

Aus der Klinik für Urologie und Kinderurologie
des Zentrums für operative Medizin
der Philipps-Universität Marburg
Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. med. Rainer Hofmann

des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg

in Zusammenarbeit mit dem Universitätsklinikum Gießen und
Marburg GmbH,
Standort Marburg

**Identifikation molekularer
Progressionsmarker
des Harnblasenkarzinoms
anhand der Mikrosatellitenanalyse**

Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der
gesamten Humanmedizin

dem Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

Christian Michael Gäck
aus Bad Wildungen
Marburg, 2010

Angenommen vom Fachbereich der Philipps-Universität Marburg
am : 05.11.2010

Gedruckt mit der Genehmigung des Fachbereichs.

Dekan: Prof. Dr. med. Matthias Rothmund

Referent: Prof. Dr. med. Rolf von Knobloch

Korreferent: PD.Dr. oec. troph. Gabriele Jaques

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung

- 1.1. Zellbiologische und molekulargenetische Grundlagen maligner Tumore
 - 1.1.1. Allgemeines
 - 1.1.2. Klinik und Genetik des Harnblasenkarzinoms

- 1.2. Genetische Analyseverfahren
 - 1.2.1. Zytogenetische Analyse
 - 1.2.1.1. Chromosomenanalyse
 - 1.2.1.2. Fluoreszenz in situ Hybridisierung (FISH)
 - 1.2.1.3. Komparative genomische Hybridisierung (CGH)
 - 1.2.2. Molekulargenetische Analyse
 - 1.2.2.1. Mikrosatellitenanalyse (MSA)
 - 1.2.2.2. DNA-Sequenzierung
 - 1.2.2.3. Microarrays

- 1.3. Tumormarker
 - 1.3.1. Konventionelle Tumormarker
 - 1.3.2. Molekulare Tumormarker
 - 1.3.2.1. DNA basierter Nachweis zellgebundener Tumor-DNA
 - 1.3.2.2. DNA basierter Nachweis zellfreier Tumor-DNA in Serum und Plasma

2. Zielsetzung und Fragestellung

3. Material und Methoden

3.1. Allgemeines

3.2. Probenmaterial

3.3. Methoden

3.3.1. DNA-Isolierung

3.3.2. Mikrosatellitenanalyse

3.3.3. Polymerasekettenreaktion (PCR) mit fluoreszierenden Primern

3.3.4. Laserdetektion der PCR-Produkte

3.3.5. Followup

3.3.6. Statistik

4. Ergebnisse

4.1. Inzidenz genetischer Alterationen und Assoziationen mit klinisch-pathologischen Prognoseparametern

4.2. Serum-DNA-Alterationen

4.2.1. Inzidenz

4.2.2. Assoziation mit klinisch-pathologischen Prognoseparametern

4.2.3. Spezifität

4.3. Followup

5. Diskussion

5.1. Allgemeines

5.2. genetische Charakterisierung

5.3. Serum-DNA-Analyse

5.4. Zukünftige Anwendungen

5.4.1. Diagnose

5.4.1.1. Genetische Klassifikation

5.4.1.2. Serologischer Nachweis

5.4.2. Prognose

5.4.3. Therapie

6. Zusammenfassung

6.1. Deutsche Zusammenfassung

6.2. Englische Zusammenfassung (Summary)

7. Literaturverzeichnis

8. Abkürzungsverzeichnis

9. Anhang

9.1. Tabellarischer Lebenslauf

9.2. Verzeichnis der akademischen Lehrer

9.3. Danksagung

9.4. Ehrenwörtliche Erklärung

1. Einleitung

1.1. Zellbiologische und molekulargenetische Grundlagen maligner Tumore

1.1.1. Allgemeines

Tumore müssen bestimmte Malignitätskriterien erfüllen, um als bösartig bezeichnet werden zu können. Dazu zählen unkontrolliertes Wachstum mit Infiltration der Umgebung unter Missachtung der Organgrenzen und die Fähigkeit zur Metastasierung.

Das Modell der Mehrschrittkarzinogenese stellt die Tumorentstehung dar, wobei wachstumsstimulierende und wachstumshemmende Substanzen im Ungleichgewicht stehen [79].

Für die Entstehung neoplastischen Gewebes sind Tumorgene verantwortlich. Dazu gehören die Protoonkogene, welche durch Mutation, z.B. Duplikation, Zugewinn oder Polysomien zu Onkogenen werden können. Außerdem gibt es Tumorsuppressorgene (TSG), die durch Apoptoseauslösung und Unterdrückung der Zellteilung den Zellzyklus regulieren. Durch Deletion oder Monosomien kann genetisches Material verlorengehen und damit die TSGs inaktivieren. Bei der ras-Familie, einer bekannten Gruppe von Onkogenen, kann eine Punktmutation eines Nukleotids ausreichen, um dieses zu aktivieren. Bei TSGs reicht ein gesundes Allel, um die Genfunktion zu erhalten, deshalb werden sie auch als rezessive Onkogene bezeichnet [79]. Macht sich ein genetischer Defekt bemerkbar, müssen also beide Allele defekt sein. Mit der „Zwei-Treffer-Hypothese“ beschrieben Knudson und Strong 1972 die Inaktivierung von TSGs beim Wilms-Tumor [90]. Diese Hypothese ist mittlerweile auf alle Tumorentitäten übertragen worden [53] und besagt, dass ein Allel des entsprechenden TSGs durch Deletion verlorengeht und das andere Allel durch Punktmutation inaktiviert wird. Durch die genexpressionsinibierende Promoterhypermethylierung ist die Knudson'sche Zwei-Treffer-Hypothese mittlerweile erweitert worden [68,58] (Abb. 1).

Eine wichtige Rolle bei der Entstehung des Harnblasenkarzinoms spielt das bekannte P53-TSG. Dessen Genprodukt, ein Phosphorprotein, unterbricht den Zellzyklus zwischen der G1- und der S-Phase, wodurch die Zellteilung unterdrückt werden kann. Auch bei anderen Tumoren zeigen sich Mutationen des P53-TSGs [43, 144, 145, 158, 167]. An der Tumorbilogie des Harnblasenkarzinoms ist außerdem das Retinoblastoma-Gen (RB-Gen) beteiligt.

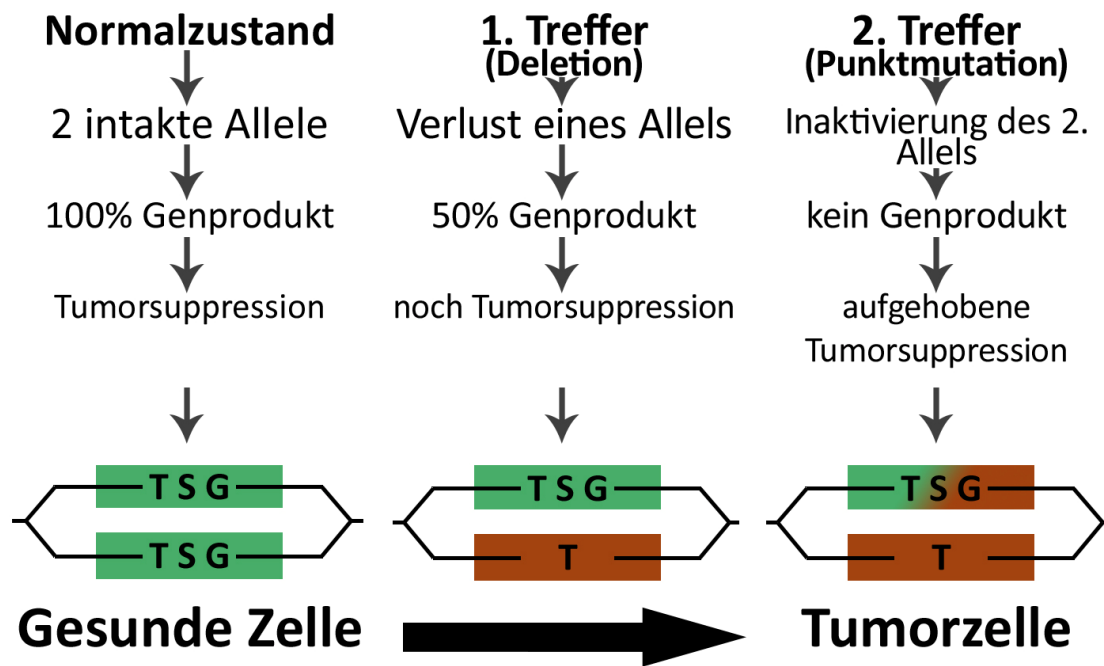


Abbildung 1: Knudson`sche Zwei-Treffer-Hypothese.

1.1.2. Klinik und Genetik des Harnblasenkarzinoms

Mit einem Anteil von 3 % ist das Harnblasenkarzinom der fünfthäufigste Tumor aller Malignome. Das Harnblasenkarzinom ist beim Mann nach Lungen-, Prostata- und Kolonkarzinom das vierthäufigste, bei der Frau der zehnthäufigste maligne Tumor. In Deutschland erkranken pro Jahr ca. 16.000 Einwohner am Harnblasenkarzinom, die Inzidenz beträgt insgesamt 30 pro 100.000 Einwohner beim Mann und acht bei der Frau. Der Altersgipfel der Inzidenz liegt bei 65-75 Jahren. In industrialisierten Ländern kommt das Harnblasenkarzinom häufiger als in weniger entwickelten Ländern vor.

Als Kanzerogene bzw. Risikofaktoren gelten aromatische Amine, Tabakrauch, das Tragen von Dauerkathetern, chronische Harnwegsinfekte, Blasenbillharziose und die Radiatio des kleinen Beckens.

Bei 92 % der an einem Harnblasenkarzinom Erkrankten aus industrialisierten Ländern zeigen sich histologisch Urothelkarzinome, sogenannte Transitionalzellkarzinome.

Plattenepithelkarzinome werden viel seltener und vor allem nach oder bei chronischen Harnwegsinfekten diagnostiziert.

75 % der Blasenkarzinome wachsen bei Diagnosestellung oberflächlich, jedoch rezidivieren sie in 70 % der Fälle nach transurethraler Resektion. Rezidive treten vor allem in den ersten zwei Jahren postoperativ auf. Bei 6-10 % der primär oberflächlich wachsenden Tumore kommt es zum Progress [72,186]. Harnblasenkarzinome werden histologisch nach der UICC eingeteilt [162]. Oberflächliche Primärtumore gelten als nicht-muskelinfiltrierend und werden in Ta-Tumore und in das Carcinoma in situ (Tis) unterteilt. Ta-Tumore zeigen von der Kerndifferenzierung Eigenschaften malignen Wachstums, ohne aber die Lamina propria des Urothels zu infiltrieren. Damit haben sie eine bessere Prognose als das Tis, welches auch oberflächlich wächst, aber eine hohe Kernpolymorphie aufweist. Zudem wächst das Tis meist multifokal panurothelial mit einer schlechten Prognose [193, 34]. Auch ein T1 Tumor zählt zu den nicht-muskelinfiltrierenden Blasenkarzinomen [110]. 75 % der Harnblasentumore wachsen bei Diagnosestellung oberflächlich und papillär. 20 bis 25 % der Tumore wachsen solide und zeigen bereits bei Diagnosestellung eine Infiltration der Lamina muscularis propria. Deshalb werden zwei unterschiedliche

genetische Entwicklungen vermutet [167, 42, 89]. Klinisch kann zwischen papillärem und flachem Wachstum des Carcinoma in situ unterschieden werden.

Neueste Erkenntnisse ergaben sich aus der vollständigen Kartierung des Mukosagenoms. Patienten mit invasivem Blasenkarzinom, welche sich einer Resektion unterzogen, zeigten genetische Veränderungen an sechs speziellen chromosomalen Orten. Dabei kamen Alterationen der gesamten Mukosa zum Vorschein. Nicht nur Tumorgewebe, sondern auch gesunde Blasenmukosa wies entsprechende Veränderungen auf. Diese ausgedehnten deutlichen Veränderungen treten sehr früh in der Karzinogenese auf und können als Prä-Neoplasie bezeichnet werden. Gene dieser Regionen werden als forerunner genes bezeichnet. Jedoch bedarf es weiterer Untersuchungen, um die genaue biologische Funktion dieser forerunner genes zu verstehen [40].

Die konventionelle und seit längerem erforschte Entstehung wird im Folgenden beschrieben.

Mehrere Onkogene sind an der Entstehung des Harnblasenkarzinoms beteiligt. Durch Amplifikation genetischer Sequenzen werden sie aktiviert. Die Onkogene der ras-Familie wirken jedoch über ein mutiertes Proteinprodukt. Für das Urothelkarzinom der Harnblase werden in 6 bis 44 % der Fälle H-ras Mutationen beschrieben [88, 105, 54]. In welchem Maße sie die Tumorbiologie des Harnblasenkarzinoms beeinflussen ist noch nicht ganz geklärt. Bei einigen Harnblasenkarzinomen konnte das Gen ErbB2 (17q21), welches einen transmembranen Rezeptor mit Homologität zum EGF Rezeptor codiert, gefunden werden. Es konnte überwiegend bei lokal fortgeschrittenen, schlecht differenzierten Karzinomen nachgewiesen werden [35, 108, 118, 149, 184]. Ein besonderes Expressionsmuster von Rezeptoren der ErbB-Familie steht für ein sehr aggressives Wachstum des Harnblasenkarzinoms [80]. Teilweise wird auch das Protoonkogen CCND1 (11q13) expremiert. Das Genprodukt von CCND 1 ist Zyklin D1, das am Fortschreiten des Zellzyklus über den Rb-Weg beteiligt ist [17, 129, 134]. Dabei kann die Funktion von CCND1 jedoch nicht als signifikanter Prognosefaktor gewertet werden [110]. Weitere amplifizierte tumorassozierte Chromosomenloci konnten in CGH-Studien identifiziert werden, welche auch Onkogene enthalten könnten. Die Regionen sind 1q22-24, 3p24-25, 3q, 5p, 6p22, 8p12, 8q12, 8q21-22, 10p12-14, 11q13, 12q15-21,

13q31-33, Xp 11-12 und Xq21-22 [73,78, 139]. 20q ist eine weitere chromosomale Region, die amplifiziert in zytogenetischen Untersuchungen nachgewiesen wurde. Urothelzellen mit 20q zeigten im Versuch eine Immortalität [137]. Das STK15/BTAK Gen, welches bei vielen anderen Karzinomen gefunden wurde, könnte für diese Region in Frage kommen. Funktionierende Tumorsuppressorgene (TSG) hemmen den Zellzyklus und wirken dem Wachstum von Malignomen entgegen. An der Karzinogenese des Harnblasenkarzinoms sind unterschiedliche TSGs beteiligt. Das sind z.B. P53, RB, INKA/ARF, PTEN und das DCC. Zudem sind zahlreiche deletierte tumorassoziierte chromosomale Regionen bekannt. Sie konnten häufig in Harnblasenkarzinomen gefunden werden und beinhalten potentiell TSGs. Beim Harnblasenkarzinom findet sich häufig eine Deletion oder ein Loss of heterozygosity (LOH) des kurzen Arms von Chromosom 17 (17p13-1) in Verbindung mit einer Mutation des zweiten p53 Allels. Diese Veränderungen korrelieren mit fortgeschrittenem Tumorstadium und schlechtem Differenzierungsgrad [43, 44, 51, 61, 144, 158, 168]. Ebenso mit einer schlechten Prognose assoziiert ist eine Alteration des RB-Gens (13q14) [24, 36,37, 74, 101, 103]. In über 50 % der Harnblasenkarzinome treten Deletionen des Chromosoms 9 auf. An Chromosom 9p konzentrieren sich die Alterationen um den Locus des TSG INK4A/ARF und INK4B (p15) auf 9p21 [45, 166, 198]. Drei den Zellzyklus hemmende Proteine (p16, p14ARF, p15) kodieren diese komplexe Region [23, 126]. Das erste für diese Region identifizierte Kandidatengen war INK4A. Aber Mutationsanalysen konnten keine Mutationshäufung nachweisen, weshalb für diesen Locus von einer homozygoten Deletion als Inaktivierungsmechanismus ausgegangen wurde [8, 23, 126, 128, 166, 196]. Da alle drei TSGs dieser Region auf einmal von diesen Deletionen inaktiviert werden, ist dieses ein wirkungsvoller Mechanismus der Tumorentstehung. Auf Chromosom 9q32-33 konnte ein neues Kandidatengen gefunden werden, das DBCCR1 (Deleted in Bladder Cancer Candidate Region 1). Die Region konnte mit Hilfe der Mikrosatellitenkartierung eingegrenzt werden, so gelang ein positionales Klonieren [60,63, 125]. Die Promoterhypermethylierung wurde als Inaktivierungsmechanismus dieses Kandidatengens erkannt [60,62]. Bei 60 % aller Harnblasenkarzinome kommen stadienunabhängig Alterationen des Chromosoms 9 vor, deshalb kann eine

Deletion an 9p/9q als ein frühes Ereignis bei dieser Tumorentstehung bezeichnet werden. Eine weitere Besonderheit besteht darin, daß LOH an DBCCR1 mit einer möglichen späteren Metastasierung bei nichtinvasiven papillären Tumoren assoziiert zu sein scheint [104].

Außerdem zeigte sich in Studien die Beteiligung des TSG PTEN auf Chromosom 10q23 beim Progress des Harnblasenkarzinoms [6, 22, 27, 76]. Bei ca. 30 % der muskelinvasiven Harnblasenkarzinome ließ sich ein LOH von 10q23 nachweisen. Auch hier liegt meist eine homozygote Deletion vor. Aus diesem Grund könnte die tatsächliche Inzidenz an Alterationen, durch konventionelle LOH-Analysen ermittelt, unterrepräsentiert sein.

Um Chromosomenarme auf große Deletionen untersuchen zu können, bieten sich die Mikrosatellitenanalyse (MSA) und die LOH-Analyse an [87]. Beim Harnblasenkarzinom sind mehrere Chromosomenarme von häufigen Deletionen betroffen. Die komparative Hybridisierung (CGH) vermag auf zytogenetischer Ebene computerassistent viele Chromosomen des Genoms gleichzeitig zu analysieren. Damit wurden die durch Mikrosatellitenanalyse gewonnenen Daten bestätigt und weitere tumorassoziierte chromosomale Regionen identifiziert. Zudem ermöglicht es die CGH in Paraffin eingebettetes Tumormaterial zu untersuchen. Viele dieser Regionen müssen noch mittels MSA kartiert werden. Außerdem sind es noch die Chromosomenarme 3q, 4p, 8p, 11p und 18q, auf denen sich in Frage kommende Tumorgene finden lassen. Unabhängig vom Tumorstadium ist bei ca. 22 % der Harnblasenkarzinome die Region 4p16.3 deletiert. Dieser Locus befindet sich nahe dem Huntingtongen [49, 131]. Häufig zeigt sich ein 8p-LOH bei fortgeschrittenen Harnblasenkarzinomen mit schlechtem Differenzierungsgrad. Dabei sind zwei Mechanismen des LOH beteiligt. MSA und FISH Untersuchungen brachten entsprechende Ergebnisse [2]. Bei über 50 % der Harnblasenkarzinome kommen 8p-LOH vor. Da diese Alteration zudem mit dem Progress assoziiert ist, könnten weiterführende Untersuchungen sinnvoll sein. LOH an den Chromosomen 3p, 11p und 14q wird jeweils in bis zu 48, 40 und 10-40 % der Harnblasenkarzinome gefunden [52, 99, 181, 155 133]. Eine neuere Studie beschreibt Verluste an 3p mit 16,9 %, an 11p mit 31,0 % und an 14q mit 40,8 % [183]. Mit der Progression ist ein Chromosom 18q-Verlust assoziiert [16].

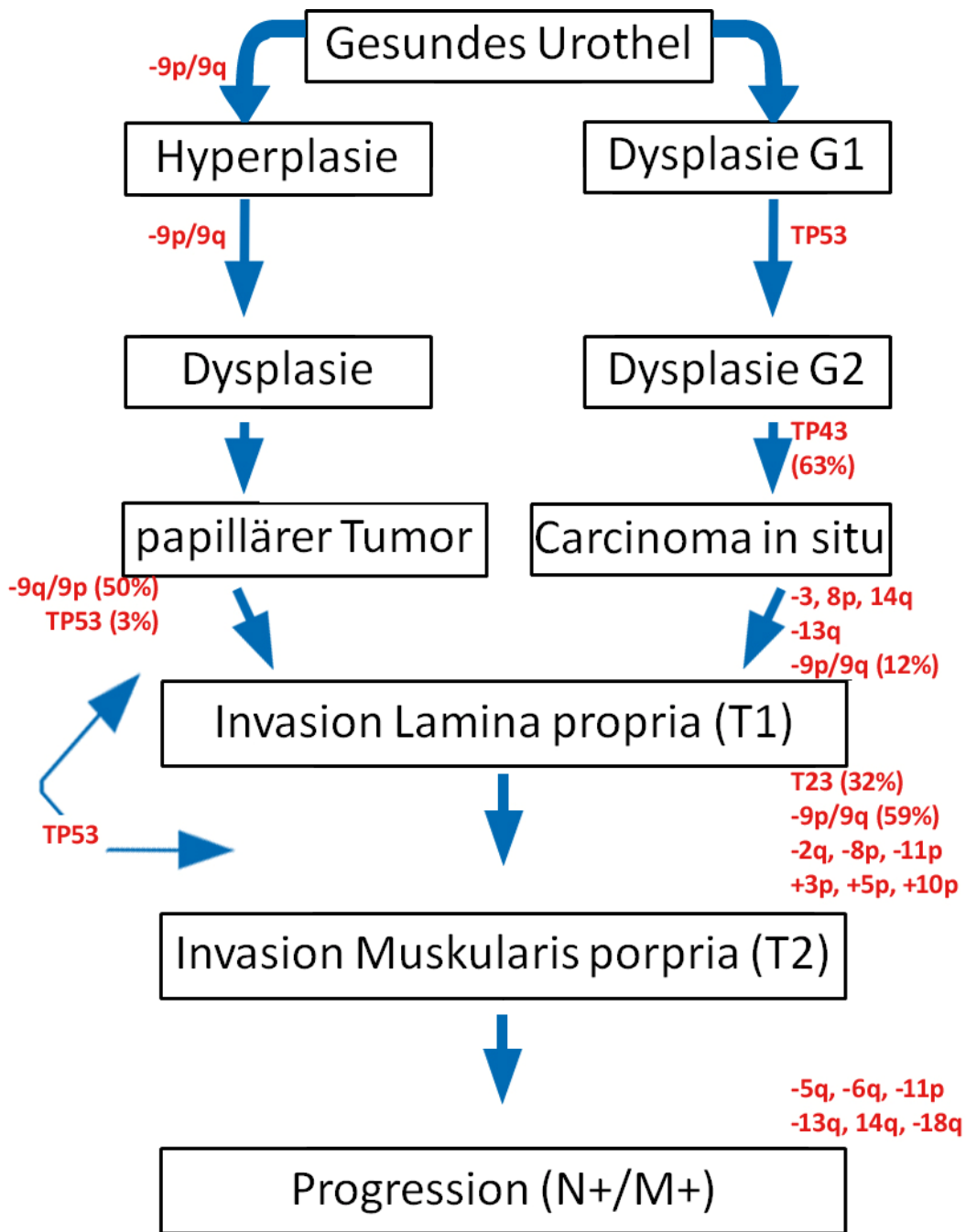


Abbildung 2: Karzinogenese des Harnblasenkarzinoms (Dalbagni, Presti, et al 1993; Spuck, Ohneseit, et al. 1994; Knowles 1999).

