, Guldborg P. Integrated genetic and epigenetic analysis of bladder cancer reveals an additive diagnostic value of FGFR3 mutations and hypermethylation events. *Int J Cancer* 2011; 129: 78-87
62. Shapiro B, Chakrabarty M, Cohn EM, Leon SA. Determination of circulating DNA levels in patients with benign or malignant gastrointestinal disease. *Cancer* 1983; 51: 2116-2120
63. Stevens A, Lowe J. *Histologie des Menschen*. Stuttgart: Thieme, 1997
64. Tan EM, Schur PH, Carr RI, Kunkel HG. Deoxybonucleic acid (DNA) and antibodies to DNA in the serum of patients with systemic lupus erythematosus. *J Clin Invest* 1966; 45: 1732-1740
65. Umetani N, Giuliano AE, Hiramatsu SH, Amersi F, Nakagawa T, Martino S, Hoon DS. Prediction of breast tumor progression by integrity of free circulating DNA in serum. *J Clin Oncol* 2006a; 24: 4270-4276
66. Umetani N, Kim J, Hiramatsu S, Reber HA, Hines OJ, Bilchik AJ, Hoon DS. Increased integrity of free circulating DNA in sera of patients with colorectal or peri-ampullary cancer: direct quantitative PCR for ALU repeats. *Clin Chem* 2006b; 52: 1062-1069
67. Valenzuela MT, Galisteo R, Zuluaga A, Villalobos M, Núñez MI, Oliver FJ, Ruiz de Almodóvar JM. Assessing the use of p16(INK4a) promoter gene methylation in serum for detection of bladder cancer. *Eur Urol* 2002; 42: 622-630
68. Wang BG, Huang HY, Chen YC, Bristow RE, Kassauei K, Cheng CC, Roden R, Sokoll LJ, Chan DW, Shih IeM. Increased plasma DNA integrity in cancer patients. *Cancer Res* 2003; 63: 3966-3968

69. Weiß C. Basiswissen Medizinische Statistik. Berlin: Springer, 2008
70. Winqvist E, Knox J, Ayoub JP, Wood L, Wainman N, Reid GK, Pearce L, Shah A, Eisenhauer E. Phase II trial of DNA methyltransferase 1 inhibition with the antisense oligonucleotide MG98 in patients with metastatic renal carcinoma: a National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group investigational new drug study. *Invest New Drugs* 2006; 24: 159-167
71. Wu TL, Zhang D, Chia JH, Tsao KH, Sun CF, Wu JT. Cell-free DNA: measurement in various carcinomas and establishment of normal reference range. *Clin Chim Acta* 2002; 321: 77-87
72. Wulfken LM, Moritz R, Ohlmann C, Holdenrieder S, Jung V, Becker F, Herrmann E, Walgenbach-Brünagel G, von Ruecker A, Müller SC, Ellinger J. MicroRNAs in renal cell carcinoma: diagnostic implications of serum miR-1233 levels. *PLoS One*. 2011; 6: e25787
73. Yates DR, Rehman I, Meuth M, Cross SS, Hamdy FC, Catto JW. Methylational urinalysis: a prospective study of bladder cancer patients and age stratified benign controls. *Oncogene* 2006; 25: 1984-1988
74. Yu J, Zhu T, Wang Z, Zhang H, Qian Z, Xu H, Gao B, Wang W, Gu L, Meng J, Wang J, Feng X, Li Y, Yao X, Zhu J. A novel set of DNA methylation markers in urine sediments for sensitive/specific detection of bladder cancer. *Clin Cancer Res* 2007; 13: 7296-7304
75. Zahalka T. Frei im Blutserum zirkulierende DNA als diagnostischer Marker beim Nierenzellkarzinom. 2010

76. Zhong X, Isharwal S, Naples JM, Shiff C, Veltri RW, Shao C, Bosompem KM, Sidransky D, Hoque MO. Hypermethylation of genes detected in urine from Ghanaian adults with bladder pathology associated with *Schistosoma haematobium* infection. PLoS One. 2013; 8: e59089

10. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich denjenigen Personen aus tiefstem Herzen danken, ohne die das Zustandekommen dieser Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

An erster Stelle gilt mein Dank meinem Doktorvater Herrn PD Dr. med. Jörg Ellinger für die Vergabe dieses spannenden Promotionsthemas. Durch seine hervorragende Betreuung und seine allzeitig sehr wertvollen Hilfestellungen sowie seine enorme Geduld durch die gesamten Phasen des Projektes konnte diese Arbeit erst entstehen.

Weiterhin danke ich Herrn Prof. Dr. med. Dr. h.c. Stefan C. Müller, Herrn PD Dr. med. Guido Fechner, Herrn Dr. med. Stefan Hauser, Frau Wilma Steinmüller und den Mitarbeitern der Klinik und Poliklinik für Urologie und Kinderurologie der Uniklinik Bonn, Herrn Jochen von Pezold und den Mitarbeitern der Urologie der Katholischen Kliniken Oberberg, Herrn Prof. Dr. med. Roland Vorreuther und seinen Mitarbeitern der evangelischen Kliniken Bonn sowie Herrn Prof. Dr. med. Gerd Lümmer und seinen Mitarbeitern des St. Josef Hospitals Troisdorf für ihre Hilfe bei der Probengewinnung und Datenerhebung dieser Multicenter Studie.

Ein weiterer Dank geht an Frau Doris Schmidt für die besonders nette Einarbeitung im urologischen Labor, ihre Unterstützung und die sehr gute Zusammenarbeit während der gesamten Laborarbeit.

Dem Herrn Prof. Dr. med. Christian Rudlowski danke ich recht herzlich für seine Flexibilität und die schnelle Terminvergabe der mündlichen Prüfung.

Mein besonderer Dank geht an meine Freundin Dr. med. Astrid Kerker für die Unterstützung während der gesamten Zeit, die Hilfestellungen in Formatierungsfragen, dass sie immer an mich geglaubt hat, seitdem wir im Studium aufeinander getroffen sind, und mich immer wieder in Zeiten von Durststrecken aufgebaut hat. Ein weiterer

Dank geht auch an ihren Mann, Dr. med. Ralf Kerker, der mir seine Frau oft zeitlich überlassen hat zur Fertigstellung dieser Arbeit.

Weiterhin danke ich meiner Freundin Christina Nöbel, die in den richtigen Momenten, wenn nichts mehr ging, für die entscheidende Ablenkung sorgte und mit der mich seit unserer Schulzeit eine enge Freundschaft verbindet.

Zum Schluss möchte ich den größten Dank an meine Eltern Rosemarie und Martin Kogej und meinen Geschwistern Andrea Neuhaus und Dr. rer. nat. Michael Kogej richten für die große Unterstützung während meiner gesamten Studienzeit und dieser Arbeit, die mit viel Geduld diese Zeit begleiteten und immer an mein Vorhaben und dessen Gelingen glaubten. Danke, dass ihr immer für mich da seid!