Untersuchungen auf molekulargenetischer Ebene beschreiben bislang zwei Entstehungswege der Progression des Transitionalzellkarzinoms der Harnblase. Der erste führt zu soliden Tumoren, wobei die Entstehung mit dem Carcinoma in situ assoziiert ist. Normales Urothel verändert sich zu flachen Atypien/Dysplasien, weiter zu in situ Karzinomen und schließlich zu invasiven Blasentumoren. Die häufigste genetische Alteration ist der Funktionsverlust von p53. Der andere Weg geht über die oberflächlichen papillären Tumore. Hierbei kommt es zu Atypien/Dysplasien des Urothels, weiter zu papillären low-grade Karzinomen und schließlich zu invasiven Karzinomen. Die häufigste Alteration ist ein LOH an Chromosom 9. Es muss bedacht werden, dass beide Entstehungswege interagieren und sich überlappen könnten. Häufig kamen LOH an 9p/q bei oberflächlichen high-grade Tumoren und bei invasiven Urothelkarzinomen vor. Die Tatsache passt weder zu dem einen noch zu dem anderen Weg. LOH an 9pq erklärt somit nicht die beiden unterschiedlichen Wege [110]. Kürzlich wurde ein anderer modifizierter Weg beschrieben. Dabei werden FGFR3 Mutationen mit einbezogen. Mutationsaktivierung von FGFR3 kommt bei Patienten mit low-grade Tumoren bzw. bei geringem Tumorstadium vor. Die Patienten haben dabei eine günstigere Prognose. Bei Tumoren mit p53 Mutationen liegen eher invasive und aggressivere Tumoren mit schlechterer Prognose vor. Beide Mutationen kommen in 80 % der Harnblasenkarzinome vor [188]. Diese beiden Möglichkeiten kommen nicht mit den gesamten genetischen Veränderungen in Einklang. In einer Arbeit wurde versucht einen gemeinsamen Nenner zu finden. Dabei wurden gut untersuchte Tumorsuppressorgene und Onkogene berücksichtigt. Abbildung 3 zeigt die Zusammenhänge.

Für die erste gemeinsame Veränderung von normalem Urothel über eine Atypie zu einer Dysplasie scheint FGFR3 verantwortlich zu sein. Es folgen nun drei unterschiedliche Wege. Der erste geht von der Dysplasie zum oberflächlichen papillären pTa Tumor, weiter über einen pT1 Tumor zum muskelinvasiven pT2 Tumor. Der zweite geht von der Dysplasie über ein Carcinoma in situ, weiter zu einem minimal invasiven Tumor und schließlich zum muskelinvasiven Tumor. Der dritte Weg geht von der Dysplasie zum papillären pT1 Tumor und weiter zum muskelinvasiven Tumor [110]. Auch dieses Modell berücksichtigt nicht alle möglichen Ansätze. Es fehlen noch entsprechende weitere Studien.

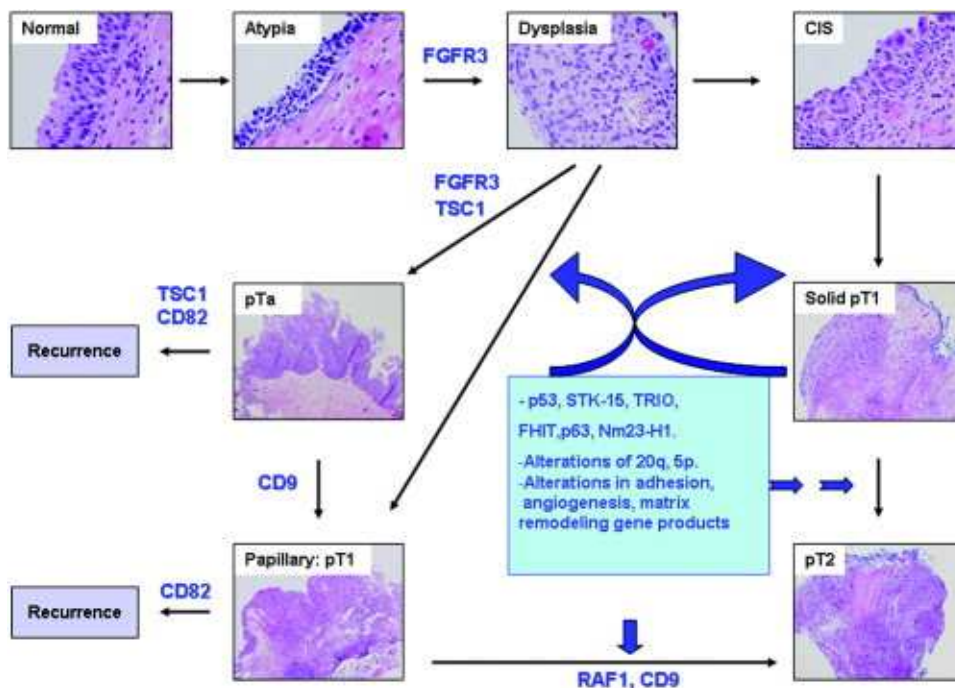


Abbildung 3: Neuer, möglicher Weg der Karzinogenese des Harnblasenkarzinoms (Mhawech-Faucecia P, Cheney RT, Schwaller J. Genetic Alterations in Urothelial Bladder Carcinoma. *Cancer* 2006; **106**(6):1205-16).

1.2. Genetische Analyseverfahren

1.2.1. Zytogenetische Analyse

1.2.1.1. Chromosomenanalyse

Die Methode der konventionellen Chromosomenanalyse erlaubte am gesamten Chromosomensatz Untersuchungen zur Zytogenetik urologischer Tumoren. Jedoch konnten bislang nur mikroskopisch sichtbare Veränderungen dargestellt werden. Das sind mitunter Monosomien, Polysomien, größere Duplikationen, größere Deletionen und größere Translokationen.

1.2.1.2. Fluoreszenz in situ Hybridisierung (FISH)

Werden ausgewählte DNA-Sequenzen mit fluoreszierendem Farbstoff markiert und anschließend mit Metaphasechromosomen hybridisiert, ist es möglich, diese nach erfolgreicher Bindung an komplementäre DNA-Stränge sichtbar zu machen. Mit dieser Technik bietet sich die Möglichkeit, tumorassoziierte Loci auf subchromosomaler Ebene aufzuzeigen. Auf den chromosomalen Abschnitten werden Deletionen und Zugewinne sichtbar. Leider kann bei dieser Methode nur die Allelzahl bestimmt werden [7, 10, 38, 55, 109, 135, 136, 146, 148, 170, 18, 50, 116, 150, 190, 192, 197].

1.2.1.3. Komparative genomische Hybridisierung (CGH)

Bei der CGH wird differentiell markierte genomische Tumor-DNA mit gesunder DNA vermischt und hybridisiert. Durch unterschiedliche Fluoreszenzintensität der Metaphasen-Chromosome zeigen sich verschiedene chromosomale Regionen der Tumor-DNA. Einige dieser Regionen konnten als Progressionsmarker gewertet werden [11, 78, 115, 132, 138, 139]. Mit dieser Technik können größere Serien in Paraffin eingebetteter Proben untersucht und

computerassistent ausgewertet werden. Mit dieser Methode ist wie bei der FISH nur die Ermittlung der Allelzahl möglich.

1.2.2. Molekulargenetische Analyse

1.2.2.1. Mikrosatellitenanalyse (MSA)

Neue Möglichkeiten auf molekularbiologischer Ebene zu arbeiten bietet die Polymerase-Kettenreaktion (PCR). Diese Technik erlaubt es, ausgewählte DNA-Sequenzen gezielt zu vervielfachen. Nach Amplifikation von Mikrosatelliten-DNA können die entstandenen Produkte mittels Gelelektrophorese getrennt werden. Bei den Mikrosatelliten handelt es sich um repetitive Sequenzfolgen, die nicht-kodierend sind. Die repetitiven Sequenzen bestehen aus Di-, Tri- oder Tetranukleotidrepeats. Die Anzahl der Wiederholungen der Sequenzen ist variabel, damit sind sie polymorph. Haben mütterliches und väterliches Allel eine unterschiedliche Anzahl repetitiver Sequenzen, ist der Locus heterozygot. Demnach steht die gleiche Anzahl für homozygot. Kommt es zum Verlust eines Allels, nennt man dieses Ereignis Loss of Heterozygosity (LOH). Mit ca. 70-90 % sind die meisten Mikrosatelliten heterozygot, nur diese sind einer Analyse dienlich. Die Mikrosatelliten werden nach Amplifikation mittels PCR gelelektrophoretisch getrennt, die für Heterozygotie typischen Doppelbanden werden sichtbar. Mit Lasersequenziergeräten können die fluoreszierenden PCR-Produkte sowohl quantitativ als auch qualitativ dargestellt werden. Mit der MSA lassen sich Veränderungen der Tumor-DNA nachweisen, das sind insbesondere Verluste (Deletionen, LOH) als auch Zugewinne genetischen Materials (Duplikationen, Trisomien) und Längeninstabilitäten. Jedoch lassen sich diese Veränderungen nur darstellen, wenn gesunde DNA aus Lymphozyten mituntersucht wird. Als allelische Imbalance (AI) werden Veränderungen des DNA-Gehalts der einzelnen Allele zueinander im Vergleich zur mituntersuchten gesunden DNA bezeichnet. Unter Hilfe von nur zwei Mikrosatellitenmarkern pro Chromosom wurde mit dieser Methode bereits eine Allelotypisierung vorgenommen [87]. Da Mikrosatelliten auf den Chromosomen verteilt vorliegen,

kann die MSA zur Kartierung benutzt werden, wenn für das zu untersuchende Chromosom eine Vielzahl von Mikrosatellitenmarkern eingesetzt wird [12, 25, 26, 32, 59, 63, 125, 127, 161, 180, 195].

Um neue Tumorgene zu klonieren, werden Mikrosatelliten-Kartierungsuntersuchungen als Ausgangsuntersuchung verwendet. Auf 9q wurde beim Harnblasenkarzinom die Region soweit eingegrenzt, dass ein potentiell TSG identifiziert werden konnte [60, 64, 94]. Die herausragende Rolle dieses Genortes konnte durch zahlreiche Arbeiten in der Vergangenheit und in neuen Studien immer wieder bestätigt werden [1, 114].

Es sind nur kleine Mengen DNA notwendig, um die MSA erfolgreich durchzuführen und damit DNA-Alterationen effizient aufzuzeigen. Schon beim Nierenzellkarzinom gelang es, Alterationen im Serum zu detektieren [86]. Auch beim Harnblasenkarzinom konnten hier signifikante Ergebnisse erzielt werden.

Die Mikrosatellitenanalyse beim Harnblasenkarzinom wies eine hohe Sensitivität und Spezifität der Serum- und Urinuntersuchungen auf. Dabei waren die erzielten Ergebnisse stadienunabhängig [84]. Andere Arbeitsgruppen konnten weniger gute Ergebnisse erzielen. Grund hierfür könnte die zu geringe Anzahl an verwendeten Mikrosatellitenmarkern sein. Auch die geringe Patientenzahl kann dabei eine Rolle spielen. Außerdem waren die Ergebnisse nicht stadienunabhängig [177].

1.2.2.2. DNA-Sequenzierung

Zur Sequenzierung des Genoms wird die molekulare Struktur der DNA-Stränge aufgeschlüsselt und die Reihenfolge der vier Basenpaare Adenosin (A), Thymin (T), Cytidin (C) Guanosin (G) dargestellt. Die Basenpaare sind komplementär (A-T und C-G). Aufgrund der Doppelhelixstruktur, aus zwei komplementären DNA-Strängen bestehend, können beide Sequenzen der DNA sequenziert werden. Computergestützte Geräte kommen dabei zum Einsatz. Diese registrieren Fluoreszenzmarkierungen der gelelektrophoretisch aufgetrennten PCR-Produkte. Abbildung 4 zeigt eine aufgeschlüsselte DNA-Sequenz des p53 Tumorsuppressorgens mit einer Punktmutation einer einzelnen Base, die zu einem veränderten Genprodukt führt, wenn zudem nach der Knudson'schen

Zwei-Treffer-Theorie das andere Allel durch eine Deletion inaktiviert wurde. Erstmals wurde 1982 eine Punktmutation im ras-Onkogen einer Blasenkarzinomzelllinie identifiziert [178].

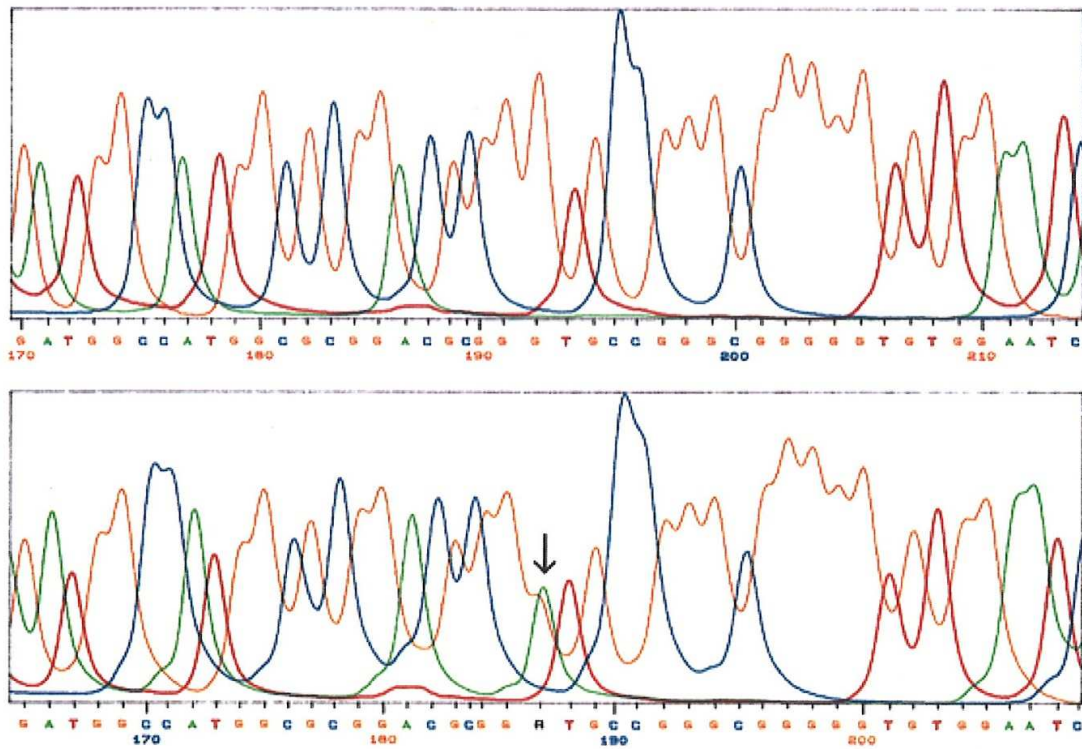


Abbildung 4: Dieses Beispiel der Firma Amersham-Parmacia Biotech zeigt eine Punktmutation an P53.

Der Nachweis einer Assoziation von P53-Mutationen mit invasiven Blasenkarzinomen gelang Sidransky et al. 1991. Auch zeigte sich in dieser Studie, dass am Blasenkarzinom Erkrankte in 1-7 % der untersuchten Fälle die gleichen P53-Mutationen aufweisen [158]. Neue Studien konnten die Funktion von p53 in Verbindung mit dem Retinoblastoma Gen bestätigen [112].

Von besonderer Bedeutung ist der Nachweis tumorspezifischer DNA-Alterationen im Urin, also in einer Körperflüssigkeit. Da urologische Tumore keine signifikant höhere Inzidenz an Genmutationen im Primärtumor (Clustering) aufweisen, können spezifische Mutationen schlecht zur Tumordetektion genutzt werden. Bei anderen Tumoren mit Clustering können mutationsspezifische PCR-Verfahren die Sequenzierung teilweise ersetzen.

Neu ist die Anwendung epigenetischer Marker. Die Promoterhypermethylierung von CpG Inseln ist deutlich mit der Tumorentstehung aber auch mit der Prognose des Harnblasenkarzinoms assoziiert. Methylierungsmarker könnten zukünftig nichtinvasiv die Urinzytologie und die invasive Zystoskopie ergänzen [82, 83].

1.2.2.3. Microarrays

Mit den Microarrays stehen der Wissenschaft neue molekulargenetische Methoden zur Verfügung. Sie werden auch als Biochips oder Genchips bezeichnet. Dabei können eine Vielzahl von Tests auf einem kleinen Medium in kurzer Zeit bearbeitet werden. Mehrere Untergruppen werden dabei unterschieden: DNA-Microarrays, Tissue-Microarrays, Transfektions-Microarrays und Protein-Microarrays.

Unter Hilfe der Methode konnten auch Biomarker beim Harnblasenkarzinom identifiziert und experimentell genutzt werden [122]. Der Nutzen im klinischen Alltag muss noch durch entsprechende Studien verifiziert werden [142, 153]. Die Entwicklung der Microarrays sowie deren Anwendung wird in den nächsten Jahren weiter vorangetrieben werden, da durch die komplexen Möglichkeiten genauer, schneller und damit ökonomischer gearbeitet werden kann. Jedoch ist eine Intensivierung der Zusammenarbeit von Medizinern, Biologen und Informatikern nötig [47, 191].

1.3. Tumormarker

1.3.1. Konventionelle Tumormarker

Für eine begrenzte Zahl von Malignomen werden Tumormarker eingesetzt. Vor allem in der Frühdiagnostik und in der Tumornachsorge haben diese Marker einen hohen Stellenwert. Aus urologischer Sicht ist besonders das prostataspezifische Antigen (PSA) hervorzuheben, welches als Tumormarker einen wichtigen Platz in der Früherkennung und Nachsorge beim Prostatakarzinom eingenommen hat. Beim Harnblasenkarzinom gibt es bislang keine Marker, welche für sich allein mit ausreichender Sicherheit im klinischen Alltag nutzbar sind. Nach transurethraler Blasentumorresektion besteht die Möglichkeit, Rezidive mittels Urinzytologie als nichtinvasive Methode neben bildgebenden Verfahren und der Zystoskopie zu detektieren. Jedoch ist die Sensitivität der zytologischen Untersuchung mit 17-38 % bei pTaG1-Tumoren relativ gering [194].

Aus diesem Grund wäre ein zuverlässiger serologischer Marker eine sinnvolle Ergänzung zu den konventionellen Methoden. Bei konsequenter Nutzung eines solchen Markers könnten die zur Verfügung stehenden Behandlungsmodalitäten des Harnblasenkarzinoms gezielter eingesetzt werden.

1.3.2. Molekulare Tumormarker

1.3.2.1. DNA basierter Nachweis zellgebundener Tumor-DNA

Der Nachweis von zellgebundener DNA in Körperflüssigkeiten wie Blut basiert auf Methoden, die zum Nachweis von genetischen Alterationen am Tumorgewebe etabliert wurden. Auf diese Weise konnten Zusammenhänge bei der Tumorentstehung gezeigt werden [21, 39, 42, 43, 53,90, 92, 143, 157, 163, 167, 171, 173].

1.3.2.2. DNA basierter Nachweis zellfreier Tumor-DNA in Serum und Plasma

Mittlerweile existieren Methoden, um auch bei frei im Serum zirkulierender DNA tumorspezifische Alterationen nachzuweisen. Leon und Mitarbeiter stellten bei onkologischen Patienten erhöhte Serumkonzentrationen von DNA fest. Nach entsprechender Therapie kam es dann zu einem Abfall der Serumkonzentrationen der DNA [98]. Da auch bei gutartigen Tumoren erhöhte Konzentrationen nachweisbar sind [91, 96, 181], war es hilfreich, Merkmale von Patienten mit Malignomen herauszuarbeiten [174]. Hohen Stellenwert hat die Mikrosatellitenanalyse bei der Detektion tumorspezifischer DNA-Alterationen, wie Chen et al. in Studien über kleinzellige Bronchialkarzinome zeigten [13, 30, 121]. Sidransky gelang der Nachweis tumorspezifischer DNA beim Nierenzellkarzinom und konnte auch im Urin dieser Patienten mit den gleichen Markern DNA nachweisen [48]. Die angewandten Methoden besitzen eine hohe Sensitivität, da sich bei Gesunden nur 10 bis 30 ng/l freie DNA nachweisen lassen und bei Karzinompatienten Werte von 180 bis 400 ng/l erreicht werden [97, 98, 152, 172]. Jedoch eignet sich das Verfahren nicht zur Prognose, sondern eher zur Früherkennung, da keine Assoziation zu Tumorstadien bestand [56, 119, 160, 164, 165].

2. Zielsetzung und Fragestellung

In dieser Arbeit sollen Marker für das Harnblasenkarzinom gefunden werden, welche in Serum und Plasma vorkommen und zudem mit dem Progress der Erkrankung assoziiert sind. Mit Hilfe dieser Marker könnte die konventionelle Diagnostik des Harnblasenkarzinoms sinnvoll ergänzt werden. Zudem könnten Aussagen über den Progress gemacht werden.

Mit der Mikrosatellitenanalyse wurden folgende Untersuchungen durchgeführt:

- Anwendung der Mikrosatellitenanalyse zur Allelotypisierung des Marburger Patientengutes mit Harnblasenkarzinom.
- Identifikation progressionsassoziierter chromosomaler Regionen.
- Detektion von Serum-DNA-Alterationen mittels Mikrosatellitenanalyse.
- Sensitivität der Methode für die Serumdiagnose beim Harnblasenkarzinom.
- Tumorspezifität der identifizierten Serum-DNA-Alterationen.
- Korrelation des Nachweises von Serum-DNA-Alterationen mit Tumorstadium und Differenzierungsgrad.
- Identifikation von Mikrosatellitenmarkern mit höchster Sensitivität für die Serumdiagnose.
- Durchführung eines Followup über einen Zeitraum von 5 Jahren, um verlässlichere Aussagen über den Progress des Urothelkarzinoms der Harnblase machen zu können.

3. Material und Methode

3.1. Allgemeines

An unserer Klinik wurden von 1999 bis 2001 bei n=58 Patienten mit Harnblasenkarzinom, die operiert wurden, Blut- und Tumorproben entnommen. Die Anzahl der Patienten setzt sich aus 48 Männern und 10 Frauen zusammen. Die Patienten kamen überwiegend aus Marburg Stadt sowie dem Landkreis Marburg Biedenkopf. Die Zuweisung erfolgte durch die dort niedergelassenen Urologen. Die Diagnostik erfolgte teilweise bereits durch diese. Nach Diagnosestellung wurde das entsprechende Staging durchgeführt. Danach konnten die Patienten operiert werden. Durch das pathologische Institut des Klinikums wurden die Tumore anhand der aktuell gültigen TNM-Klassifikation eingeteilt.

Tabelle 1 zeigt die Verteilung der Tumore nach der TNM-Klassifikation sowie das Grading.

Stadium	G1	G2	G3	Gesamt
pTa	14	12	-	26
pTis	-	-	1	1
pT1	2	8	-	10
pT2	-	4	8	12
pT3a	-	2	4	6
pT3b	-	1	1	2
pT4a	-	-	1	1
	16	27	15	58

Tabelle 1: Histopathologische Einteilung der Harnblasenkarzinome.

Zur Dokumentation aller nötigen Patientendaten wurde das Programm Filemaker eingesetzt. In eine Maske wurden die entsprechenden Daten eingegeben:

- Patientenidentifikationsnummer der Klinik, Probennummer, Name, Geburtstag, Geschlecht, Adresse, Telefonnummer
- Hausarzt, zuweisender Urologe
- Datum der Erstdiagnose, Alter bei Erstdiagnose, Tumorstadium bei Diagnosestellung
- Anzahl der Rezidive mit Datum und Tumorstadium, Dauer bis Rezidiv, Ausbreitung (z.B. multifokal)
- Operationsdatum, Alter des Patienten bei Operation, Operationsverfahren (transurethrale Resektion/radikale Zystektomie), postoperative Histologie
- Bemerkungen (in besonderen Fällen)
- Followup (ja/nein), Datum der letzten Nachsorge, Verlauf (Vollremission, stable Disease, Progress, Exitus mit Datum und Todesursache)
- Chromosomenveränderungen

Neue Einträge wurden durch das Programm automatisch gespeichert.

Initial wurden die präoperativen Daten eingegeben, dann die postoperativen und im Anschluss an die Laborarbeit die Ergebnisse der Mikrosatellitenanalyse. Schließlich konnte das Followup hinzugefügt werden.

Die Eingabemaske liegt als Abbildung vor.

PID Name . Geburtstag

Probennummer PLZ Ort Straße

Patho: Tel.: Eingabe komplett

Calbete DN*

Hausarzt PLZ Ort

Straße Telefon

Urologe PLZ Ort

Straße Telefon

Erstdiagnose Datum Alter bei Erstdiagnose [Jahre]

Geföschit pT pN M G Diagnosesicherung

Rezidive	Anzahl	Rezidiv pT	Rezidiv G	Rezidiv Datum	Dauer bis Rezidiv
Multifokal	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/> [Monate]
					<input type="text"/> [Monate]
					<input type="text"/> [Monate]
					<input type="text"/> [Monate]
					<input type="text"/> [Monate]
					<input type="text"/> [Monate]
					<input type="text"/> [Monate]
					<input type="text"/> [Monate]
					<input type="text"/> [Monate]
					<input type="text"/> [Monate]

OP Datum Alter bei OP

OP Art Tumorasservierung

OP Histologie OP pT pN M G

Bemerkungen

Followup

Letzte Nachsorge Exitus

Verlauf Exitus Datum

Chromosomenmutation Urin-Diagnose Serum-Diagnose

	3p	5p	5q	8p	8q	9p	9q	11p	13q	14q	16q	17p	17q	20p	20q	p53
Urin	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Serum	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

Serum-DNA-Konz. Mittelwert *50 ng/ml

Urin-DNA-Konz. Mittelwert

Abbildung 5: Eingabemaske von Filemaker.

3.2. Probenmaterial

Die Probenasservierung erfolgte von 1999 bis 2001 an der Klinik für Urologie und Kinderurologie der Philipps-Universität Marburg. Von jedem Patienten wurde präoperativ venöses Blut mit einer 10 ml EDTA- Monovette entnommen. Die Tumorprobe wurde intraoperativ bei der transurethralen Resektion oder bei der radikalen Zystektomie gewonnen. Wichtig war es bei der Probeentnahme darauf zu achten, Tumorgewebe nicht mit gesundem Gewebe zu mischen. So konnte sichergestellt werden, später keine falsche DNA aus den Proben zu isolieren. Die gesamten Proben von Blut und Tumorgewebe wurden mit Flüssigstickstoff schockgefroren und bei –80 Grad Celsius bis zum nächsten Arbeitsschritt aufbewahrt. Die Serum-Monovette wurde nach Zentrifugation über 10 Minuten bei 3000 g abgesert.

3.3. Methoden

3.3.1. DNA-Isolierung

Von dem asservierten Tumorgewebe wurde ein Stück mit einem Durchmesser von 5-10 mm herausgeschnitten und mit TE 9-Puffer (0.5 Tris-Cl, pH 9; 0.1M EDTA) in einer Petrischale aufgeweicht. Aus dem Gewebe konnten die Tumorzellen vom Stromagewebe abgeschabt werden. Nach Resuspension der Tumorzellen in 5 ml TE 9-Puffer und in 2 % igem Natriumdodecylsulfat (SDS) wurden diese mit 0,5 mg/ml Proteinkinase-K für mindestens drei Stunden bei 56 Grad Celsius inkubiert. Die DNA wurde mit der konventionellen Phenol-Chloroform-Methode extrahiert und nach Ethanol-Präzipitation in TE1-Puffer (10 mM Tris-C1, pH 7,5; 1mM EDTA) gelöst. Auf gleiche Art und Weise erfolgte die Isolierung gesunder DNA aus Lymphozyten und Vollblut. Die DNA der Serumproben wurde mit einem Fertig-Kit (QIAmp Midi-Kit, Qiagen, Hilden Deutschland) isoliert. Zur Gewinnung von Serum-DNA wurden die Serummonovetten für 10 Minuten bei 3000g zentrifugiert. Der Extraktion wurden

2-4 ml des klaren Überstandes zugeführt. Vor dem nächsten Arbeitsschritt wurde die isolierte DNA bei -20 Grad Celsius gelagert.

3.3.2. Mikrosatellitenanalyse

Zum Auffinden der DNA-Alterationen von Tumorgewebe und Serum wurden 17 hochpolymorphe Marker der chromosomalen Regionen 5q, 8p, 9p, 9q, 13q, 14q, 17p, 17q und 20q (D5S1720, D5S476, D8S261, D8S171, D9S925, D9S15, D13S153, D14S750, D14SS61, D14S267, D17S799, D17S1306, D20S486, D20S607, D20S481, D20S480) benutzt. Aus den Genom-Datenbanken im Internet unter <http://gai.nci.nih.gov/html-chlc/ChlcMarkers.Html>, http://www-genome.wi.mit.edu/cgi-bin/contig/sts_info?sts oder <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=unists> wurden die Primer-Sequenzen übernommen. Bei den Primern wurde ein hoher Anteil mit Tri- und Tetranukleotidrepeats ausgewählt, da sie durch den größeren Abstand der beiden Allele reinere Ergebnisse liefern. In Tabelle 2 sind diese Mikrosatellitenmarker aufgeführt.

Chromosome	Markername	Mikleotid Repeat ¹	Produktgröße ²	Sequenzen ³ (5' – 3')
5q	D5S476	CA	176	F: CCTCCTGACAGCAGATATGA, R: CTGAGGCTCTCCTCGGGTGT
	D5S1720	GATA	220	F: TCCCAACAAGTCATTTGGT, R: TAGCTCCCAACAATCATGTGA
8p	D8S261	CA	143	F: TGCCACTGCTTGAAAAATCC, R: TATGGCCCCAGGAAATGTGTAT
	D8S560	CA	143	F: GGCAATTCAGAGGACC, R: TATGGCCCCAGCAATGTGTAT
9p	D9S171	CA	158	F: AGCTAAGTGAACCTCATCTCTGTCT, R: ACCCTAGCACTGATGGTATAGTCT
	D9S925	GATA	167	F: TGTGAGCCCAAGGCCTTATAG, R: GTCTGGGTTCTCCAAAGAAA
9q	D9S15	CA	221	F: AGCATTGTTTCATGTTGGTG, R: TTCACITGATGGTGGTAAATC
13q	D13S153	CA	221	F: AGCATTGTTTCATGTTGGTG, R: CAGCAGTGAAGGTTAAAGCC
	D14S750	GGAA	164	F: ATTCTTCTCCCAAGAAATGCC, R: CAAGTCTCAAGAGGTAGAAGTGC
14q	D14S61	CA	198	F: CCTGCTAAAAAGTCAAGTGGG, R: AATGGCCGATCAGAGAGGAA
	D14S267	CA	224	F: TTAATGCCCACTGAATGCT, R: AAGGCAGCCCTGGTTT
17p	D17S799	CA	185	F: ATTGCCAGCCGTCAGTT, R: GACCAGCATATCATTATAGAGAAGC
17q	D17S1306	GGAA	179	F: TTATGCACAAGGAGTTGCA, R: ATGGTTGTATTCTTACTCCTCCTCC
	D20S486	GGAA	243	F: GAAGGGCTTTAAATGTTTCAGTG, R: AGAAGCCTTGGAGAACCATT
20q	D20S607	GATA	198	F: AAAATGTCAGGCAACAGAG, R: ATTGACAAAATTTCTGGGGCTG
	D20S481	GATA	233	F: TGGGTTATGAGTGCACACAG, R: AACAGCAAAAAGACACACAGC
	D20S480	GATA	302	F: GTGGTGAACACCAATAAATGG, R: AAGCAAAATAAAACCAATAAACTCG

1: F = Forward primer, R = Reverse primer-Sequenz;

3: A = Adenosin, T = Thymin, C = Cytidin, G = Guanosen

2: Produktgröße in Basenpaaren (bp);

Tabelle 2: Verwendete Mikrosatellitenmarker.

3.3.3. Polymerasekettenreaktion mit fluoreszierenden Primern

Cy5 (blau) wurde als Fluoreszenzmarker genutzt. Folgende PCR-Konditionen wurden bei allen Mikrosatellitenprimern genutzt:

50-100 ng Normal-, Tumor- oder Serum-DNA wurden in 10 Mikroliter PCR-Reaktionen mit 50mM KCL, 10 mM Tris-Cl pH 8,3, 1.5 mM MaCl₂, 10pMol „Forward“-Primer (Cy-5-fluoreszenzmarkiert), 10pMol „reverse“-Primer, 0.01 % BSA und 0.5 U Taq DNA Ploymerase (Promega Madison, Wisconsin, USA) eingesetzt. Die PCR-Amplifikationen wurden unter den gleichen Konditionen für alle Mikrosatellitenmarker in einem PTC 100 Thermocycler (MJ-Research, Watertown, Massachusetts, USA) durchgeführt, mit einer initialen Denaturierung bei 94 Grad Celsius für 2 Minuten, gefolgt von jeweils 28 Zyklen mit 40 Sekunden bei 95 Grad Celsius, 30 Sekunden bei 55 Grad Celsius gefolgt von 40 Sekunden bei 72 Grad Celsius. Nach einer abschließenden Extension wurden bei 72 Grad Celsius für 10 Minuten 30 Mikroliter Stop-Lösung (50 mM EDTA und 5 mg/ml Dextran Blau 2000 in 100 % deionisiertem Formamid) jedem Reaktionsgemisch hinzugefügt.

3.3.4. Laserdetektion der PCR-Produkte

Die Fluoreszenzmarkierung der PCR-Produkte erfolgte mit dem Fluoreszenzfarbstoff Cy 5.

Bei dieser hochsensitiven Methode kann auf radioaktive Marker verzichtet werden. Die Eignung des Verfahrens wurde durch zahlreiche Publikationen der Arbeitsgruppe von Prof. Kovacs, Heidelberg dokumentiert [20,32, 130].

Für die Laserdetektion der PCR-Produkte wurden 4 Mikroliter der PCR-Produkte auf einem 8 % Polyacrylamidgel (Reprogel „Long Read“, Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) bei konstant 1500 V, 60 mA, 30 W und 55 Grad Celsius Geltemperatur in 0,5 TBE Puffer für 5 Stunden in 200 Gelkassetten elektrophoretisch aufgetrennt.

Die Fragmentanalyse erfolgte in einem automatischen Laser-Sequenziergerät (ALFexpressII, Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg. Abb. 6, 7). Die erhaltenen Rohdaten wurden mit Hilfe der „Fragment Manager“ Software (FM

1.2, Pharmacia Biotech) ausgewertet. Die Prinzipien der Laserdetektion von fluoreszenzmarkierten PCR-Produkten sind in Abbildung 8 dargestellt.

Die Banden laufen bei der Methode in herkömmlicher Weise über die Gele. Jedoch werden diese fluoreszierenden Banden nicht bloß abfotografiert. Bei dieser Methode werden die Banden mittels Laser detektiert. Ein entsprechendes Programm errechnet aus den gewonnenen Daten eine Kurve. Bei gleicher Laufrichtung der einzelnen Banden laufen diese unterschiedlich weit. Werden die Banden abfotografiert, erhält man nur ein eindimensionales Bild. Das automatische Sequenziergerät errechnet zweidimensionale Kurven.

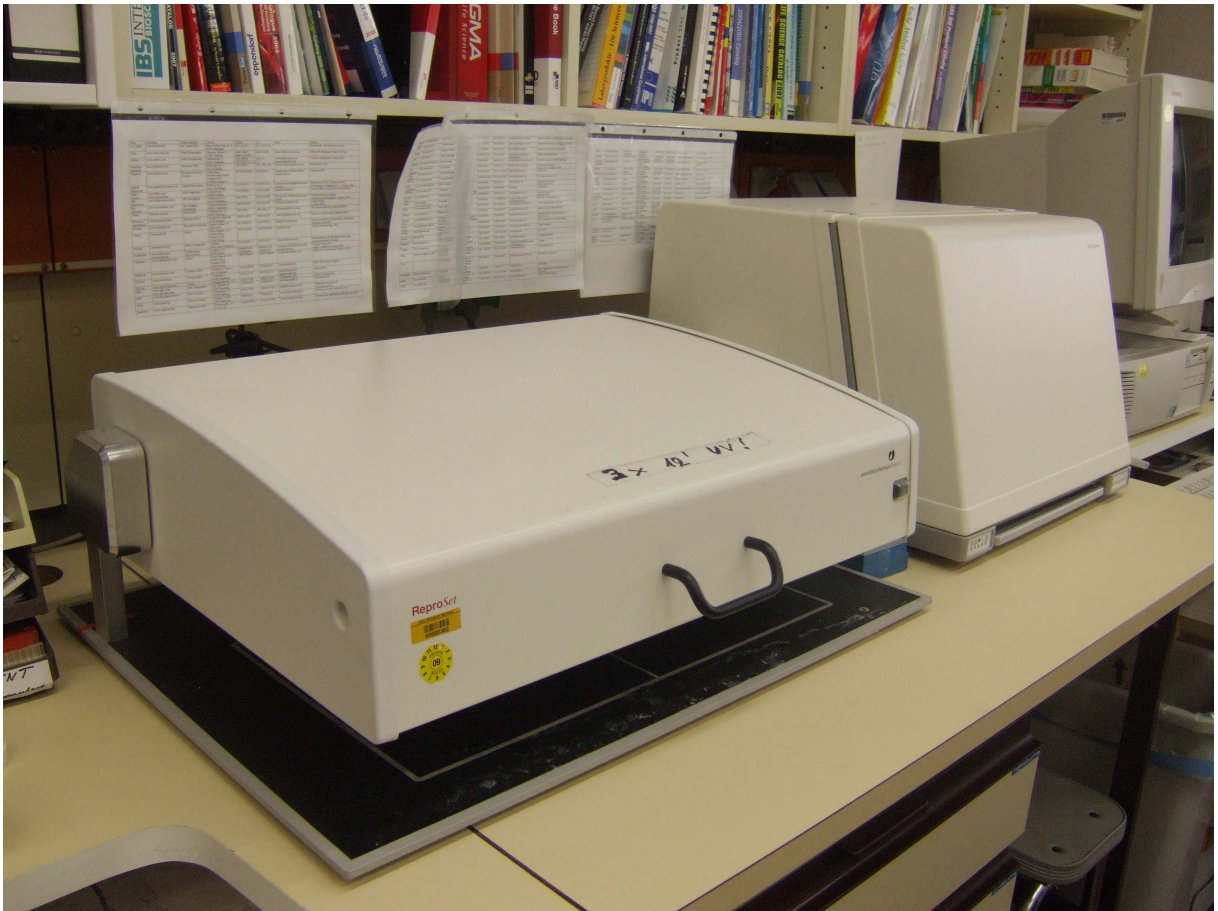


Abbildung 6: Sequenziergerät ALFexpressII.

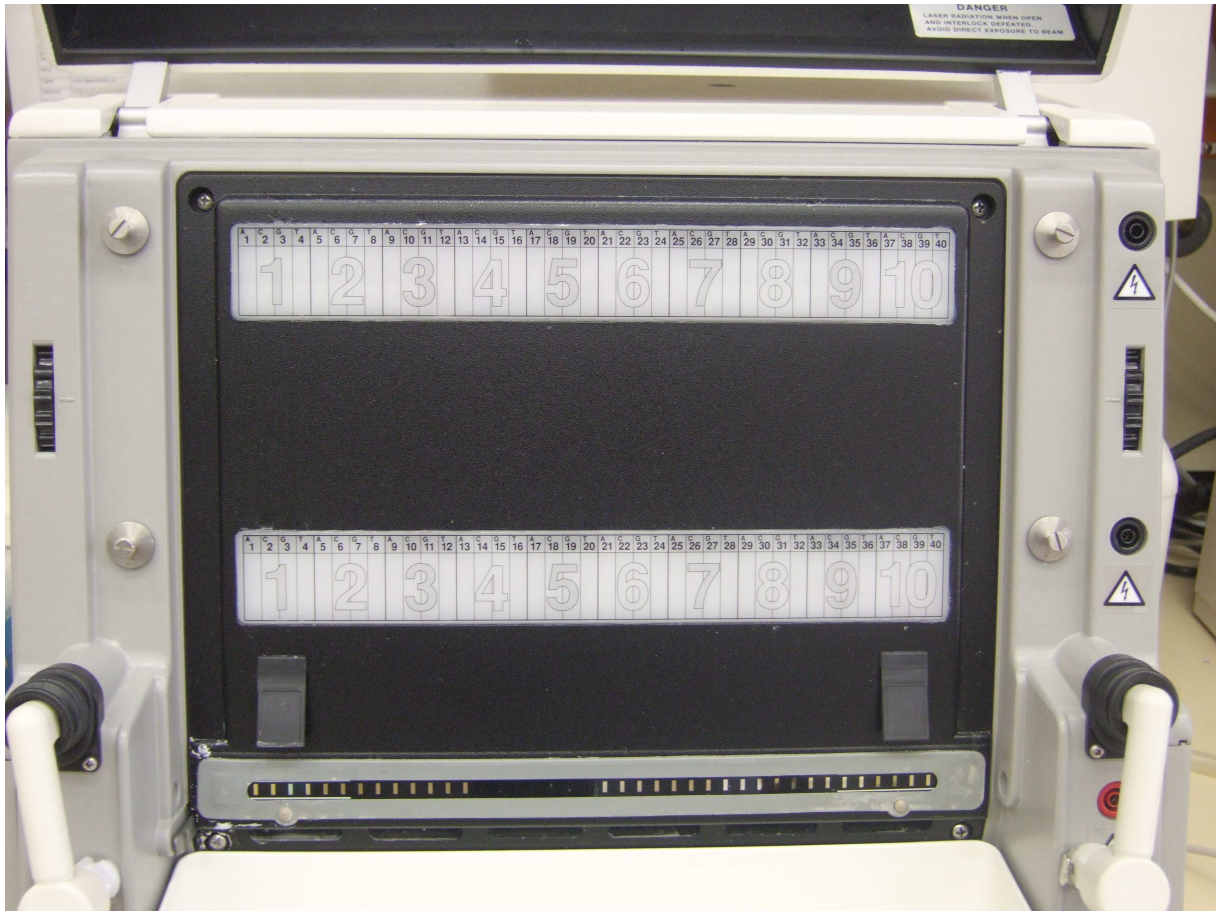


Abbildung 7: Innenansicht Sequenziergerät ALFexpressII. In die Metallklammern wird eine gelgefüllte Doppelglasplatte eingelegt. Darin laufen die Banden und werden mittels Laser detektiert.

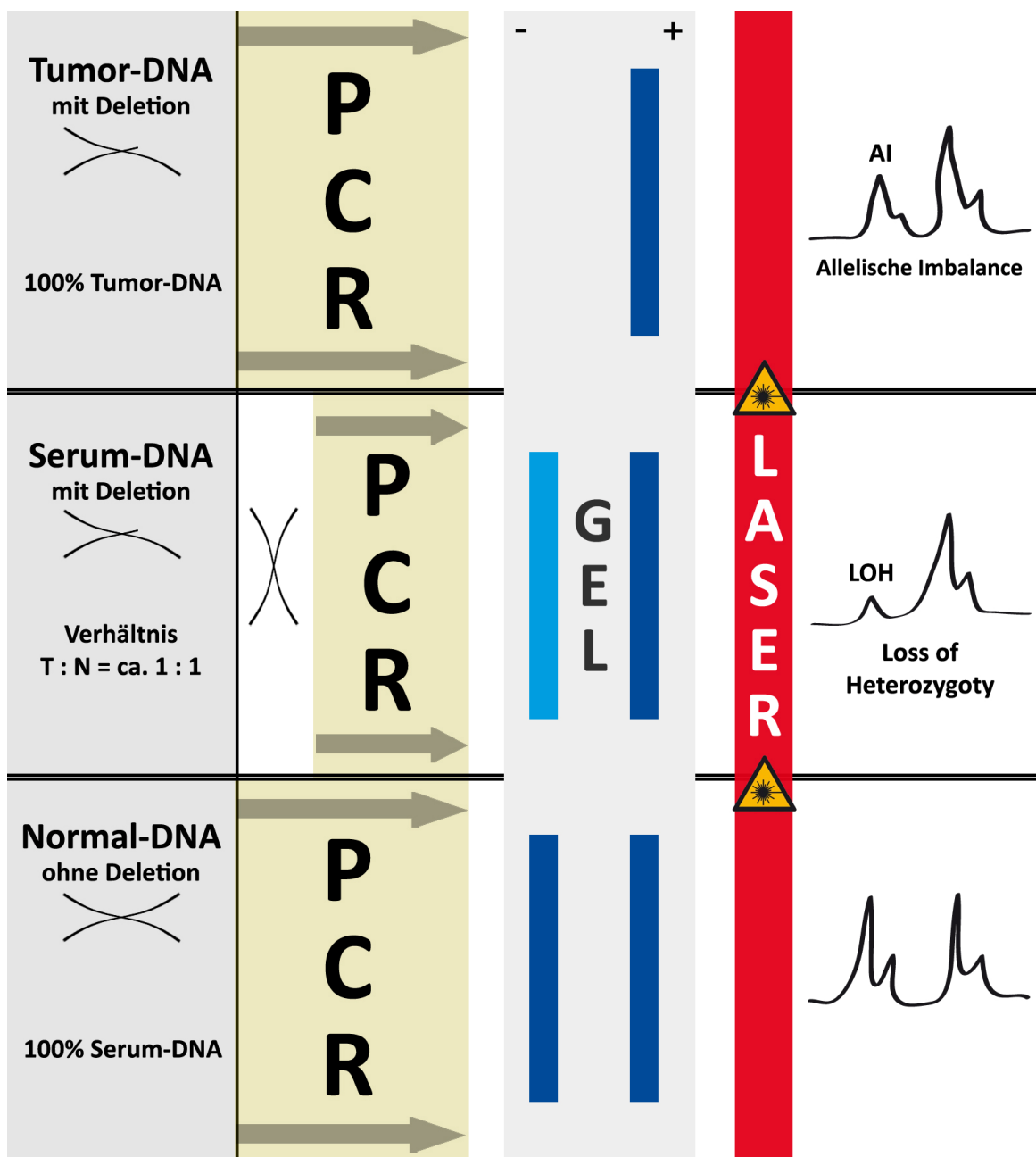


Abbildung 8: Prinzip der DNA-Sequenzierung.

3.3.5. Followup

Fünf Jahre nach Beginn der Studie wurde das Followup durchgeführt. Die durchschnittliche Followupzeit betrug 44,7 Monate. Die gesamte Zeitspanne betrug 1-81 Monate. Zu Beginn der Studie standen 58 Patienten zur Verfügung, deren Daten erhoben werden konnten. Die entnommenen Blutproben sowie das asservierte Tumormaterial wurden analysiert.

Die ausgewerteten Daten zeigten Assoziationen zwischen Allelverlust und Tumorstadium sowie schlechter Kerndifferenzierung.

Nach fünf Jahren war es nötig, den klinischen Verlauf zu untersuchen. Hierbei sollte überprüft werden, ob beschriebene tumorassoziierte Alterationen Aussagen über den Progress erlauben.

Nach erfolgter transurethraler Resektion oder radikaler Zystektomie wurden die Patienten durch unsere Klinik, zum großen Teil aber von niedergelassenen Urologen, im Rahmen der onkologischen Nachsorge kontrolliert. Zur Erlangung der Daten mussten die niedergelassenen Urologen aufgesucht werden, um gezielt die nötigen Informationen zu sichten und zu dokumentieren. Von 50 der insgesamt 58 Patienten konnten verwertbare Daten erhoben werden. Diese Daten wurden in die Maske des Programms Filemaker eingefügt.

Bei Patienten mit Progress bzw. in finalen Stadien wurde die palliative Betreuung häufig durch die entsprechenden Hausärzte übernommen. In diesen Fällen wurden die Hausärzte kontaktiert, um Todesursache und Todeszeitpunkt zu erfragen und zu dokumentieren.

Die erhobenen Daten konnten dann ausgewertet werden. Diese werden im Ergebnisteil dargestellt.

Als Fragestellung stand die Assoziation zwischen Allelverlust und Tumorprogress im Mittelpunkt.

3.3.6. Statistik

Der Student's Test und der Mann-Whitney-Test wurden zur Identifikation potentieller Assoziationen von bestimmten genetischen Alterationen mit klinisch-pathologischen Prognoseparametern sowie dem Nachweis von Serum-DNA Alterationen mit klinisch-pathologischen Prognoseparametern angewandt. Als signifikant wurde ein p-Wert von kleiner gleich 0,05 bewertet. Mit der StatView 4.51 Software für Macintosh- Systeme wurde die Statistik erstellt.

4. Ergebnisse

4.1. Inzidenz genetischer Alterationen und Assoziationen mit klinisch-pathologischen Prognoseparametern

Die Analyse der Inzidenz genetischer Alterationen erfolgte mit 17 polymorphen Mikrosatellitenmarkern der chromosomalen Regionen 5q, 8p, 9p, 9q, 13q, 14q, 17p, 17q und 20q (Tabelle 3). Dabei zeigten sich Alterationen an 5q, 8p, 9p und 9q mit 43 bis 53%. Am Chromosom 20q zeigten sich Alterationen mit 57%. Zwischen nichtinvasiven pTa Tumoren und invasiven pT1-4 Tumoren zeigten sich signifikante Unterschiede der Alterationsinzidenzen und Alterationshäufigkeiten. Ebenso wurden signifikante Unterschiede zwischen den gut differenzierten G1 Tumoren und den schlecht differenzierten G2 und G3 Tumoren auffällig, was Alterationsinzidenzen und Alterationshäufigkeiten betrifft. Mit schlechter Kerndifferenzierung und invasivem Tumorwachstum waren Alterationen an den chromosomalen Regionen 5q, 14q und 17p assoziiert (Tabelle 3, 4a und 4b sowie Abbildungen 9, 10 und 11).

Chromosom. Reg. mit LOH	Assoziation mit		
	fortgeschrittenem Tumorstadium	Differenzierungsgrad	Lymphknoten Metastasen
5q	0,0125	0,0389	0,788
8p	0,079	0,0405	0,398
9p	0,819	0,8693	0,499
9q	0,257	0,619	-
13q	0,031	0,152	0,232
14q	0,0026	0,0337	0,527
17p	0,0005	0,008	0,962
17q	0,0567	0,383	-
20q	0,267	0,622	0,741

Tabelle 3: Loss of Heterozygosity ist mit Differenzierungsgrad, lokalem Tumorstadium und Lymphknotenmetastasierung assoziiert. $p < 0,05$ wurde markiert.

Probe	pT	pN	M	G	Rezidive	multifokal	Untersuchte chromosomale Region								
							5q	8p	9p	9q	13q	14q	17p	17q	20q
98	a	0	0	1	0	Nein	○	○	■	■	○	○	×	○	○
102	a	0	0	1	0	Nein	□	○	○	×	○	○	×	○	○
121	a	0	0	1	0	Nein	○	■	■	■	○	○	○	○	□
158	a	0	0	1	0	Nein	○	■	○	■	○	○	□	×	○
128	a	0	0	1	0	Ja	○	○	○	○	○	○	×	×	○
131	a	0	0	1	0	Ja	○	○	■	×	×	○	○	○	○
84	a	0	0	1	0	Nein	○	□	○	×	○	○	○	○	○
155	a	0	0	1	0	Nein	□	○	○	○	□	○	○	×	□
120	a	0	0	1	1	Ja	○	○	□	×	○	□	□	□	□
118	a	0	0	1	2	Nein	□	○	■	■	○	○	○	○	□
133	a	0	0	1	2	Nein	○	○	○	×	○	○	○	×	□
144	a	0	0	1	2	Ja	□	■	■	■	○	○	○	×	□
148	a	0	0	1	13	Ja	○	○	□	■	○	○	○	×	○
90	a	0	0	2	0	Nein	□	■	□	×	□	○	○	×	□
116	a	0	0	2	0	Nein	○	■	○	×	○	○	○	×	○
142	a	0	0	2	0	Nein	○	○	○	■	□	○	○	×	□
135	a	0	0	2	0	Nein	○	○	■	□	○	○	○	×	□
141	a	0	0	2	0	Nein	□	○	○	■	○	○	□	×	□
114	a	0	0	2	0	Ja	○	□	○	×	○	○	○	○	□
130	a	0	0	2	0	Ja	□	○	■	■	○	□	×	○	□
94	a	0	0	2	0	Ja	○	■	○	×	○	○	×	×	○
129	a	0	0	2	1	Ja	○	○	■	■	×	○	×	×	□
154	a	0	0	2	1	Ja	×	○	■	■	○	○	○	×	○
139	a	0	0	2	1	Ja	○	□	○	×	○	□	○	×	○
127	a	0	0	2	1	Ja	×	○	■	■	○	○	○	○	○
88	a	0	0	2	3	Ja	○	□	○	×	□	○	○	○	○
99	cis	0	0	3	4	Nein	×	■	□	□	■	□	□	■	□
137	1	0	0	1	0	Ja	○	□	○	○	□	□	○	×	□
136	1	0	0	1	0	Ja	○	○	○	○	○	○	×	×	□
85	1	0	0	2	0	Ja	□	□	□	×	□	□	○	□	□
89	1	0	0	2	0	Ja	■	○	○	○	○	○	○	○	○
152	1	0	0	2	0	Ja	□	○	■	■	○	■	○	×	○
151	1	0	0	2	0	Ja	□	□	○	□	■	○	×	×	□
110	1	0	0	2	0	Nein	○	■	○	×	○	○	×	○	□
156	1	0	0	2	0	Nein	□	■	■	×	○	■	○	×	■
145	1	0	0	2	1	Nein	○	□	○	○	○	■	○	×	○
86	1	0	0	2	1	Ja	○	□	○	■	○	□	○	○	□
117	2	0	0	2	2	Nein	□	■	□	□	○	■	×	□	○
125	2	0	0	2	0	Nein	×	○	■	■	■	■	■	□	□
100	2	2	0	2	0	Nein	○	○	■	×	×	○	○	□	○
93	2	0	0	2	0	Ja	○	■	○	○	×	○	○	×	○
87	2	0	0	3	0	Nein	○	■	■	■	○	■	○	□	○

Tabelle 4a: Alterationen

Probe	pT	pN	M	G	Rezidive	multifokal	Untersuchte chromosomale Region								
							5p	8p	9p	9q	13q	14q	17p	17q	20q
107	2	0	0	3	0	Nein	□	□	□	■	○	■	×	□	□
134	2	0	0	3	0	Nein	□	□	■	×	○	○	■	×	○
92	2	0	0	3	0	Ja	■	■	○	■	○	□	×	○	□
153	2	0	1	3	0	Ja	×	■	○	×	○	○	■	×	○
146	2	1	0	3	1	Nein	■	○	○	○	□	○	■	×	□
150	2	1	0	3	1	Nein	□	○	○	○	□	○	■	×	□
83	2	0	0	3	1	Ja	×	■	○	×	□	□	×	×	○
124	3a	1	0	2	0	Nein	○	○	□	○	○	□	○	□	□
104	3a	0	0	2	0	Nein	□	■	○	□	■	□	○	×	□
122	3a	0	0	3	0	Nein	■	■	×	×	■	■	■	×	○
138	3a	0	0	3	0	Nein	□	○	□	□	○	○	□	×	□
132	3a	2	0	3	3	Ja	○	□	■	×	■	○	×	□	○
119	3a	1	0	4	0	Nein	□	□	○	○	○	□	○	×	□
108	3b	0	0	2	0	Nein	□	□	□	×	□	□	□	○	□
157	3b	0	0	3	1	Nein	■	○	■	■	○	□	■	×	□
147	4a	0	0	3	0	Nein	■	□	○	×	□	○	■	×	□

Tabelle 4b: Alterationen.

■ = LOH, Alteration

□ = Allelische Imbalance, Alteration

○ = Retention der konstitutionellen Heterozygotität

× = homozygot, nicht informativ

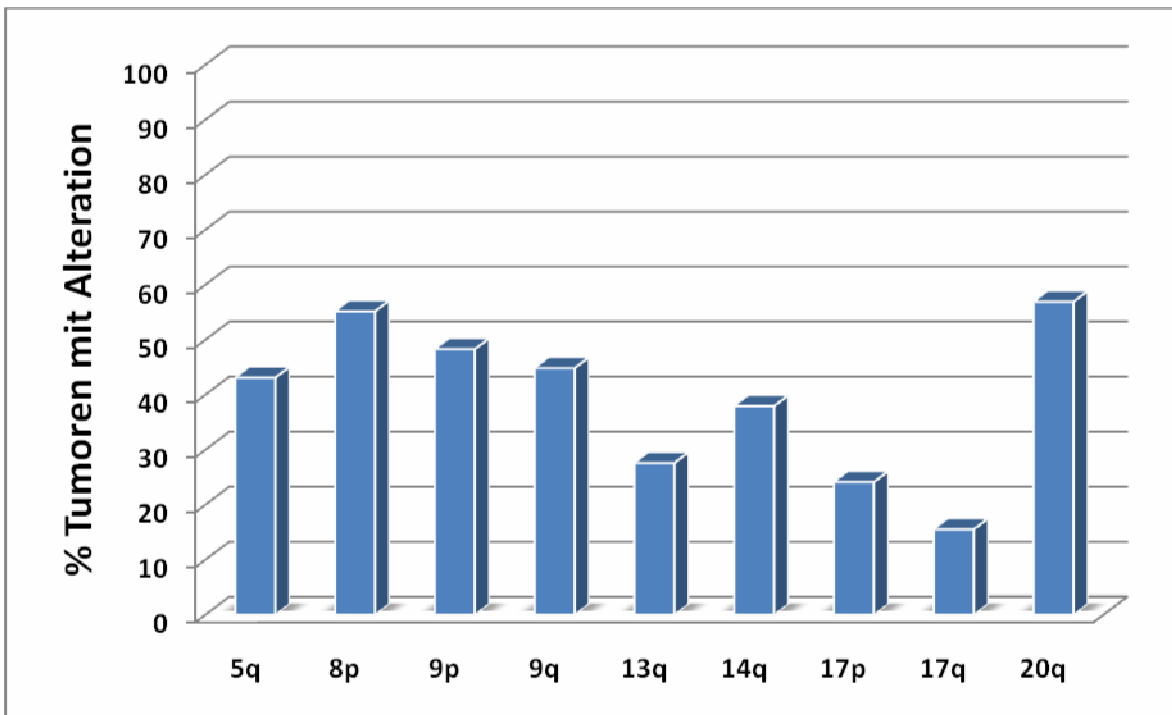


Abbildung 9: Alterationsinzidenz der entsprechenden chromosomalen Regionen.

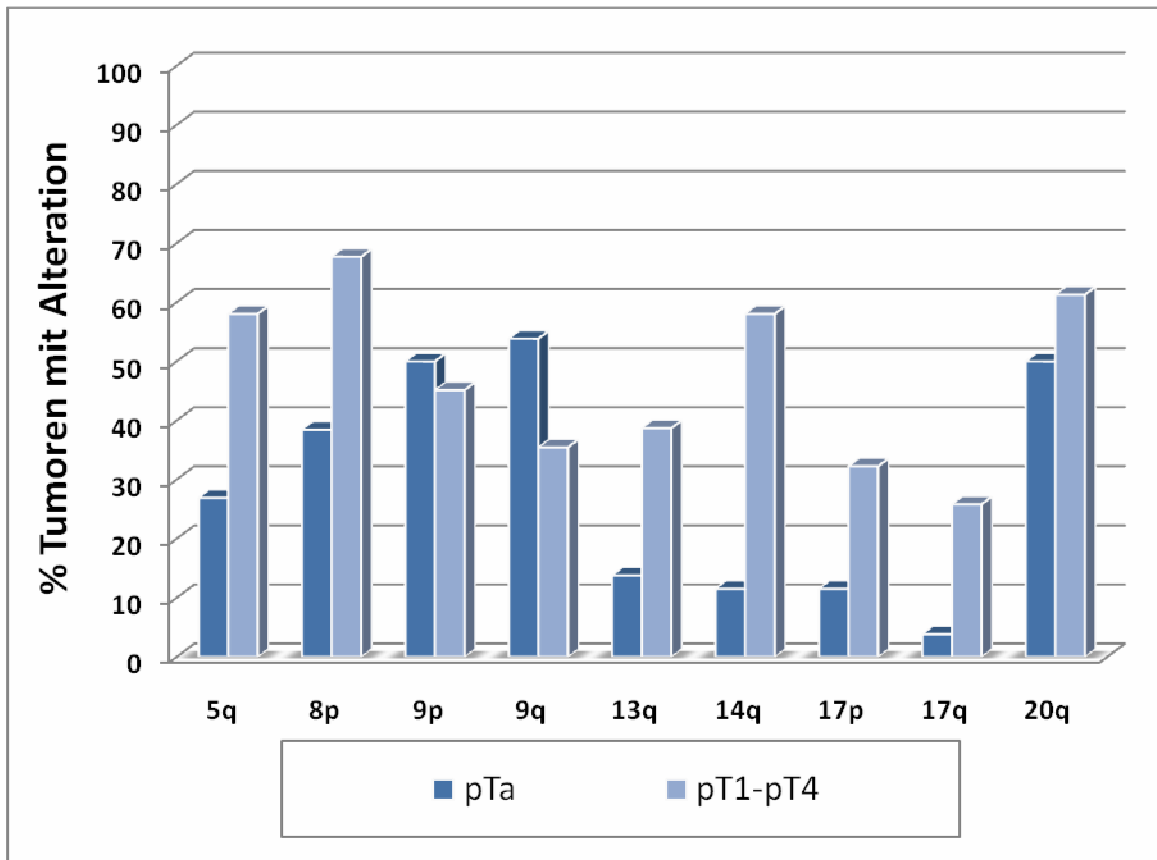


Abbildung 10: Alterationsinzidenzen selektiv nach Tumorstadium dargestellt.

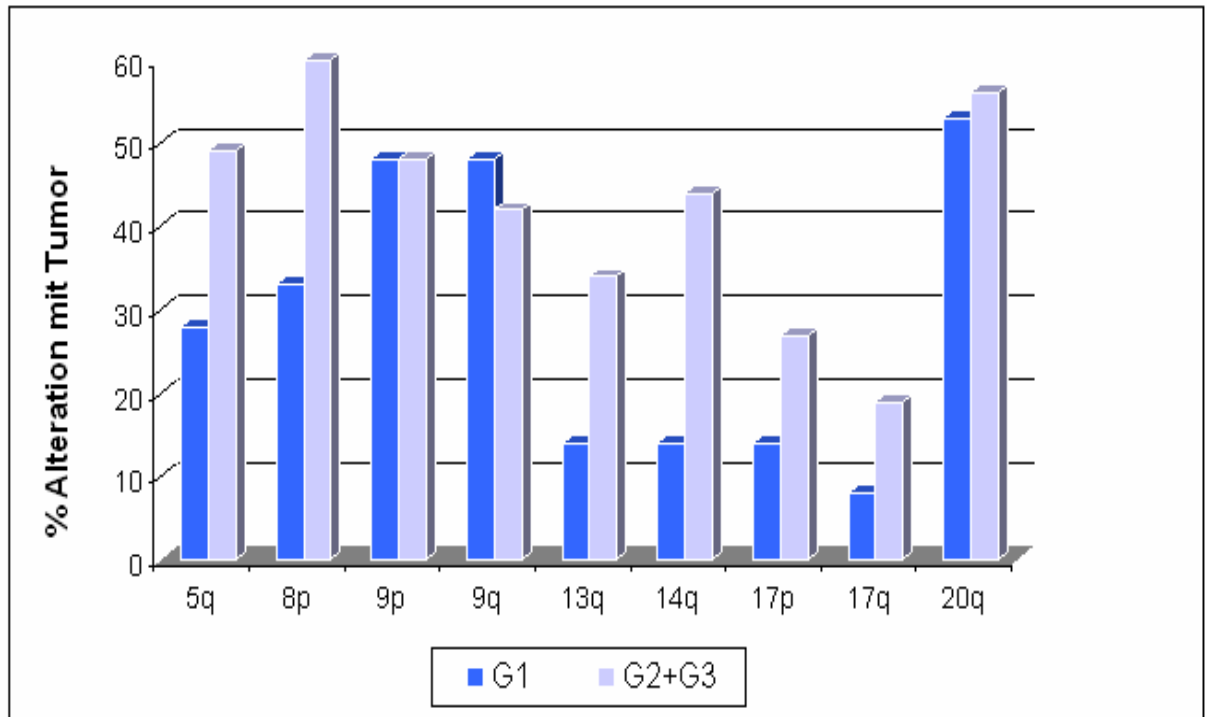


Abbildung 11: Alterationsinzidenzen selektiv nach Tumorgrad dargestellt.

4.2. Serum-DNA-Alterationen

Mit der Mikrosatellitenanalyse ist es möglich, aus kleinsten Mengen frei zirkulierender DNA Tumor-DNA-Alterationen aufzuzeigen. Keine anderen serologischen Marker haben eine ähnlich hohe Sensitivität und Spezifität wie die Mikrosatellitenanalyse. Die Ergebnisse von 58 untersuchten Patienten sind hier aufgezeigt.

4.2.1. Inzidenz

Zur Detektion von Serum-DNA-Alterationen kamen 17 polymorphe Mikrosatellitenmarker zum Einsatz. Die untersuchten chromosomalen Regionen 5q, 8p, 9p, 9q, 13q, 14q, 17p, 17q und 20q wiesen in 79,3 % der Fälle Alterationen der Serum-DNA auf. 8p-Alterationen kamen mit 38 % am häufigsten vor. 5q-, 9p- und 20q-Alterationen zeigten sich in 20 bis 23 % der Fälle. In 9 bis 18 % traten Alterationen an den übrigen untersuchten chromosomalen Regionen auf (Abb. 12). Für die serologische Tumordiagnose konnte damit eine Gesamtsensitivität von 59% ermittelt werden.

4.2.2. Assoziation mit klinisch-pathologischen Prognoseparametern

Die Ergebnisse zeigen Zusammenhänge zwischen nachgewiesenen Serum-DNA-Alterationen und schlechter Tumordifferenzierung. Ein Zusammenhang zwischen fortgeschrittenem Tumorstadium und Serum-DNA-Alterationen war nicht statistisch signifikant nachzuweisen. Abbildung 13 zeigt die unterschiedlichen Inzidenzen der Serum-DNA-Alterationen in Abhängigkeit von oberflächlichem und lokal fortgeschrittenem Wachstum. Abbildung 14 stellt die Zusammenhänge zwischen Serum-DNA-Alterationen und Differenzierungsgrad dar.

4.2.3. Spezifität

Zur Kontrolle bezüglich der Spezifität wurden auch 20 Gesunde untersucht. Bei vier der Gesunden kamen sieben unspezifische allelische Imbalancen vor. Die unspezifischen allelischen Imbalancen können als PCR-Artefakte angesehen werden. In der Gruppe der Tumorpatienten traten 10 % unspezifische Alterationen auf. Insgesamt beträgt die Spezifität der Methode somit 80%. Serum DNA-Alterationen wurden nur als solche angesehen, wenn dies auch bei der entsprechenden Tumor-DNA der Fall war. Die Abbildungen 15 und 16 zeigen dies beispielhaft.

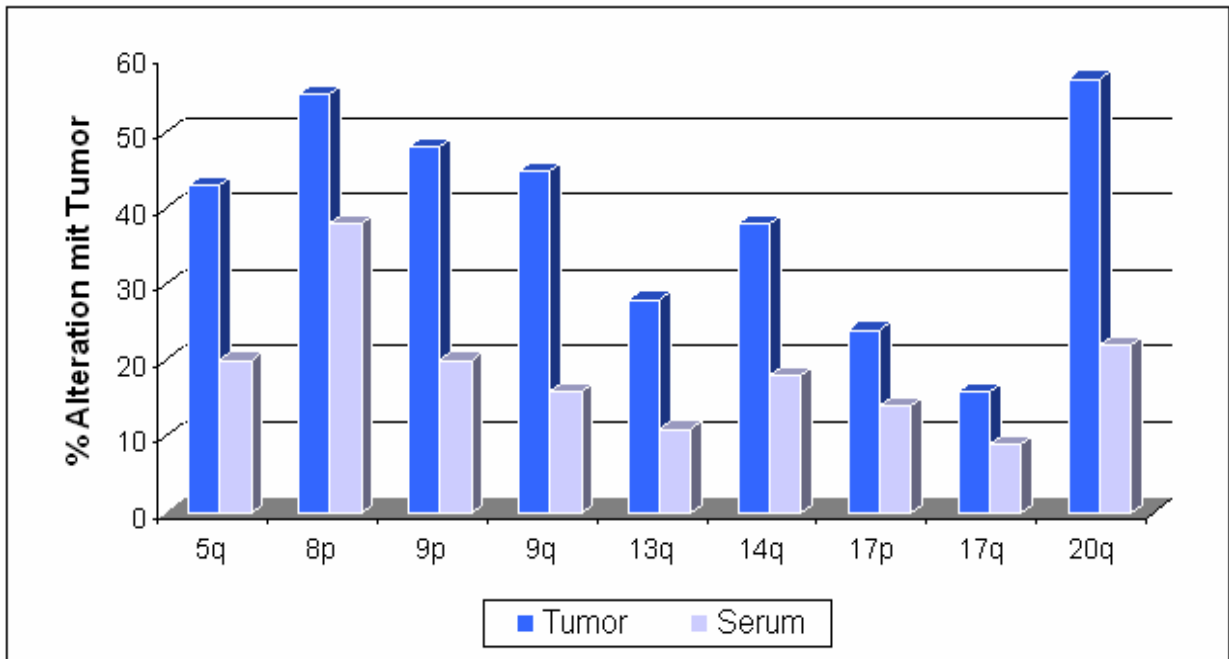


Abbildung 12: Inzidenz von DNA-Alterationen in Tumorgewebe und Serum.

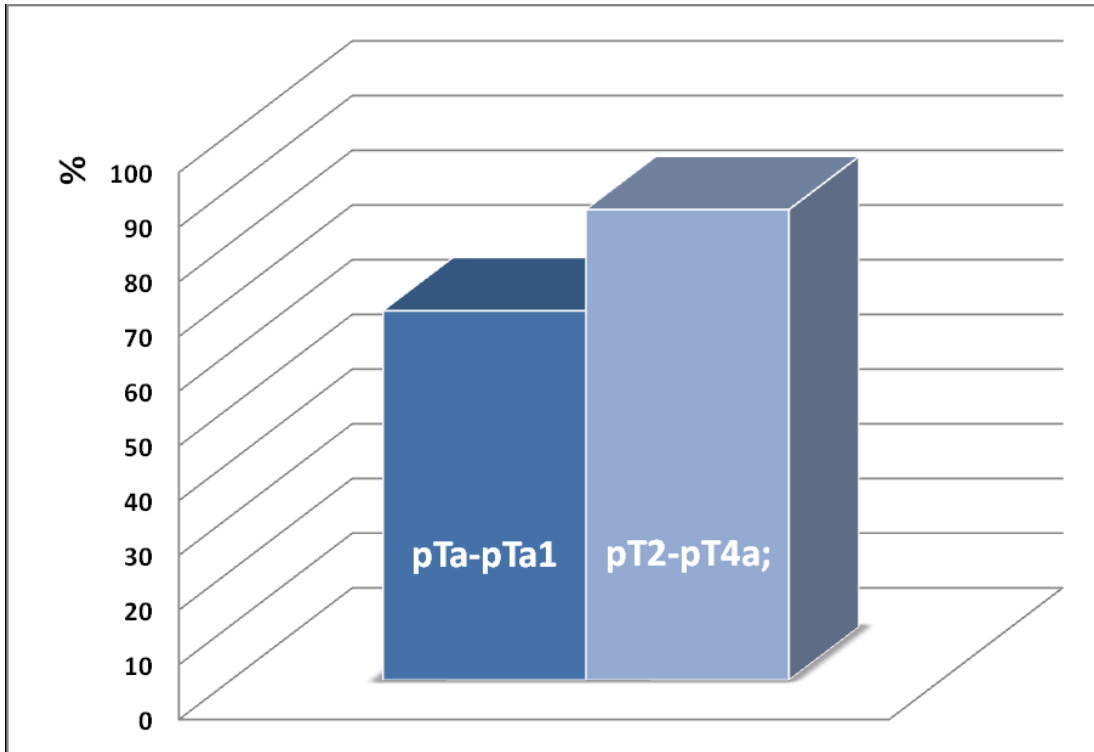


Abbildung 13: Inzidenzen selektiert nach Tumorstadium ($p > 0,05$).

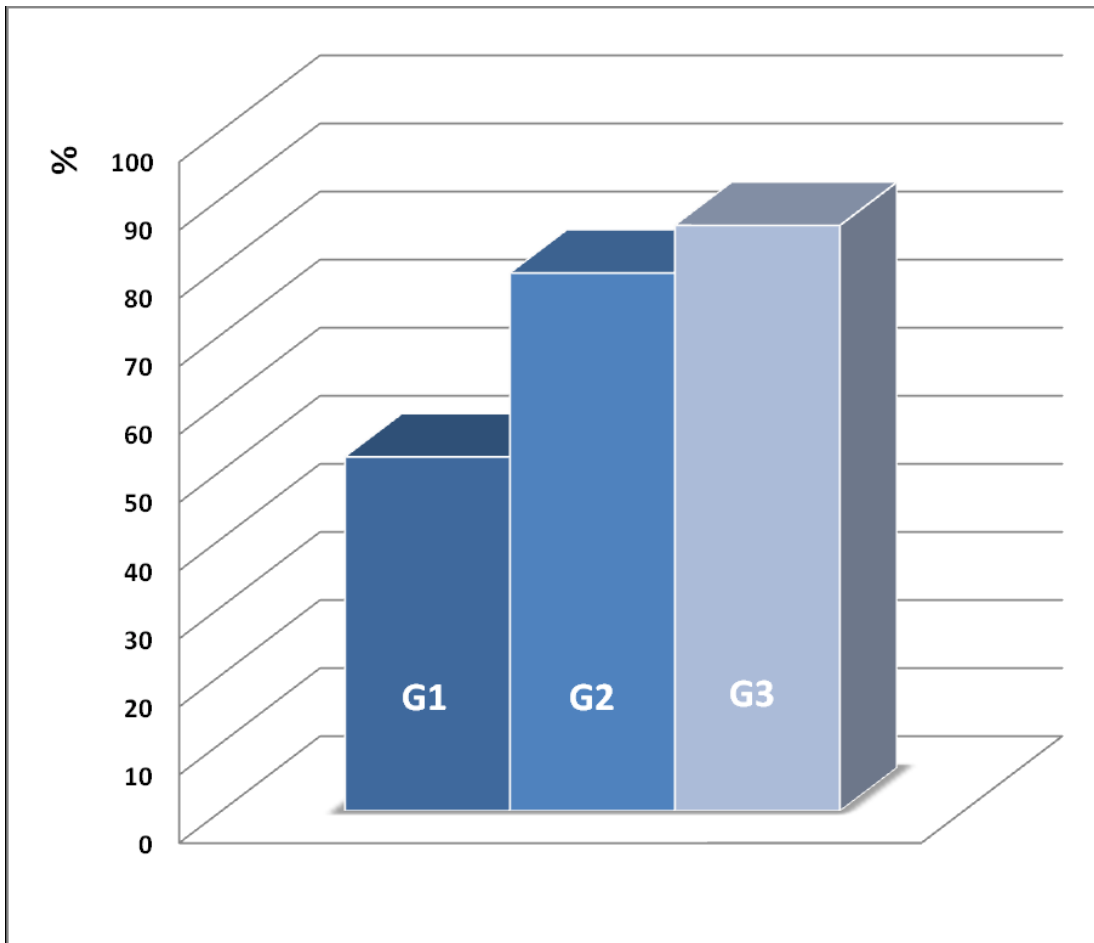


Abbildung 14: Inzidenzen selektiert nach Tumorgrad ($p = 0,008$).

Chromosom	Marker	Alterationen im Tumor ¹ (%)	Serum ² (%)
5q	D5S476	20	3 (0)
	D5S170	36	29 (3)
8p	D8S261	33	10 (3)
	D8S560	45	29
9p	D9S171	38	(10) 9 (3)
	D9S925	41	12 (2)
9q	D9S15	47	14 (2)
13q	D13S153	28	12 (7)
14q	D14S750	40	9 (9)
	D14S61	19	5 (0)
	D14S267	25	3 (3)
17p	D17S799	22	10 (5)
17q	D17S1306	24	16 (9)
20q	D20S486	38	12 (0)
	D20S607	16	2 (0)
	D20S481	17	2 (5)
	D20S480	31	2 (0)

¹ 100% = n = 58 Tumoren

² 100% = n = 58 Serumproben; Werte in Klammern = Anteil zusätzlich identifizierter allelischer Imbalanz (AI) (100% = n = 58)

Tabelle 5: Inzidenzen von DNA-Alterationen in Bezug auf die entsprechenden Mikrosatellitenmarker.

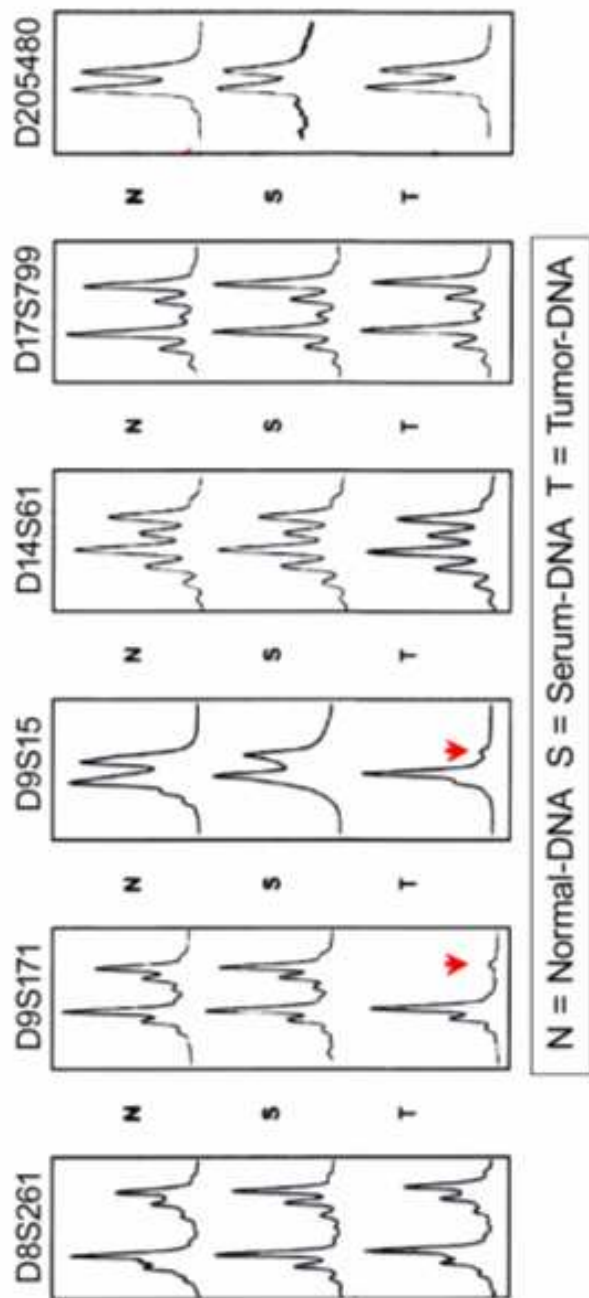


Abbildung 15: Die Abbildung zeigt ein Ergebnisbeispiel nach fluoreszierender Mikrosatellitenanalyse. In Normal-DNA und Serum-DNA konnten keine Veränderungen dargestellt werden. LOH der Tumor-DNA ist markiert.

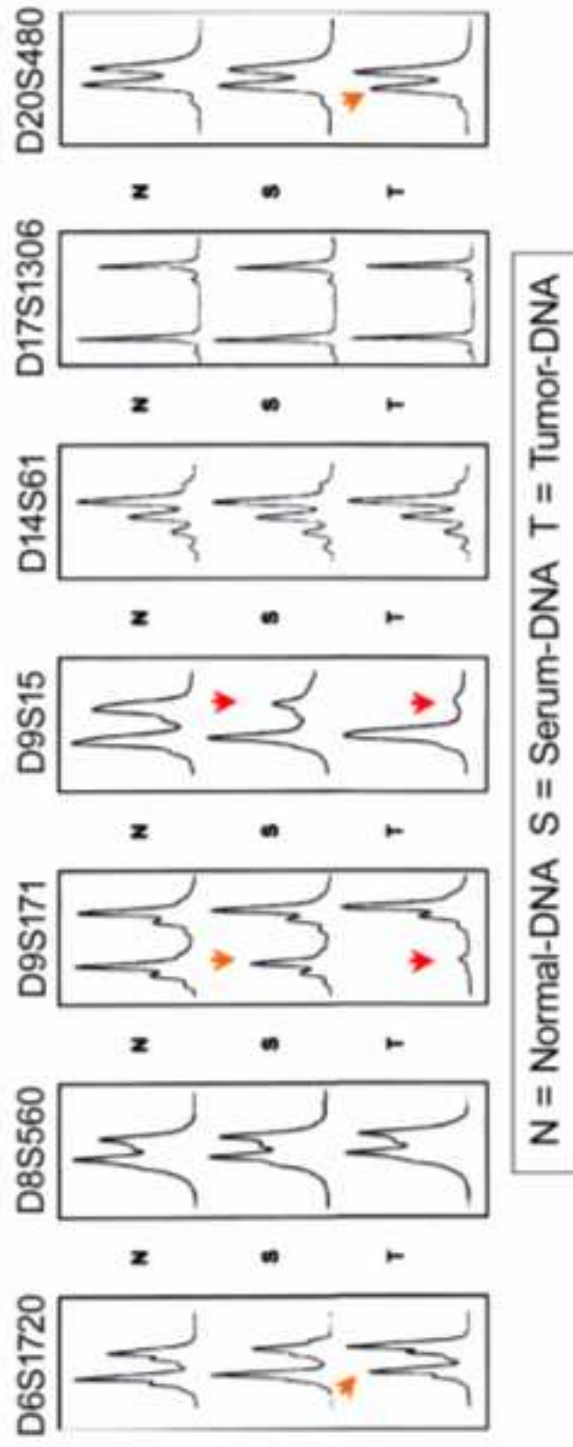


Abbildung 16: Die Abbildung zeigt ein Ergebnisbeispiel nach fluoreszierender Mikrosatellitenanalyse. Rot sind eindeutige Allelverluste markiert. Orange sind allelische Imbalancen markiert. Damit konnte die Serumdiagnose dokumentiert werden. Die eindeutigen Allelverluste der Tumor-DNA beweisen die Reinheit der untersuchten Proben. Die Beispiellinien wurden freundlicherweise von Herrn Prof. Dr. med. Rolf von Knobloch zur Verfügung gestellt.

4.3. Followup

Von 58 Patienten der in der Studie untersuchten Gruppe konnten Daten von 50 Patienten eingebracht werden. 5 Jahre nach Beginn der Studie wurde das Followup durchgeführt. Die durchschnittliche Followupzeit betrug 44,7 Monate. Die gesamte Zeitspanne betrug 1-81 Monate. Während dieser Zeit bekamen 12 von den 50 Patienten, welche dem Followupkollektiv zugeführt wurden, einen Progress. Von den 12 dieser Patienten verstarben 10.

Bei diesen Patienten mit Progress oder den Verstorbenen als Folge des Urothelkarzinoms waren zum Zeitpunkt der Operation, also zum Zeitpunkt der Tumorasservierung, die chromosomalen Regionen 5q ($p=0,0125$), 13q ($p=0,031$), 14q ($p=0,0026$) und 17p ($p=0,0005$) mit einem fortgeschrittenen Tumorstadium (nach TNM Klassifikation) vergesellschaftet.

Mit einem schlechten Differenzierungsgrad waren die chromosomalen Regionen 5q ($p=0,0389$), 8p ($p=0,0405$), 14q ($p=0,0337$) und 17p ($p=0,008$) assoziiert.

Aber keine dieser Alterationen zeigte signifikante Assoziationen mit dem Progress.

Nur das Tumorstadium zum Zeitpunkt der Materialasservierung, also zum Zeitpunkt der Operation, war als Prognoseparameter anzusehen.

5. Diskussion

5.1. Allgemeines

Die Behandlungsstrategien des Harnblasenkarzinoms sind heute weitestgehend standardisiert. Neben der transurethralen Resektion mit der Option der Instillationstherapie zur Rezidivprophylaxe bei schlechter Differenzierung ist bei weiter fortgeschrittenem Tumorstadium die radikale Zystektomie indiziert.

Es stellt sich bislang jedoch die Frage, wie ein schlecht differenziertes oberflächliches Harnblasenkarzinom (T1 G3) behandelt wird. Mit einer radikalen Zystektomie sind in diesem Stadium bis zu 90 % der Patienten übertherapiert, hinzukommen die Komplikationen, die eine Ersatzblase oder andere Formen der Harnableitung mit sich bringen können.

Unterziehen sich die Patienten einer transurethralen Resektion mit Instillationsprophylaxe, muß in bis zu 30 % der Fälle mit einem Rezidiv gerechnet werden [15, 69, 70, 72, 77, 147].

Diagnostisch stehen bildgebende Verfahren und die Zystoskopie zur Verfügung. Zudem kommen zytologische Tests zur Anwendung. Bildgebende Verfahren sind bei der Diagnostik hinsichtlich des Lokalbefundes zu ungenau. Nicht alle Tumore können, besonders in einem frühen Stadium, adäquat dargestellt werden. Über die Differenzierung können dabei keinerlei Aussagen getroffen werden. Beim Staging hingegen sind die bildgebenden Verfahren aber wichtiger Bestandteil der Diagnostik. Die Zystoskopie stellt ein invasives Verfahren dar, bei dem flache Tumoren nicht immer detektiert werden. Auch neuerdings verwendete fluoreszierende Substanzen, im Rahmen der PDD (photodynamische Diagnostik), machen keine Aussage über die Wachstumstiefe des Tumors, sondern dienen der genaueren Bestimmung der Ausdehnung und der Bestimmung der Anzahl multiloculär wachsender Tumore. Bei dieser Methode werden photoaktive Substanzen intravesical appliziert. Seit März 2007 ist die photoaktive Substanz Hexyl-ALA-Ester in 27 europäischen Ländern zugelassen. Hiermit konnte die Rate an zusätzlich diagnostizierten flachen high-grade-Tumoren erhöht werden. Außerdem hat sich gezeigt, dass

durch den Einsatz der PDD die Residualtumorraten im Rahmen der TUR-B gesenkt werden konnte.

Jedoch konnte die Rezidivrate nicht gesenkt werden [200]. Mit der Urinzytologie können besonders high-risk-Urothelkarzinome erfasst werden [189]. Spülzytologien haben aber den Nachteil, nicht die gewünschte Sensitivität bei gutdifferenzierten Tumoren zu besitzen, eine durchschnittliche Sensitivität von nur 40-60 % wird hier verzeichnet. Bei high-grade Karzinomen sind es hingegen 80-95%. Zudem wird die Methode der Zytologie durch äußere Faktoren limitiert. Die Untersuchung ist keine einfache und in nicht unerheblichem Maße vom Untersucher abhängig [124].

Bei der Diagnose anderer Tumore kommen regelmäßig Tumormarker zum Einsatz. Unter urologischen Aspekten ist hier besonders das PSA (prostataspezifisches Antigen) bei der Diagnose und Prognose des Prostatakarzinoms zu nennen [95].

In Hinblick auf das oberflächliche schlechtdifferenzierte Harnblasenkarzinom wäre ein vergleichbarer Tumormarker von großem Nutzen. Diagnostik, Festlegung der entsprechenden Behandlungsstrategie und Tumornachsorge wären mit einem sensitiven und spezifischen Tumormarker sicherer zu handhaben. Ein Tumormarker sollte im Urin oder Serum standardisiert messbar sein. Zahlreiche experimentelle Arbeiten liegen vor, die Versuche beschreiben, geeignete Tumormarker zu identifizieren und zu prüfen.

Große relevante Studien existieren nicht [67]. Der einfachste Marker, die Hämaturie, ist hingegen gut untersucht. Eine hohe Sensitivität kann hier verzeichnet werden, jedoch nur eine geringe Spezifität.

Der BTA-Test (Blasentumorantigen-Test) hat eine zu große Varianz bezüglich der Sensitivität von 8-89 % [3, 144] und ist als Prognoseparameter nicht nutzbar [67]. Der BTA-Test ist am erfolgreichsten bei hochgradigen und schlecht differenzierten Tumoren. Geringergradige Tumore liefern hier unzureichende Ergebnisse. Falsch positive Ergebnisse können außerdem zu nicht nötigen Zystoskopien führen. Der NMP 22-Test hat zu viele Ausschlusskriterien wie Urolithiasis oder Infektionen des Urogenitalsystems. Desweiteren liegen hier nicht die entsprechenden Studien vor [3]. Als Prognosemarker ist er ebenfalls nicht einsetzbar. Die Kombination mit der Zystoskopie könnte entsprechende Ergebnisse liefern [3].

Survivin gehört zu den Inhibitoren der Apoptoseproteine. Bei vielen Malignomen kann es nachgewiesen werden. Es ist aber auch in Normalgewebe nachweisbar. Survivin inhibiert die Apoptose, fördert die Zellproliferation und steuert mitunter die Angiogenese [106]. Survivin wurde als vielversprechender Tumormarker beschrieben, doch muss die Methode noch standardisiert und vereinfacht werden. Weitere Studien sind nötig [46].

Die Telomerase ist ein Ribonucleoprotein, welches von Tumorzellen expremiert wird. Sie wird aus Spülzytologien gewonnen und bestimmt. Diese Methode birgt technische Schwierigkeiten in sich, welche die klinische Anwendung stark einschränken. Außerdem muss der Urin binnen 24 Stunden aufgearbeitet werden und die Methode ist untersucherabhängig. Lymphozyten können im Rahmen eines Harnwegsinfektes falsch positive Ergebnisse bringen. Eine geringe Sensitivität muss zudem erwähnt werden. Diese variiert von 24-100 % [3, 67].

Die Fluoreszenz in situ Hybridisierung (FISH) ist ebenfalls ein Urintest. Dabei werden mit fluoreszierendem Farbstoff markierte DNA-Sequenzen mit Metaphasechromosomen hybridisiert. Tumorassoziierte Regionen können auf subchromosomaler Ebene dargestellt werden. Der Test zeigt Veränderungen der Chromosome 3, 7 und 17 sowie den Verlust von 9p21. Der kommerzielle UroVysion Testtm hat eine Sensitivität von 68-81 % und eine Spezifität von 79-96 %. Die Sensitivität für low-grade und low-stage Tumore beträgt nur 36-37 %. Die klinische Relevanz verschiedener Studien bleibt unklar. Derzeit kann auch nicht sicher gesagt werden, ob ein positives Ergebnis eine neoplastische Umformung darstellt oder ein instabiles Urothel mit Tendenz zur Entartung vorliegt [3, 67].

Als vielversprechender Prognosemarker galt E-Cadherin, ein Adhäsionsglycoprotein, welches eine zentrale Rolle bei der Vermittlung von Zell-Zellkontakten spielt. Eine qualitativ und quantitativ gute Methode, die im klinischen Alltag besteht, kam bislang nur experimentell zur Anwendung. Neuere Daten lassen Zweifel an der Aussagekraft der Methylierung von E-Cadherin aufkommen [123].

Ein Siliziumchip, beladen mit Fängerantikörpern, kam in einer Arbeitsgruppe zur Anwendung. Er steht für die Routine noch nicht zur Verfügung [75].

Auf der Suche nach einem geeigneten Prognoseparameter wurde auch das Tetranectin untersucht. In einer Untergruppe von Patienten mit Harnblasenkarzinom wurde Tetranectin expremiert, die später einen Progress erlitten. Signifikante Ergebnisse liegen hier nicht vor [19].

Weitere Ansätze haben Untersuchungen mit Tumorsuppressorgenen erbracht. Untersucht wurden in einer Arbeit die Tumorsuppressorgene S 100 A2 und S 100 A4 [107]. Auch hier sind größere Patientenzahlen nötig.

Der HA-Hase Test zeigt Nutzen bei Erstrezidiven nach Urothelkarzinom der Harnblase. Eine hohe Sensitivität wurde beschrieben. Auch bei low-grade-Tumoren und bei Low-stage-Tumoren trifft dies zu. Als Prognoseparameter kann die HA-Hase nicht angesehen werden [67].

Die Promoterhypermethylierung könnte als Marker beim Tumorprogress des Harnblasenkarzinoms genutzt werden.

Beim Prostatakarzinom wurde die Hypermethylierung bereits angewandt. Die Diagnoserate konnte durch entsprechende Methoden erhöht werden und die Mortalität sank [65]. In mehreren Arbeiten wurden die molekulargenetischen Alterationen in der Pathogenese des Prostatakarzinoms untersucht. Die CpG-Insel-Hypermethylierung des Glutathion-S-Transferase-Gens (*GSTP1*) ist eine charakteristische Veränderung in der Karzinogenese des Prostatakarzinoms [100].

Mit dem Nachweis der *GSTP1*-CpG-Insel-Hypermethylierung stünde ein molekularer Test zur Verfügung, welcher Screening und Diagnose des Prostatakarzinoms verbessern könnte [31].

Beim Harnblasenkarzinom liegen deutlich weniger Ergebnisse vor [199].

Überwachungsstrategien in der Diagnostik und der Prognose bestehen bislang aus der Urinzytologie und der Zystoskopie. Beide Methoden sind teilweise als subjektiv zu werten, da sie untersucherabhängig sind. Eine höhere Sensitivität könnte durch die Messung der Promoterhypermethylierung erreicht werden. In Studien konnte eine Assoziation zur Tumorentwicklung bzw. zur Prognose gezeigt werden [83]. An dieser Stelle sind jedoch weitere prospektive Studien nötig [3].

Ein vielversprechender Marker ist die Methylierung des *RUNX3*-promoter für die Prognose des Harnblasenkarzinoms. Die Inaktivierung von *RUNX3* ist dabei mit

der Karzinogenese, den Rezidiven und dem Progress des Harnblasenkarzinoms assoziiert [82].

Eine gute Möglichkeit molekulare Diagnostik zu betreiben ist die Mikrosatellitenanalyse. Für diese Methode sind nur sehr geringe DNA-Mengen nötig, da sie amplifiziert werden [93].

Nicht nur die DNA des Tumors kann analysiert werden, sondern auch die DNA anderer Körperflüssigkeiten oder Körpersekrete. Zellgebundene wie auch freie DNA kann beispielsweise aus Blutserum extrahiert, amplifiziert und analysiert werden. Die Proteine der DNA besitzen eine höhere Stabilität als die von RNA und sind damit für die Mikrosatellitenanalyse geeigneter.

Eine Spezifität von bis zu 100 % spricht ebenfalls für die Methode [159].

Die Gruppe um von Knobloch erbrachte Ergebnisse mit hoher Spezifität und hoher Sensitivität [84].

Für diese Arbeit wurde Tumorgewebe von 58 Patienten mit Urothelkarzinomen der Harnblase asserviert und entsprechend aufgearbeitet. Die chromosomalen Regionen 5q, 8p, 9p, 9q, 13q, 14q, 17p, 17q und 20q wurden mit Hilfe der Mikrosatellitenanalyse untersucht. Zum Einsatz kamen 17 Mikrosatellitenmarker. Zudem wurde nach DNA-Alterationen frei zirkulierender DNA im Serum mit den gleichen Mikrosatellitenmarkern gesucht [85].

5.2. Genetische Charakterisierung

Proben von 58 Patienten standen zur Verfügung. 9 chromosomale Regionen wurden mit 17 Mikrosatellitenmarkern untersucht. Die Ergebnisse wurden statistisch aufgearbeitet. Hierbei zeigte sich eine Assoziation von Allelverlusten mit fortgeschrittenem Tumorstadium und schlechter Kerndifferenzierung. Dieses Verhalten konnte an den chromosomalen Regionen 5q, 14q und 17p beobachtet werden. Mit fortgeschrittenem Tumorstadium war ein LOH an 13q vergesellschaftet. Ein LOH an 8p war mit dem Differenzierungsgrad assoziiert. Studien beschreiben Alterationen am Chromosom 9 als frühes Ereignis der Kanzerogenese des Harnblasenkarzioms [42, 87, 89, 162, 167]. In dieser Arbeit trat an den 13 pTa Tumoren nur eine Alteration auf. Dies war ein LOH am Chromosom 9. Damit konnte die allgemeine Ansicht bestätigt werden, dass Chromosom 9 eine besondere Rolle der Karzinogenese zukommt. Aufgrund dieser Vermutung versuchte man, Tumorsuppressorgene auf Chromosom 9 lokalisiert zu identifizieren. Deletionen des P16 Genlocus wurden als entscheidend angesehen [23, 128, 169]. Die mögliche Tumorsuppressorregion an Chromosom 9q wurde weiter eingegrenzt.

Es gibt weitere Arbeiten, die Veränderungen am Chromosom 9 als Frühereignis der Karzinogenese beschreiben. Bereits bei prämaligen Schleimhautveränderungen traten Alterationen auf [66].

LOH am Chromosom 8p konnte in dieser Arbeit bei 55-57 % identifiziert werden. Andere Arbeiten wiesen Inzidenzen von 22-26 % auf [87,179]. Die Daten erklären sich möglicherweise aus der Tatsache, dass zu dieser Arbeit viele muskelinvasive Harnblasenkarzinome vorlagen. Mit einem 8p-Verlust waren schlechte Kerndifferenzierung und fortgeschrittenes Tumorstadium vergesellschaftet. Ein LOH an 8p könnte demzufolge als prognostisch ungünstig gelten.

Auch andere Karzinome zeigen 8p-Veränderungen. Beim Nierenzellkarzinom, beim Prostatakarzinom und bei kolorektalen Karzinomen zeigten sich Veränderungen [14, 33, 41, 96, 151, 181, 137], welche mit einer schlechteren Prognose assoziiert scheinen. Die exaktere Beschreibung des locus fällt schließlich auf 8p23 [120, 127, 176].

Für das Urothelkarzinom der Harnblase werden verschiedene Entstehungsmechanismen diskutiert. Neben dem Weg über einen Verlust am Chromosom 9 könnte eine 8p-Deletion von Bedeutung sein [42, 140, 167].

Eine P53 Mutation könnte Anstoß für den Entstehungsweg über das Carcinoma in situ zum Harnblasenkarzinom sein. Hierbei werden Allelverluste an Chromosom 17p beschrieben. Es werden Mutationen des P53 Tumorsuppressorgens, also Veränderungen am Chromosom 17p, demnach als prognostisch ungünstig bezeichnet. Es liegen Arbeiten mit sehr unterschiedlichen Ergebnissen vor. Weitere Studien sind an dieser Stelle nötig [117,141].

In dieser Arbeit konnte ein LOH an 17p in 24-46 % nachgewiesen werden. Diese Veränderungen waren mit schlechter Kerndifferenzierung und fortgeschrittenem Tumorstadium assoziiert.

Ebenfalls war ein LOH an den Chromosomen 13q und 14q mit fortgeschrittenem Tumorstadium und schlechter Kerndifferenzierung assoziiert. Bei Chromosom 13q waren es 28-34 % und bei Chromosom 14q 27-38%. Diese Ergebnisse sprechen ebenfalls für eine ungünstigere Prognose.

Das Retinoblastomagen ist auf dem Chromosomenarm 13q lokalisiert. Die Region wurde in vielen Studien als prognoseassoziiert bezeichnet [112].

Das Chromosom 14q wurde bislang weniger untersucht. Aus diesem Grund liegen in dem Fall weniger Daten vor. Dennoch konnten verschiedene Veränderungen beschrieben werden. Am Carcinoma in situ und an invasiven Tumoren konnte ein LOH gesehen werden. Bei fortgeschrittenen Urothelkarzinomen traten zu 70 % Alterationen auf [28,140].

Weitere analysierte chromosomale Regionen wiesen ebenfalls hohe Inzidenzen auf, Chromosom 5q mit 43 bis 52 % und Chromosom 20q mit 45 bis 57 %.

Die erhobenen Daten und die Aufarbeitung erbrachten Ergebnisse, welche sich insgesamt mit denen in der Literatur beschriebenen decken [40, 110, 113, 114].

5.3. Serum-DNA-Analyse

Tumorspezifische Alterationen wurden mit 17 Mikrosatellitenmarkern der chromosomalen Regionen 5q, 8p, 9p, 13q, 14q, 17p, 17q und 20q nachgewiesen. Bei 79,3 % der Patienten gelang dies, das sind 46 von 58. Die meisten Veränderungen traten mit einer Inzidenz von 38 % an 8p und 20q auf. Bei 9p und 14q traten Alterationen in 18 % der Fälle auf. Die übrigen untersuchten chromosomalen Regionen wiesen Alterationen von 10 bis 15 % auf (Abb. 10).

Die Aufarbeitung der Zahlen zeigte eine Korrelation zwischen dem Nachweis von Serum-DNA-Alterationen und schlechtem Differenzierungsgrad des Urothelkarzinoms. Ergebnisse aller 58 Patienten wurden in die Berechnung miteinbezogen.

Mit dem Mann-Whitney-Test wurde die statistische Assoziation errechnet ($p = 0,008$).

Die Analyse der Serum-DNA war aber unabhängig vom Primärtumorstadium (Abb. 11 und 12). Trat eine Serumalteration auf, wurde sie tatsächlich nur gewertet, wenn sie mit der Tumor-DNA-Alteration korrespondierte (Abb. 13 und 14). Diskordante allelische Imbalanz, welche als Artefakt gewertet wurde, trat mit einer Inzidenz von 0 bis 10 % auf (Tab. 6).

Zur Überprüfung der Sensitivität der Methode wurden 20 gesunde Probanden mituntersucht. Alle 17 Marker wurden an den Proben der Gesunden getestet. Für die Methode konnte eine Spezifität von 80 % ermittelt werden. In den 340 angefertigten Kontroll-PCRs kamen bei 4 Gesunden insgesamt 7 allelische Imbalancen zur Darstellung. Die Methode scheint stadienunabhängig zu sein, was gegenüber anderen Methoden ein enormer Vorteil ist.

Bei der Fluoreszenz in situ Hybridisierung hingegen handelt es sich beispielsweise um eine stadienabhängige Methode [3].

Mehrere Arbeiten berichten von potentiellen Markern [3, 124, 153, 185, 187].

Jedoch wird wenig von Prognoseparametern oder Prognosemarkern berichtet, welche im klinischen Alltag genutzt werden. Viele der Ansätze solcher Arbeiten könnten diagnostisch genutzt werden, wenn es gelingen würde, sie zu standardisieren und zu vereinfachen. Die Prognose betreffend gibt es bis heute

keine Multicenterstudien mit standardisierter Methodik und prospektive Studien, um diese molekularen Marker im klinischen Alltag zu etablieren.

In der vorliegenden Arbeit wurde eine eindeutige Abhängigkeit der serologischen Tumordiagnose vom Differenzierungsgrad des Tumors berechnet ($p = 0,008$) [85]. Geht man davon aus, dass schlecht differenzierte Tumore mit einer höheren Proliferationsrate einhergehen und ein höheres Maß an genetischer Instabilität besitzen, sind die vorgelegten Ergebnisse nachvollziehbar [4, 5, 175].

Erste Arbeiten, die sich mit der Bestimmung von Serum-DNA beschäftigen, wurden von Shapiro und Leon verfasst. Bereits diese Arbeiten beschrieben höhere Konzentrationen freier Serum-DNA bei Tumorpatienten als bei Gesunden [98, 152]. Die Arbeiten zeigten aber keine Unterschiede hinsichtlich Tumorgröße und Tumorstadium. Erkrankte mit Metastasen zeigten allerdings höhere Konzentrationen.

In dieser Arbeit konnte eine Sensitivität der Methode für den serologischen Tumornachweis von 79,3 % ermittelt werden. Andere Arbeitsgruppen erreichten mit ähnlichen Methoden eine Sensitivität von 0 bis 71 % [29, 30, 56, 71, 121, 154, 160, 164]. Die höhere Sensitivität bei dieser Arbeit kann mit der hohen Anzahl an Mikrosatellitenmarkern erklärt werden. Während andere Gruppen 2 bis 12 Mikrosatellitenmarker nutzten, kamen in dieser Arbeit 17 zur Anwendung. Die höchste Sensitivität der untersuchten chromosomalen Regionen konnte für 8p12-22 mit den Markern D 8 S 261 und D 8 S 560 erreicht werden. Diese betrug 38 %. Neben der Inzidenz der Tumoraltertion ist die Sensitivität der Methode von Markereigenschaften abhängig. Die Größe der PCR-Produkte ist eine solche Markereigenschaft [85]. In dieser Arbeit konnten 6 sensitive Marker ermittelt werden (D 8 S 261, D 8 S 560, D 9 S 925, D 9 S 15, D 20 S 486). Für die Serumdiagnose konnte eine Gesamtsensitivität der genannten Marker von 59 % erreicht werden.

An diesem Punkt stellt sich die Frage, inwieweit die Methode zur klinischen Anwendung kommen könnte. Als serologisches Diagnostikum könnte nach radikaler Zystektomie schlecht differenzierter Tumore ein Lokalrezidiv oder eine Metastase angezeigt werden. Mikrometastasierung entzieht sich bislang der bildgebenden Diagnostik. Damit wäre eine frühere entsprechende Therapie

möglich, was sich auf Lebensqualität und Überlebenszeit positiv auswirken könnte.

5.4. Zukünftige Anwendungen

5.4.1 Diagnose

5.4.1.1. Genetische Klassifikation

Die genetische Klassifikation von Malignomen rückt weiter in den Forschungsschwerpunkt wissenschaftlicher Arbeiten. Als Handwerkszeug sind Erkenntnisse zur Tumorbiologie erforderlich. Moderne Techniken zur genetischen Klassifikation wurden entwickelt. Auch das Urothelkarzinom der Harnblase wurde untersucht. Verschiedene Entstehungswege wurden vermutet und gegenübergestellt [112, 189].

Durch diese Arbeit sollte die Charakterisierung weiter voranschreiten. Tumorassoziierte chromosomale Regionen wurden genauer beschrieben. Klinische Bedeutung ergibt sich aus den bereits zur Verfügung stehenden Diagnostika und Therapiemöglichkeiten. Jetzt gilt es, bestehende, etablierte Methoden zu unterstützen. Besondere Aufmerksamkeit sollte Progressions- und Prognosemarkern zukommen.

5.4.1.2. Serologischer Nachweis

Andere Tumore können durch Bestimmung genetisch veränderter Plasma-DNA überwacht werden. Auf molekularer Ebene gab es Beobachtungen unter anderem beim Colonkarzinom und bei Ovarialkarzinomen. Ebenso das Urothelkarzinom der Harnblase wurde diesbezüglich untersucht. Anhand des Survivinspiegels konnten Aussagen über den Progress gemacht werden. Ein erhöhter Survivinspiegel war mit Progress assoziiert. Prognostisch konnten nur eingeschränkte Aussagen getroffen werden. Eine Korrelation zwischen

Survivinspiegel und Prognose war bislang nicht sicher nachweisbar [46, 106]. Der Nachweis und die Analyse frei zirkulierender Tumor-DNA könnte als nichtinvasive Verlaufskontrolle genutzt werden. Beim Pankreaskarzinom liegen entsprechende Daten vor [57, 81, 102].

Hinsichtlich der Diagnose des Harnblasenkarzinoms leistet die Mikrosatellitenanalyse wertvolle Dienste. Es konnten im Serum von Patienten mit einem Transitionalzellkarzinom der Harnblase DNA-Alterationen unter Hilfe der fluoreszierenden Mikrosatellitenanalyse aufgezeigt werden. Dabei konnte gezeigt werden, dass die Methode eine hohe Spezifität und Sensitivität aufweist. Außerdem ist die Methode stadienunabhängig. Bislang wird die Diagnose eines Tumors cystoskopisch und histologisch, also invasiv gestellt. Bei der Mikrosatellitenanalyse hingegen handelt es sich um eine nicht-invasive Methode, was neu ist und für den Patienten die weitaus schonendere Methode darstellt. Auch im Urin gelang dieser Arbeitsgruppe um von Knobloch der Nachweis [84].

In der vorliegenden Arbeit wurden ebenfalls Tumorgewebe und Serum untersucht, wobei keine Analyse von Urinproben erfolgte.

5.4.2. Prognose

Nach Diagnosefindung eines Urothelkarzinoms stellt sich die Frage einer adäquaten Therapie. Zur operativen Behandlung stehen die transurethrale Resektion sowie die radikale Zystektomie zur Verfügung. Welche Operationsmethode zur Anwendung kommt, ist vom Tumorstadium und vom Differenzierungsgrad abhängig.

Die Entscheidung für eine der beiden Methoden ist nicht immer einfach zu treffen. Eine bestimmte Befundkonstellation birgt große Probleme hinsichtlich der Therapieabwägung. Ein oberflächliches Urothelkarzinom mit schlechter Differenzierung (T1 G3) kann durch eine transurethrale Resektion behandelt werden. In diesem Fall muss in 30 % der Fälle mit einem Progress gerechnet werden. Werden Patienten mit dieser Befundkonstellation radikal zystektomiert, wären ca. 90% der Patienten übertherapiert. An dieser Stelle wäre ein einfach

zu messender, zuverlässiger, genauer und kostengünstiger Prognoseparameter hilfreich.

Zur serologischen Diagnose mittels fluoreszierender Mikrosatellitenanalyse konnten in der vorliegenden Arbeit Ergebnisse erzielt werden, die für eine hohe Spezifität und Sensitivität der Methode sprechen.

Damit lag es nahe, LOH an den entsprechenden Orten mit der Prognose in Verbindung zu bringen und Tumorstadium sowie Kerndifferenzierung einzubeziehen.

Um chromosomale Veränderungen mit der Prognose in Verbindung zu bringen war es erforderlich, ein Followup nach 5 Jahren durchzuführen.

Die Auswertung der erhobenen Daten zeigte keine signifikante Assoziation der Mikrosatellitenmarker mit der Prognose.

Dafür könnten verschiedene Faktoren in Frage kommen.

Das relativ kleine Kollektiv von n=58 Patienten kann eine Ursache sein.

Eine weitere Ursache kann die Verteilung der Patienten sein.

Zum Zeitpunkt der Operation zeigten 37 Patienten einen pTa, pTis oder pT1 Tumor. Das ist über die Hälfte der Gesamtzahl von n=58. 21 Patienten präsentierten ein fortgeschritteneres pT2-4a Karzinom.

Außerdem ließ sich beobachten, dass nur 16 Patienten an einem G1 Tumor erkrankt waren, hingegen 33 Patienten an einem schlechter differenzierten G2 oder G3 Tumor.

Vermischungen von gesunden Zellen mit Tumorzellen können aufgrund der exakten Arbeitstechnik ausgeschlossen werden.

Weitere Gründe können die Wahl der untersuchten chromosomalen Regionen und die eingesetzten Mikrosatellitenmarker sein.

Eine zu geringe Anzahl der zum Einsatz gekommenen Marker liegt eher nicht vor.

12 der 58 Patienten erlitten einen Progress, woran 10 Patienten verstarben. Das zeigt, dass bei den meisten Patienten richtig therapiert wurde, zeigt aber auch die schlechte Prognose bei einem Progress der Erkrankung.

Eine Arbeit mit ähnlichem Ziel zeigte Assoziationen zwischen Progress und Mikrosatelliteninstabilität. Hierbei zeigten sich jedoch nur Assoziationen zu pTa-pT1 Tumoren. Die Patientenzahl, die Anzahl der untersuchten Genorte sowie

die Anzahl der verwendeten Mikrosatellitenmarker waren deutlich geringer. Die Assoziationen waren stadienabhängig [185].

Eine andere Studie befasste sich mit Mikrosatellitenalterationen bei jungen Patienten, die zum Zeitpunkt der Diagnosestellung nicht älter als 45 Jahre waren. Anstoß der Studie war ursprünglich das Vorkommen von Mikrosatelliteninstabilitäten bei hereditären Tumoren. Mögliche Gemeinsamkeiten zum Harnblasenkarzinom sollten so aufgezeigt werden. Die Untersuchungen zeigten Mikrosatellitenalterationen in Form von Instabilitäten oder Deletionen. Die Veränderungen der jungen Patienten traten sehr häufig und früh im Rahmen der Tumorentstehung auf. Dabei waren die Veränderungen jedoch stadienabhängig. Aussagen über den Progress erlaubt die Studie nicht, da eine relativ kleine Patientenzahl vorlag. Signifikante Ergebnisse konnten nicht hervorgebracht werden [111].

Insgesamt zeigen sich unterschiedliche Ergebnisse der durchgeführten Mikrosatellitenanalysen verschiedener Studien. Dies könnte primär an den relativ kleinen Patientenzahlen liegen.

Bislang ist nur das Tumorstadium zum Zeitpunkt der Operation als signifikanter Prognoseparameter anzusehen.

Dieser Zeitpunkt ist eben genau für die Entscheidungsfindung der adäquaten operativen Therapie zu spät. Adjuvante Optionen bestehen weiter. Doch sollte man den Anspruch haben, richtig zu entscheiden, ob eine radikale Resektion gerechtfertigt ist und eine transurethrale Resektion möglicherweise von einem Rezidiv gefolgt würde. Bislang liegen keine entsprechenden Studien in ausreichender Größe vor, die hier vielversprechende Ergebnisse liefern. Prognostische Marker beim Urothelkarzinom der Harnblase haben sich im klinischen Alltag kaum durchgesetzt. Die Marker mit dem größten Interesse sind derzeit BTAstata, BTAttrak, NMP22, FDP, ImmunoCyt, Cytometrie, Quanticyt, Hb-dipstick, LewisX, FISH, Telomerase, Mikrosatelliten, CYFRA21-1, UBC, Cytokeratin20, BTA, TPS und die Zytologie. Wenn man die Sensitivität und die Spezifität der Marker vergleicht, haben die Mikrosatellitenanalyse, Immunocyt, NMP22, CYFRA21-1, LewisX und FISH zur Zeit das größte Potential für zukünftige Marker [187].

Die Mikrosatellitenanalyse präsentiert eine exzellente Sensitivität und Spezifität, dieses unabhängig von Tumorgrad und Tumorstadium [84]. Gerade diese

Eigenschaft zeichnet sie gegenüber anderen Methoden aus. Es gibt bis heute allerdings keine größeren prospektiven Studien zur Identifikation molekularer Progressionsmarker des Harnblasenkarzinoms anhand der Mikrosatellitenanalyse.

Sollte diese Technik einmal automatisiert werden, kann nach Durchführung großer prospektiver Studien das experimentelle Stadium dieses Verfahrens verlassen werden.

5.4.3. Therapie

Nach transurethraler Resektion von Harnblasenkarzinomen ist es weit verbreitet, eine intravesikale Chemo- oder Immuntherapie als adjuvante Therapie den Patienten zu verabreichen. Bei Tumoren mit fortgeschrittenem Stadium, Muskelinvasion oder bei Vorliegen von Metastasen wird meist eine systemische Chemotherapie durchgeführt. Die Intention einer intravesikalen Therapie liegt in der Eradikation durch direkte Zytoablation oder Immunstimulation. Die Harnblase bietet die einzigartige Möglichkeit für lokale medikamentöse Applikationen. Dies gibt Anstoß auch in weitere Verfahren wie Iontophorese/Elektrophorese, lokale Hyperthermie und Gentherapie zu investieren [156].

Damit gentherapeutisch gearbeitet werden kann, muss man die entsprechenden Zielorte kennen, das sind Onkogene und Tumorsuppressorgene.

Die Gentherapie birgt möglicherweise Vorteile gegenüber einer Chemotherapie: Eine hohe Selektivität gegenüber Tumorzellen mit mutierten Genen und Wiederherstellen von normalem Zellwachstum, indem genetische Defekte repariert werden, statt Zellen zu zerstören sowie Chemotherapieresistenz zu fördern. Bei der Konzeption einer Gentherapie sollte man sich somit auf die Umformung der mutierten Urothelzellen und auf die Wiederherstellung der korrekten Funktion von Tumorsuppressorgenen konzentrieren. Wichtiger Angriffsort ist dabei p53 [9, 112, 114].

Es gibt grundsätzlich zwei unterschiedliche Mechanismen der Gentherapie. Der Methode mit viralen Vektoren stehen die nichtviralen Vektoren gegenüber.

In Zukunft strebt man an, das experimentelle Stadium der Gentherapie zu verlassen. Als Grundlage der Entwicklung ist sicherlich weiterhin die genetische Charakterisierung und Identifikation der Zielorte anzusehen.

6. Zusammenfassung

6.1. Deutsche Zusammenfassung

Für diese Arbeit wurde eine genetische Charakterisierung des Urothelkarzinoms der Harnblase durchgeführt. Als Methode kam die Mikrosatellitenanalyse zum Einsatz. Von den asservierten Tumorproben waren 58 zur weiteren Untersuchung brauchbar.

Zudem gelang der Nachweis von freier DNA im Serum mit tumorspezifischen Veränderungen.

Mit der genetischen Charakterisierung des Urothelkarzinoms der Harnblase konnten verschiedene Alterationen lokalisiert werden. Die chromosomalen Regionen 5p, 5q, 8p, 13q, 14q und 17p wiesen Alterationen auf, welche signifikant mit fortgeschrittenem Tumorstadium und schlechter Differenzierung assoziiert waren ($p < 0,05$).

Unter Hilfe der Mikrosatellitenanalyse konnte in 79,3 % der Fälle eine serologische Diagnose erhoben werden. Hierbei war eine signifikante Assoziation mit schlechtem Differenzierungsgrad zu beobachten.

Das eigentliche Ziel war die Identifikation molekularer Progressionsmarker des Harnblasenkarzinoms anhand der Mikrosatellitenanalyse.

Nach fünf Jahren konnte ein Followup durchgeführt werden. Dazu standen 50 der 58 in der Arbeit untersuchten Patienten zur Verfügung.

Die Auswertung der Daten erbrachte keine signifikante Assoziation zwischen den identifizierten Mikrosatellitenmarkern und der Prognose der Erkrankung ($p > 0,05$). Nur das histopathologische Tumorstadium war mit der Progression assoziiert ($p < 0,05$).

Mit keiner der genetischen Alterationen war eine Vorhersage über den Progress möglich. Eine Ursache für die fehlende Bedeutung mag das relativ kleine untersuchte Kollektiv als die Wahl der verwendeten Marker sein.

Die Technik muss in großen prospektiven Studien angewandt werden.

6.2. Englische Zusammenfassung (Summary)

The clinical behaviour of urothelial bladder cancer is very heterogenic. To further elucidate circumstances leading to differences in clinical and biological behaviour we performed a genetic characterization of 58 bladder cancer samples applying fluorescent microsatellite analysis investigating the chromosomal regions 5q, 8p, 9p, 9q, 13q, 14q, 17p, 17q and 20q with a total of 17 polymorphic microsatellite markers. A further aim of the underlying study was to identify free tumour-DNA in blood serum.

The following chromosomal regions were significantly associated with advanced tumour stages and poor nuclear differentiation ($p < 0,05$): 5p, 5q, 8p, 13q, 14 and 17p.

Applying microsatellite analysis a serological tumour diagnosis was possible in 79.3 %. Serological tumour diagnosis was significantly associated with to high grade tumors.

After 5 years 50 of 58 patients were available for follow-up. Of interest, none of the chromosomal regions associated with poor tumour characteristics at initial investigation showed an association with clinical outcome on follow-up evaluation.

Clinical prognosis was only significantly associated with tumor stage.

In this study molecular allelotyping applying microsatellite analysis with 17 markers failed to identify progression markers after a 5 year follow-up period. The failure of this study to identify markers with prognostic potential may be explained by the small cohort of bladder cancer patients investigated. Therefore, larger prospective studies investigating additional chromosomal regions are warranted to prove the true value of chromosomal allelotyping for better estimating the prognosis of the heterogenic bladder cancer disease.

7. Literaturverzeichnis

1. Abraham R, Pagano F, Gomella LG, Baffa R. Chromosomal deletions in bladder cancer: shutting down pathways. *Front Biosci* 2007; **12**:826-38.
2. Adams J, Williams SV, Aveyard S, Knowles MA. Loss of heterozygosity analysis and DNA copy number measurement on p8 in bladder cancer reveals two mechanisms of allelic loss. *Cancer Res* 2005; **65**(1):66-75.
3. Alvarez A, Lokeshwar VB. Bladder cancer biomarkers: current developments and future implementation. *Curr Opin Urol* 2007; **17**(5):341-6.
4. Anker P, Mulcahy H, Chen XQ, Stroun M. Detection of circulating tumor DNA in the blood (plasma/serum) of cancer patients. *Cancer Metastasis Rev* 1999; **18**(1):65-73.
5. Anker P. Quantitative aspects of plasma/serum DNA in cancer patients. *Ann N J Acad Sci* 2000; **906**:5-7.
6. Aveyard JS, Skilleter A, Habuchi T, Knowles MA. Somatic mutation of PTEN in bladder carcinoma. *Br J Cancer* 1999; **80**(5-6):904-8.
7. Awata S, Sakagami H, Tozawa K, Sasaki S, Ueda K, Kohri K. Aberration of chromosomes 8 and 11 in bladder cancer as detected by fluorescence in situ hybridization. *Urol Res* 2000; **28**(3):185-90.
8. Balazs M, Carroll P, Kerschmann R, Sauter , Waldmann FM. Frequent homozygous deletion of cyclin-dependent kinase inhibitor 2 (MTS1, p16) in superficial bladder cancer detected by

fluorescence in situ hybridisation. *Genes Chromosomes Cancer* 1997; **19**(2):84-9.

9. Bast RC, Mills GB. Ovarian cancer: Methods and Protocols. *Human Press* 2000, pp.37-48.
10. Bell SM, Zuo J, Myers RM, Knowles MA. Fluorescence in situ hybridization deletion mapping at 4p16.3 in bladder cancer cell lines refines the localisation of the critical interval to 30 kb. *Genes Chromosomes Cancer* 1996; **17**(2):108-17.
11. Bentz M, Bergerheim US, Li C, Joos S, Werner CA, Baudis M et al. Chromosome imbalances in papillary renal cell carcinoma and first cytogenetic data of familial cases analyzed by comparative genomic hybridization. *Cytogenet Cell Genet* 1996; **75**(1):17-21.
12. Bohlander SK, Dreyling MH, Hagos F, Olopade I, Diaz MO. Mapping a putative tumor suppressor gene on chromosome 9 bands p21-p22 with microdissection probes. *Genomics* 1994; **24**(2):211-7.
13. Boland CR. Setting microsatellites free. *Nat Med* 1996; **2**(9):972-4.
14. Bova GS, Carter BS, Bussemakers MJ, Emi M, Fujiwara Y, Kyprianou N et al. Homozygous deletion and frequent allelic loss of chromosome 8p22 loci in human prostate cancer. *Cancer Res* 1993; **53**(17):3869-73.
15. Brake M, Loertzer H, Horsch R, Keller H. Recurrence and progression of stage T1, grade 3 transitional cell carcinoma of the bladder following intravesical immunotherapy with bacillus Calmette-Guerin. *J Urol* 2000; **163**(6):1697-701.

16. Brewster SF, Gingell JC, Browne S , Brown KW. Loss of heterozygosity on chromosome 18q is associated with muscle-invasive transitional cell carcinoma of the bladder. *Br J Cancer* 1994; **70**(4):697-700.
17. Bringuir PP, Tamimi Y, Schuurig E, Schalken J. Expression of cyclin D1 and EMS1 in bladder tumors; relationship with chromosome 11q13 amplification. *Oncogene* 1996; **12**(8):1747-53.
18. Brown JA, Anderl KL, Borell TJ, Quian J, Bostwick DG, JenkinsRB. Simultaneous chromosome 7 and 17 gain and sex chromosome loss provide evidence that renal metanephric adenoma is related to papillary renal carcinoma. *J Urol* 1997; **158**(2):370-4.
19. Brunner A, Ensinger C, Christiansen M, Heiss S, Verdorfer I, Mikuz G, Tzankov A. Expression and prognostic significance of Tetranectin in invasive and non-invasive bladder cancer. *Virchows Arch* 2007; **450**(6):659-64.
20. Bugert P, Knobloch R von, Kovacs G. Duplication of two distinct regions on chromosome 5q in non-papillary renal-cellcarcinomas. *Int J Cancer* 1998; **76**(3).
21. Bugert P, Kovacs G. Molecular differential diagnosis of renal cell carcinomas by microsatellite analysis. *Am J Pathol* 1996; **149**(6): 2081-8.
22. Cairns P, Evron E, Okami K, Halchmi N, Esteller M, Herman JG et al. Point mutation and homozygous deletion of PTEN/MMAC1 in primary bladder cancers. *Oncogene* 1998; **16**(24):3215-8.

23. Cairns P, Polascik TJ, Eby Y, Tokino K, Califano J, Merlo A et al. Frequency of homozygous deletion at p16/CDKN1 in primary human tumors. *Nat Genet* 1995; **11**(2):210-2.
24. Cairns P, Proctor AJ, Knowles MA. Loss of Heterozygosity at the RB locus is frequent and correlates with muscle invasion in bladder cancer. *Oncogene* 1991; **6**(12):2305-9.
25. Cairns P, Shaw ME, Knowles MA. Preliminary mapping of the deleted region of chromosome 9 in bladder cancer. *Cancer Res* 1993; **53**(6):1230-2.
26. Cairns P, Tokino K, Eby Y, Sidransky D. Localization of tumor suppressor loci on chromosome 9 in primary human renal cell carcinomas. *Cancer Res* 1995; **55**(2):224-7.
27. Cappellen D, Gil Diez DM, Chopin D, Thiery JP, Radvanyi F. Loss of heterozygosity of chromosome 10 q in muscle-invasive transitional cell carcinomas of the bladder. *Oncogene* 1997; **14**(25):3059-66.
28. Chang WY, Cairns P, Schoenberg MP, Polascik TJ, Sidransky D. Novel suppressor loci on chromosome 14q in primary bladder cancer. *Cancer Res* 1995; **55**(15):3246-9.
29. Chen X, Bonnefoi H, Diebold-Berger S, Lyautey J, Lederrery C, Faltin-Taub E et al. Detecting tumor-related alterations in plasma or serum DNA of patients diagnosed with breast cancer. *Clin Cancer Res* 1999; **5**(9):2297-303.
30. Chen XQ, Stroun M, Magnenat JL, Nicod LP, Kurt AM, Lyautey J et al. Microsatellite alterations in plasma DNA of small cell lung cancer patients. *Nat Med* 1996; **2**(9):1033-5.

31. Chuang CK, Chu DC, Tzou RD, Liou SI, Chia JH, Sun CF. Hypermethylation of the CpG islands in the promoter region flanking GSTP1 gene is a potential plasma DNA biomarker for detecting prostate carcinoma. *Cancer Detect Prev* 2007; **31**(1):59-63.
32. Chudek J, Wilhelm M, Bugert P, Herbers J, Kovacs G. Detailed microsatellite analysis of chromosome 3p region in nonpapillary renal cell carcinomas. *Int J Cancer* 1997; **73**(2):225-9.
33. Chugthai SA, Crundwell MC, Cruickshank NR, Affie E, Armstrong S, Knowles MA et al. Two novel regions of interstitial deletion on chromosome 8p in colorectal cancer. *Oncogene* 1999; **18**(3):657-65.
34. Cookson MS, Herr HW, Zhang ZF, Soloway S, Sogani PC, Fair WR. The treated natural history of high risk superficial bladder cancer: 15- year outcome. *J Urol* 1997; **158**(1):62-7.
35. Coombs LM, Pigott DA, Sweeney E, Proctor AJ, Eydmann ME, Parkinson C et al. Amplification and over-expression of c-erbB-2 in transitional cell carcinoma of the urinary bladder. *B J Cancer* 1991; **63**(4):601-8.
36. Cordon-Cardo C, Wartinger D, Pertylak D, Dalbagni G, Fair WR, Fuks Z et al. Altered expression of the retinoblastoma gene product: prognostic indicator in bladder cancer. *J Natl Cancer Inst* 1992; **84**(16):1251-6.
37. Cordon-Cardo C, Zhang ZF, Dalbagni G, Drobnjak M, Charytonowicz E, Hu SX et al. Cooperative effects of p53 and pRB alterations in primary superficial bladder tumors. *Cancer Res* 1997; **57**(7):1217-21.

38. Corless CI, Aburatani H, Fletcher JA, Housman DE, Amin MB, Weinberg DS. Papillary renal cell carcinoma: quantitation of chromosomes 7 and 17 by FISH, analysis of chromosome 3p for LOH and DNA ploidy. *Diagn Mol Pathol* 1996; **5**(1):53-64.
39. Coulet F, Blons H, Cabelguenne A, Lecomte T, Lacourreye O, Brasnu D et al. Detection of plasma tumor DNA in head and neck squamous cell carcinoma by microsatellite typing and p53 mutation analysis. *Cancer Res* 2000; **60**(3):707-11.
40. Crawford JM. The origins of bladder cancer. *Lab Invest* 2008; **88**(7):686-93.
41. Crundwell MC, Chugthai S, Knowles MA, Takle L, Luscombe M, Neoptolemos JP et al. Allelic loss on chromosomes 8p, 22q and 18q (DCC) in human prostate cancer. *Int J Cancer* 1996; **69**(4):295-300.
42. Dalbagni G, Presti J, Reuter V, Fair WE, Cordon-Cardo C. Genetic alterations in bladder cancer. *Lancet* 1993; **342**(8869):412-27.
43. Dalbagni G, Presti JC, Jr., Reuter VE, Zhang ZF, Sarkis AS, Fair WR et al. Molecular genetic alterations of chromosome 17 and p53 nuclear overexpression in human bladder cancer. *Diag Mol Pathol* 1993; **2**(1):4-13.
44. Dalbagni G, Ren ZP, Herr H, Cordon-Cardo C, Reuter V. Genetic alterations in tp53 in recurrent urothelial cancer: a longitudinal study. *Clin Cancer Res* 2001; **7**(9):2797-801.
45. Devlin J, Keen AJ, Knowles MA. Homozygous deletion mapping at 9p21 in bladder carcinoma defines a critical region within 2cM of IFNA. *Oncogene* 1994; **9**(9):2757-60.

46. Duffy MJ, O`Donovan N, Brennan DJ, Gallagher WM, Ryan BM. Survivin: a promising tumor marker. *Cancer Lett* 2007; **249**(1):49-60.
47. Durnick S. Pre-processing of microarray data and analysis of differential expression. *Methods Mol Biol* 2008; **452**:89-110.
48. Eisenberger CF, Schoenberg M, Enger C, Hortopan S, Shah S, Chow NH et al. Diagnosis of renal cancer by molecular urineanalysis. *J Natl Cancer Inst* 1999; **91**(23):2028-32.
49. Elder PA, Bell SM, Knowles MA. Deletion of two regions on chromosome 4 in bladder carcinoma: definition of a critical 750 kb region at 4p16.3. *Oncogene* 1994; **9**(12):3433-6.
50. Emanuel A, Szucs S, Weier HU, Kovacs G. Clonal aberrations of chromosomes X Y, 7 and 10 in normal kidney tissue of patients with renal cell tumors. *Genes Chromosomes Cancer* 1992; **4**(1):75-7.
51. Esring D, Elmajian D, Groshen S, Freeman JA, Stein JP, Chen SC et al. Accumulation of nuclear p53 and tumor progression in bladder cancer. *N Engl J Med* 1994; **331**(19):1259-64.
52. Fearon ER, Feinberg AP, Hamilton SH, Vogelstein B. Loss of genes on the short arm of chromosome 11 in bladder cancer. *Nature* 1985; **318**(6044):377-80.
53. Fearon ER, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 1990; **61**(5):759-67.
54. Fitzgerald JM, Ramchurren N, Rieger K, Levesque P, Silverman M, Libertino JA et al. Identification of H-Ras mutations in urine

sediments complements cytology in the detection of bladder tumors. *J Natl Cancer Inst* 1995;**87**(2):129-33.

55. Ghaleb AH, Pizzolo JG, Melamed MR. Aberrations of chromosomes 9 and 17 in bilharzial bladder cancer as detected by fluorescence in situ hybridization. *Am J Clin Pathol* 1996; **106**(2):234-41.
56. Goessl C, Heicappell R, Munker R, Anker P, Stroun M, Krause H et al. Microsatellite analysis of plasma DNA from patients with clear cell renal carcinoma. *Cancer Res* 1998; **58**(20):4728-32.
57. Goessl C. DNA-Analyse von Körperflüssigkeiten als molekularer Marker für die Diagnostik urologischer Tumoren. Berlin: 2001.
58. Grady WM, Willis J, Guilford PJ, Dunbier AK, Toro TT, Lynch H et al. Methylation of the CDH1 promoter as the second genetic hit in hereditary diffuse gastric cancer. *Nat Genet* 2000; **26**(1):16-7.
59. Habuchi T, Devlin J, Elder PA, Knowles MA. Detailed deletion mapping of chromosome 9q in bladder cancer: evidence for two tumor suppressor loci. *Oncogene* 1995; **11**(8):1671-4.
60. Habuchi T, Luscombe M, Elder PA, Knowles Ma. Structure and methylation-based silencing of a gene (DBCCR1) within a candidate bladder cancer tumor suppressor region at 9q32-q33. *Genomics* **48**(3):277-88.
61. Habuchi T, Takahashi R, Yamada H, Ogawa O, Kakehi Y, Ogura K et al. Influence of cigarette smoking and schistosomiasis on p53 gene mutation in urothelial cancer. *Cancer Res* 1993; **53**(16):3795-9.

62. Habuchi T, Takahashi T, Kakinuma H, Wang L, Tsuchiya N, Satoh S et al. Hypermethylation at 9q32-33 tumor suppressor region is age-related in normal urothelium and an early frequent alteration in bladder cancer. *Oncogene* 2001; **20**(4):531-7.
63. Habuchi T, Yoshida O, Knowles MA. A novel candidate tumor suppressor locus at 9q32-33 in bladder cancer: localization of the candidate region within a single 840 kb YAC. *Hum Mol Gent* 1997; **6**(6):913-9.
64. Hanke S, Bugert P, Chudek J, Kovacs G. Cloning a calcium channel alpha2delta-3 subunit gene from a putative tumor suppressor gene region at chromosome 3p21.1 in conventional renal cell carcinoma. *Gene* 2001; **264**(1):69-75.
65. Hankey BF, Ries LA, Edwards BK. The surveillance, epidemiology, and the end results program: a national resource. *Cancer Epidemiol Biomarkers* 1999 Prev 8:1117-1121.
66. Hartmann A, Moser K, Kriegmair M, Hoffsteter A Hofstaedter F, Knuechel R. Frequent genetic alterations in simple urothelial hyperplasias of the bladder in patients with papillary urothelial carcinoma. *Am J Pathol* 1999; **154**(3):721-7.
67. Hautmann S, Eggers , Meyhoff H, Melchior D, Munk A, Hamann M, Naumann M, Braun PM, Jünemann KP. Tumor markers for bladder cancer. Up-to-date study by the Kiel Tumor Bank. *Urologe* 2007; **46**:1508-13.
68. Herman JG, Latif F, Weng Y, Lerman MI, Zbar B, Liu S et al. Silencing of the VHL tumor-suppressor gene by DNA methylation in renal carcinoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; **91**(21):9700-4.

69. Herr HW, Reuter VE. Progression of T1 bladder tumors: better staging or better biology? *Cancer* 1999; **86**(6).
70. Herr HW. Tumor progression and survival in patients with T1G3 bladder tumors: 15-year outcome. *Br J Urol* 1997; **80**(5):762-5.
71. Hibi K, Robinson MR, Booker S, Wu L, Hamilton SR, Sidransky D et al. Molecular detection of genetic alterations in the serum of colorectal cancer patients. *Cancer Res* 1998; **58**(7):1405-7.
72. Holmäng S, Hedelin H, Anderstrom C, Johansson SL. The relationship among multiple recurrences, progression and prognosis of patients with stages Ta and T1 transitional cell cancer of the bladder followed for at least 20 years. *J Urol* 1995; **153**(6):1823-6.
73. Hovey RM, Chu L, Balazs M, De Vries S, Moore D, Sauter G et al. Genetic alterations in primary bladder cancers and their metastases. *Cancer Res* 1998; **58**(16):3555-60.
74. Ishikawa J, Xu HJ, Hu SX, Yandell DW, Maeda S, Kamidono S et al. Inactivation of retinoblastoma gene in human bladder cancer and renal cell carcinomas. *Cancer Res* 1991; **51**(20):5736-43.
75. Jäger T, Szarvas T, vom Dorp F, Börgermann C, Schenk M, Schmid KW, Rübber H. Use of silicon chip technology to detect protein-based tumor markers in bladder cancer. *Urologe* 2007; **46**:1152-6.
76. Kagan J, Liu J, Stein D, Wagner SS, Babkowski R, Grossman BH et al. Cluster of allele loss within a 2.5 cM region of chromosome 10 in high-grade invasive bladder cancer. *Oncoene* 1998; **16**(7):909-13.

77. Kälble T, von Knobloch R, Köhl U, Riedmiller H. Bladder carcinoma – indication for transurethral electro resection or primary radical cystectomy. *Aktuel Urol* 2000; **31** (Supplement 1):25-7.
78. Kallioniemi A, Kallioniemi OP, Citro G, Sauter G, De Vries S, Kerschmann R et al. Identification of gains and losses of DNA sequences in primary bladder cancer by comperative genomic hybridization. *Genes Chromosomes Cancer* 1995; **12**(3):213-9.
79. Kassen A, Hofmockel G. [Molecular genetic and cell biology principles for the development of malignant tumors]. *Urologe A* 2000; **39**(3):214-21.
80. Kassouf W, Black PC, Tuziak T, Bondaruk J, Lee S, Brown A, Adam L, Wei C, Baggerly K, ar-Eli M, McConkey D, Czerniak B, Dinney CP. Distinctive Expression Pattern of ErbB Family Receptors Signifies an Aggressive Variant of Bladder Cancer. *J Urol* 2008; **179**(1):353-8.
81. Kawakami K, Brabender J, Lord RV, Groshen S, Greenwald BD, Krasna MJ et al. Hypermethylated APC DNA in plasma and prognosis of patients with esophageal adenocarcinoma. *J Natl Cancer Inst* 2000; **92**(22):1805-11.
82. Kim EJ, Kim Yj, Jeong P, Ha YS, Bae SC, Kim WJ. Methylation of the RUNX3 promoter as a potential prognostic marker for bladder tumor. *J Urol* 2008; **180**(3):1141-5.
83. Kim YK, Kim WJ. Epigenetic markers as promising prognosticators for bladder cancer. *Int J Urol* 2008; [Epub ahead of print].
84. Knobloch R von, Brandt H, Schrader AJ, Heidenreich A, Hofmann R. Molecular serological detection of DNA alterations in

transitional cell carcinoma is highly sensitive and stage independent. *Clin Cancer Res* 2004; **10**(3):988-93.

85. Knobloch R von, Hegele A, Brandt H, Olbert P, Heidenreich A, Hofmann R. Serum DNA and urine DNA alterations of urinary transitional cell bladder carcinoma detected by fluorescent microsatellite analysis. *Int J Cancer* 2001; **94**(1):67-72.
86. Knobloch R von, Hegele A, Brandt H, Varga Z, Wille S, Kälble T, Heidenreich A, Hofmann R. High frequency of Serum DNA alterations in renal cell carcinoma detected by fluorescent microsatellite analysis. *Int J Cancer* 2002; **98**(6):889-94.
87. Knowles MA, Elder PA, Williamson M, Cairns P, Shaw E, Law MG. Allelotype of human bladder cancer. *Cancer Res* 1994; **54**(2):531-8.
88. Knowles MA, Williamson M. Mutation of H-Ras is infrequent in bladder cancer: confirmation by single-stand confirmation polymorphism analysis, designed restriction fragment length polymorphisms, and discrete sequencing. *Cancer Res* 1993; **53**(1):133-9.
89. Knowles MA. The genetics of transitional cell carcinoma: progress and potential clinical application. *BJU Int* 1999; **84**(4):412-27.
90. Knudson AG, Jr., Strong LC. Mutation and cancer: a model for Wilms' Tumor of the kidney. *J Natl Cancer Inst* 1972; **48**(2):313-24.
91. Koffler D, Agnello V, Winchester R, Kunkel HG. The occurrence of single-stranded DNA in the serum of patients with systemic lupus erythematosus and other diseases. *J Clin Invest* ; **52**(1):198-204.

92. Kovacs G, Akhtar M, Beckwitsch BJ, Bugert P, Cooper CS, Delahunt B et al. The Heidelberg classification of renal cell tumors. *J Pathol* 1997; **183**(2):131-3.
93. Kovacs G. [Molecular genetics and diagnosis of renal cell tumors]. *Urologe A* 1999; **38**(5):433-41.
94. Latif F, Tory K, Gnarr J, Yao M, Duh FM, Orcutt ML et al. Identification of the Hippiel-Lindau disease tumor suppressor gene. *Science* 1993; **260**(5112):1317-20.
95. Lemar ES, Getzenberg RH. Nuclear structure as a source of cancer specific biomarkers. *J Cell Biochem* 2007; Article online in advance of print.
96. Leon SA, Ehrlich GE, Shapiro B, Labbate VA. Free DNA in the serum of rheumatoid arthritis patients. *J Rheumatol* 1977; **4**(2):139-43.
97. Leon SA, Green A, Yaros MJ, Shapiro B. Radioimmunoassay for nanogram quantities of DNA. *J Immunol Methods* 1975; **9**(2):157-64.
98. Leon SA, Shapiro B, Sklaroff DM, Yaros MG. Free DNA in the serum of bladder cancer patients and the effect of therapy. *Cancer Res* 1977; **37**(3):646-50.
99. Li M, Zhang ZF, Reuter VE, Cordon-Cardo C. Chromosome 3 allelic losses and microsatellite alterations in transitional cell carcinoma of the urinary bladder. *Am J Pathol* 1996; **149**(1):229-35.
100. Lin X, Tascilar M, Lee WH, Vles WJ, Lee BH, Veeraswamy R, Asgari K, Freije D, van Rens B, Gage WR, Bova GS, Isaacs WB, Brooks JD, DeWeese TL, De Marzo AM, Nelson WG. GCTP1 CG

island hypermethylation is responsible for the absence of GSTP1 expression in human prostate cancer cells. *Am J Path* 2001; **159**(5):1815-26.

101. Lipponen PK, Liukkonen TJ. Reduced expression of retinoblastoma (Rb) gene protein is related to cell proliferation and prognosis in transitional-cell bladder cancer. *J Cancer Res Clin Oncol* 1995;**121**(1):44-50.
102. Lo YM, Wong IH, Zhang J, Tein MS, NG MH Hjelm NM. Quantitative analysis of aberrant p16 methylation using real-time quantitative methylation-specific polymerase chain reaction. *Cancer Res* 1999; **59**(16):3899-903.
103. Logothetis CJ, Xu HJ, Ro JY, Hu SX, Sahin A, Ordonez N et al. Altered expression of retinoblastoma protein and known prognostic variables in locally advanced bladder cancer. *J Natl Cancer Inst* 1992; **84**(16):1256-61.
104. Lopez-Beltran A, Alvarez-Kindelan J, Luque RJ, Blanca A, Quintero A, Montironi R, Cheng L, Gozalez-Camporab R, Requena MJ. Loss of heterozygosity at 9q32-33 (DBC1 locus) in primary non-invasive papillary urothelial neoplasm of low malignant potential and low-grade urothelial carcinoma of the bladder and their associated normal urothelium. *J Path* 2008; **215**(3):263-72.
105. Malone PR, Visvanathan KV, Ponder BA, Shearer RJ, Summerhayes IC. Oncogenes and bladder cancer. *B J Urol* 1985; **57**(6):664-7.
106. Margulis V, Lotan Y, Shariat SF. Survivin : a promising biomarker for detection and prognosis of bladder cancer. *World J Urol* 2007; [Epub ahead of print].

107. Matsumoto K, Irie A, Satho T, Ishii J, Iwabuchi K, Iwamura M, Egawa S, Baba S. Expression of S100A2 and S100A4 predicts for disease progression and patient survival in bladder cancer. *Urology* 2007; **70**(3):602-7.
108. Mellon JK, Lunec J, Wright C, Horne CH, Kelly P, Neal DE. C-erbB-2 in bladder cancer: molecular biology, correlation with epidermal growth factor receptors and prognostic value. *J Urol* 1996; **155**(321-6).
109. Melonie AM, Peier AM, Haddad FS, Powell IJ, Block AW, Huben RP et al. A new approach in the diagnosis and follow-up of bladder cancer. FISH analysis of urine, bladder washings and tumors. *Cancer Genet Cytogenet* 1993; **71**(2):105-18.
110. Mhawech-Faucecia P, Cheney RT, Schwaller J. Genetic Alterations in Urothelial Bladder Carcinoma. *Cancer* 2006; **106**(6):1205-16.
111. Migaldi M, Sartori G, Rossi G, Garagnari L, Faragila B, De Gaeti C, Cittadini A, Trentini GP, Sgambato A. Prevalence and prognostic significance of microsatellite alterations in young patients with bladder cancer. *Mod Pathol* 2005; **18**(9):1176-86.
112. Mitra AP, Birkhahn M, Cote RJ. p53 and retinoblastoma pathways in bladder cancer. *World J Urol* 2007; **25**(6):563-571.
113. Mitra AP, Cole RJ. Molecular pathways and diagnostics of bladder cancer. *Annu Rev Pathol* 2009; **4**:251-85.
114. Mitra AP, Datar RH, Cote R. Molecular pathways in invasive bladder cancer: new insights into mechanisms, progression and target identification. *J Clin Oncol* 2006; **24**(35):5552-64.

115. Moch H, Presti JC, Jr., Sauter G, Buchholz N, Jordan P, Mihatsch MJ et al. Genetic aberrations detected by comparative genomic hybridization are associated with clinical outcome in renal cell carcinoma. *Cancer Res* 1996; **56**(1):27-30.
116. Moch H, Schraml P, Bubendorf L, Richter J, Gasser TC, Mihatsch J et al. Intratumoral heterogeneity of von Hippel-Lindau gene deletions in renal cell carcinoma detected by fluorescence in situ hybridization. *Cancer Res* 1998; **58**(11):2304-9.
117. Moonen PM, van Balken-Ory B, Kiemeny LA, Schalken JA, Witjes JA. Prognostic value of 53 for high risk superficial bladder cancer with long-term followup. *J Urol* 2007; **177**(1):80-3.
118. Moriyama M, Akiyama T, Yamamamoto T, Kawamoto T, Kato T, Sato K et al. Expression of c-erbB-2 gene product in urinary bladder cancer. *J Urol* 1991; **145** (2):423-7.
119. Mulcahy HE, Lyautey J, Lederrey C, Qi C, X, Anker P, Astead EM et al. A prospective study of K-ras mutations in the plasma of pancreatic cancer patients. *Clin Cancer Res* 1998; **4**(2):271-5.
120. Muscheck M, Sukosd F, Pesti T, Kovacs G. High density deletion mapping of bladder cancer localizes the putative tumor suppressor gene between loci D8S504 and D8S264 at chromosomes 8p23.3. *Lab Invest* 2000; **80**(7):1089-93.
121. Nawroz H, Koch W, Anker P, Stroun M, Sidransky D. Microsatellite alterations in serum DNA of head and neck cancer patients. *Nat Med* 1996; **2**(9):1035-7.
122. Neely LA, Rieger-Christ KM, Neta S, Eroshkin A, Graver J, Patel S, Phung NA, McLaughlin S, Libertino JA, Whitney D,

Summerhayes IC. A microRNA expression ratio defining the invasive phenotype in bladder tumors. *Urol Oncol* 2008 [Epub ahead of print].

123. 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; **14**(8):238.
124. Nielsen ME, Gonzalgo ML, Schoenberg MP, Getzenberg RH. Toward critical evaluation of the role(s) of molecular biomarkers in the management of bladder cancer. *World J Urol* 2006; **24**(5):499-508.
125. Nishiyama H, Takahashi T, Kakehi Y, Habushi T, Knowles MA. Homozygous deletion at the 9q32-33 candidate tumor suppressor locus in primary human bladder cancer. *Genes Chromosomes Cancer* 1999; **26**(2):171-5.
126. Nobori T, Miura K, Wu D, Lois A, Takabayashi , Carson DA. Deletion of the cyclin-dependent kinase-4 inhibitor gene in multiple human cancers. *Nature* 1994; **368**(6473):753-6.
127. Ogaki K, Iida A, Ogawa O, Kubota Y, Akimoto M, Emi M. Localization of tumor suppressor gene associated with distant metastasis of urinary bladder cancer to a 1-Mb interval on 8p22. *Genes Chromosomes Cancer* 1999; **25**(1):1-5.
128. Orlow I, Lacombe L, Hannon G, Serrano M, Pellicer I, Dalbagni G et al. Deletion of the p16 and p15 genes in human bladder tumors. *J Natl Cancer Inst* 1995; **87**(20):1524-9.

129. Oya M, Schmidt B, Schmitz-Drager B, Schulz WA. Expression of G1→S transition regulatory molecules in human urothelial cancer. *Jpn J Cancer Res* 1998; **89**(7):719-26.
130. Palmedo G, Fischer J, Kovacs G. Fluorescent microsatellite analysis reveals duplication of specific chromosomal regions in papillary renal cell tumors. *Lab Invest* 1997; **77**(6).
131. Polascik T, Cairns P, Chang WY, Schoenberg MP, Sidransky D. Distinct regions of allelic loss on chromosome 4 in human primary bladder carcinoma. *Cancer Res* 1995; **55**(22):5396-9.
132. Presti JC, Jr., Moch H, Reuter VE, Cordon-Cardo C, Waldmann FM. Renal cell carcinoma genetic analysis by comparative genomic hybridization and restriction fragment length polymorphism analysis. *J Urol* 1996; **156**(1): 281-5.
133. Presti JC, Jr., Reuter VE, Galan T, Fair WR, Cordon-Cardo C. Molecular genetic alterations in superficial and locally advanced human bladder cancer. *Cancer Res* 1991; **51**(19):5405-9.
134. Proctor AJ, Coombs LM, Cairns JP, Knowles MA. Amplification at chromosome 11q13 in transitional cell tumors of the bladder. *Oncogene* 1991; **6**(5):789-95.
135. Pycha A, Mian C, Haitel A, Hofbauer J, Wiener H, Marberger. Fluorescence in situ hybridization identifies more aggressive types of primarily noninvasive (stage pTa) bladder cancer. *J Urol* 1997; **157**(6):2116-9.
136. Pycha A, Mian C, Posch P, Haitel A, El Baz M, Ghoneim MA et al. Numerical aberrations of chromosomes 7, 9 and 17 in squamous cell and transitional cell cancer of the bladder: a comparative study

- performed by fluorescence in situ hybridization. *J Urol* 1998; **160**(3 pt 1): 737-40.
137. Reznikoff CA, Belair CD, Yeager TR, Savelieva E, Bleloch RH, Puthenveetil JA et al. A molecular genetic model of human bladder cancer pathogenesis. *Semin Oncol* 1996; **23**(5):571-84.
138. Richter J, Beffa L, Wagner U, Schraml P, Gasser TC, Moch H et al. Patterns of chromosomal imbalances in advanced urinary bladder cancer detected by comparative genomic hybridization. *Am J Pathol* 1998; **153**(5):1615-21.
139. Richter J, Jiang F, Gorog JP, Sartorius G, Egenter C, Gasser TC, et al. Marked genetic differences between stage pTa and stage pT1 papillary bladder cancer detected by comparative genomic hybridization. *Cancer Res* 1997, **57**(14):2860-4.
140. Rosin MP, Cairns P, Epstein JL, Schoenberg MP, Sidransky D. Partial allelotype of carcinoma in situ of the human bladder. *Cancer Res* 1995; **55**(22):5213-6.
141. Sanchez-Carbayo M, Socci ND, Kirchoff T, Erill N, Offit K, Bochner BH, Cordon- Cardo C. A polymorphism in HDM2 (SNP309) associates with early onset in superficial tumors, TP53 mutations, and poor outcome in invasive bladder cancer. *Clin Cancer Res* 2007; **13**(11):3215-20.
142. Sanchez-Carbayo M. Use of DNA microarrays to identify biomarkers for bladder cancer. *Clin Chem* 2003; **49**(1):23-31.
143. Sandberg AA, Berger CS. Review of chromosome studies in urological tumors. II. Cytogenetics and molecular genetics of bladder cancer. *J Urol* 1994; **151**(3):545-60.

144. Sarkis AS, Dalbagni G, Cordon-Cardo C, Melamed J, Zhang ZF, Sheinfeld J et al. Association of p53 nuclear overexpression and tumor progression in carcinoma in situ of the bladder. *J Urol* 1994; **152**(2Pt 1):388-92.
145. Sarkis AS, Dalbagni G, Cordon-Cardo C, Zhang ZF, Sheinfeld J, Fair WR et al. Nuclear overexpression of p53 protein in transitional cell bladder carcinoma: a marker for disease progression. *J Natl Cancer Inst* 1993; **85**(1):53-9.
146. Sauter G, Gasser TC, Moch H, Richter J, Jiang F, Albrecht R et al. DNA aberrations in urinary bladder cancer detected by flow cytometry and FISH. *Urol Res* 1997; **25 Suppl 1** : S37-S43.
147. Sauter G, Mihatsch MJ. Pussycats and baby tigers: non-invasive (pTa) and minimally invasive (pT1) bladder carcinomas are not the same! *J Pathol* 1998; **185**(4):339-41.
148. Sauter G, Moch H, Carroll P, Kerschmann R, Mihatsch MJ, Waldmann FM. Chromosome-9 loss detected by fluorescence in situ hybridization in bladder cancer. *Int J Cancer* 1995; **64**(2):99-103.
149. Sauter G, Moch H, Moore D, Carroll P, Kerschmann R, Chew K et al. Heterogeneity of erbB-2 gene amplification in bladder cancer. *Cancer Res* 1993; **53**(10 Suppl):2199-203.
150. Schraml P, Struckmann K, Bednar R, Fu W, Gasser T, Wilber K et al. CDKN2A mutation analysis, protein expression, and deletion mapping of chromosome 9p in conventional clear-cell renal carcinomas: evidence for a second tumor suppressor gene proximal to CDKN2A. *Am J Pathol* 2001; **158**(2):593-601.

151. Schullerus D, Herbers J, Chudek J, Kanamaru H, Kovacs G. Loss of heterozygosity at chromosomes 8p, 9p, and 14q is associated with stage and grade of non-papillary renal cell carcinomas. *J Pathol* 1997; **183**(2):151-5.
152. Shapiro B, Chakrabarty M, Cohn EM, Leon SA. Determination of circulating DNA levels in patients with benign or malignant gastrointestinal disease. *Cancer* 1983; **51**(11):2116-22.
153. Shariat S, Karam JA, Lerner SP. Molecular markers in bladder cancer. *Curr Opin Urol* 2008; **18**(1):1-8.
154. Shaw JA, Smith BM, Walsh T, Johnson S, Primrose L, Slade MJ et al. Microsatellite alterations plasma DNA of primary breast cancer patients. *Clin Cancer Res* 2000; **6**(3):1119-24.
155. Shaw ME, Knowles MA. Deletion mapping of chromosome 11 in carcinoma of the bladder. *Genes Chromosomes Cancer* 1995; **13**(1):1-8.
156. Shen Z, Shen T, Wientjes MG, O'Donnell MA, Au JS-L. Intravesical Treatments of bladder cancer: Review. *Pharm Res* 2008; **25**(7):1500-1510.
157. Sidransky D, Frost P, Von Eschenbach A, Oyasu R, Preisinger AC; Vogelstein B. Clonal origin bladder cancer. *N Engl J Med* 1992; **326**(11):737-40.
158. Sidransky D, Von Eschenbach A, Tsai YC, Jones P, Summerhayes I, Mashall F et al. Identification of p53 gene mutations in bladder cancers and urine samples. *Science* 1991; **252**(5006):706-9.

159. Sidransky D. Nucleic acid-based methods for the detection of cancer. *Science* 1997; **278**(5340):1054-9.
160. Silva JM, Dominguez G, Garcia M, Gonzalez R, Villanueva MJ, Navarro F et al. Presence of tumor DNA in plasma of breast cancer patients: clinicopathological correlations. *Cancer Res* 1999; **59**(13):3251-6.
161. Simoneau M, Aboukassim TO, LaRue H, Rousseau F, Fradet Y. Four tumor suppressor loci on chromosome 9q in bladder cancer : evidence for two novel candidate regions at 9q22.3 and 9q31. *Oncogene* 1999; **18**(1):157-63.
162. Sobin LH, Wittekind C. TNM classification of malignant tumors. 5 th ed. John Wiley & Sons, Inc., 1997.
163. Solomon LZ, Birch BR, Cooper AJ. Water as tumoricidal agent in bladder cancer. In vitro studies in parenteral and resistant cell lines. *Europ Urol* 1998; **34**(6):500-4.
164. Sozzi G, Conte D, Mariani L, Lo VS, Roz L, Lombardo C et al. Analysis of circulating tumor DNA in plasma at diagnosis and during follow-up of lung cancer patients. *Cancer Res* 2001; **61**(12):4675-8.
165. Sozzi G, Musso K, Ratcliffe C, Goldstraw P, Pierotti MA, Pastorino U. Detection of microsatellite alterations in plasma DNA of non-small cell lung cancer patients: a prospect for early diagnosis. *Clin Cancer Res* 1999; **5**(10):2689-92.
166. Spruck CH, III, Gonzales-Zulueta M, Shibata A, Simoneau AR, Lin MF, Gonzalez F et al. P16 gene in uncultured tumors. *Nature* 1994; **370**(6486):183-4.

167. Spruck CH, III, Ohneseit PF, Gonzalez-Zulueta M, Esring D, Miyao N, Tsai YC et al. Two molecular pathways to transitional cell carcinoma of the bladder. *Cancer Res* 1994; **54**(3):784-8.
168. Spruck CH, III, Rideout WM, III, Olumi AF, Ohneseit PF, Yang AS, Tsai YC et al. Distinct pattern of p53 mutations in bladder cancer: relationship to tobacco usage. *Cancer Res* 1993; **53**(5):1162-6.
169. Stadler WM, Olopade OI. The 9p21 region in bladder cancer cell lines: large homozygous deletion inactivate the CDKN2, CDKN2B and MTAP genes. *Urol Res* 1996; **24**(4):239-44.
170. Stadler WM, Steinberg G, Yang X, Hagos F, Turner C, Olopade OI. Alterations of the 9p21 and 9q33 chromosomal bands in clinical bladder cancer specimens by fluorescence in situ hybridization. *Clin Cancer Res* 2001; **7**(6):1676-82.
171. Steiner G, Sidransky D. Molecular differential diagnosis of renal carcinoma: from microscopes to microsatellites. *Am J Pathol* 1996; **149**(6):1791-5.
172. Steinmann CR. Free DNA in serum and plasma from normal adults. *J Clin Invest* 1975; **56**(2):512-5.
173. Störkel S, Eble JN, Adlakha K, Amin M, Blute ML, Bostwick DG et al. Classification of renal cell carcinoma: Workgroup no. 1. Union internationale Contre le Cancer (UICC) and the American Joint Committee on Cancer (AJCC). *Cancer* 1997; **80**(5):987-9.
174. Stroun M, Anker P, Maurice P, Lyautey J, Lederrey C, Beljansky M. Neoplastic characteristics of the DNA found in the Plasma of cancer patients. *Oncology* 1989; **46**(5):318-22.

175. Stroun M, Anker P, Lyautey J, Lederrey C, Maurice PA. Isolation and characterization of DNA from the plasma of cancer patients. *Eur J Cancer Clin Oncol* 1987; **23**(6):707-12.
176. Sunwoo JB, Sun PC, Gupta VK, Schmidt AP, El Mofty S, Scholnick SB. Localization of a tumor suppressor gene in the sub-telomeric region of chromosome 8p. *Oncogene* 1999; **18**(16):2651-5.
177. Szarvas T, Kovalsky I, Bedi K, Szendroi A, Majoros A, Riesz P, Füle T, Laszlo V, Kiss A, Romics I. Deletion analysis of tumor and urinary DNA to detect bladder cancer: urine supernatant versus urine sediment. *Oncol Rep* 2007; **18**(2):405-9.
178. Tabin CJ, Bradley SM, Bargmann CI, Weinberg RA, Papageorge AG, Scholnick EM et al. Mechanism of activation of a human oncogene. *Nature* 1982; **300**(5888):143-9.
179. Takle LA, Knowles MA. Deletion mapping implicates two tumor suppressor genes on chromosome 8p in the development of bladder cancer. *Oncogene* 1996; **12**(5):1083-7.
180. Takle La, Knowles MA. Deletion mapping implicates two tumor suppressor genes on chromosome 8p in the development of bladder cancer. *Oncogene* 1996; **12**(5): 1083-7.
181. Tan E, Schur PH, Carr IR, Kunkel HG. Desoxyribonuclein acid (DNA) and antibodies to DNA in the serum of patients with systemic lupus erythematosus. *J Clin Invest* 1966; **45**(11):1732-40.
182. Tsai YC, Nichols PW, Hiti AL, Williams Z, Skinner DG, Jones PA. Allelic losses of chromosomes 9, 11 and 17 in human bladder cancer. *Cancer Res* 1990; **50**(1):44-7.

183. Tzai TS, Chen SH, Ho CC, Tsai YS, Cheng HC, Dai YC, Lin JS, Yang WH, Chow NH. Clinical significance of allelotype profiling for urothelial carcinoma. *Urology* 2003; **62**(2):378-84.
184. Underwood M, Bartlett J, Reeves J, Gardiner DS, Scott R, Cooke T. C-erbB-2 gene amplification: a molecular marker in recurrent bladder tumors? *Cancer Res* 1995;**55**(11):2422-30.
185. Vaish M, Mandhami A, Mittal RD, Mittal B. Microsatellite instability as prognostic marker in bladder tumors: a clinical significance. *BMC Urol* 2005; **5**:12.
186. van Brussel JP, Mickisch GH. Prognostic factors in renal cell and bladder cancer. *BJU Int* 1999; **83**(8):902-8.
187. van Rhijn BW, van der Poel HG, van der Kwast TH. Urine markers for bladder cancer surveillance: a systemic review. *Eur Urol* 2005; **47**(6):736-48.
188. van Rhin G, van der Kwast TH, Vis AN, et al. FGFR3 and p53 characterize alternative genetic pathways in the pathogenesis of urothelial cell carcinoma. *Cancer Res* 2004; **64**:1911-1914.
189. Vom Dorp F, Kausch I, Jocham D. Diagnosis and treatment of non invasive urothelial carcinomas. *Dtsch Arztebl* 2007; **104**(12):797-802.
190. Wada Y, Igawa M, Shiina H, Shigeno K, Yokogi H, Urakami S et al. Coparison of chromosomal aberrations detected by fluorescence in situ hybridization with clinical parameters, DNA ploidy and Ki 67 expression in renal cell carcinoma. *Br J Cancer* 1998; **77**(11):2003-7.

191. Wang J. Computational biology of genome expression and regulation-a review of microarray bioinformatics. *J Environ Path Toxicol Oncol* 2008; **27**(3):157-79.
192. Wang MR, Perissel P, Taillandier J, Kemeny L, Fonck Y, Lautier A et al. Nonrandom changes of chromosome 10 in bladder cancer. Detection by FISH to interphase nuclei. *Cancer Genet Cytogenet* 1993; **71**(2):105-18.
193. Weinstein RS, Coon JS, Schwartz D, Miller AW, III, Pauli B, Pathology of superficial bladder cancer with emphasis on carcinoma in situ. *Urology* 1985, **26**(4 Suppl):2-10.
194. Wiener HG, Mian C, Haitel A, Pycha A, Schatzl G, Marberger M . Can urine bound diagnostic tests replace cystoscopy in the mangement of bladder cancer? *J Urol* 1998; **159**(6):1876-80.
195. Wilhelm M, Bugert P, Kenck C, Staehler G, Kovacs G. Terminal deletion of chromosome 3p sequences in nonpapillary renal cell carcinomas : a breakpoint cluster between loci D3S1285 and D3S1606. *Cancer Res* 1995; **55**(22):5383-5.
196. Williamson P, Elder Pa, Shaw ME, Devlin J, Knowles Ma. P16 (CDKN) is a major deletion target at 9p21 in bladder cancer. *Hum Mol Gent* 1995; **4**(9):1569-77.
197. Wilke CM, Guo SW, Hall BK, Boldog F, Gemmill RM, Chandraskharappa SC et al. Multicolor FISH mapping of YAC clones in 3p14 and idnetification of a YAC spanning both FRA3B and the t(3;8) associated with hereditary renal cell carcinoma. *Genomics* 1994; **22**(2):319-26.

198. Williamson MP, Elder PA, Shaw ME, Delvin J, Knowles Ma. p16 (CDKN2) is a major deletion target at 9p21 in bladder cancer. *Hum Mol Genet* 1995; **4**(9):1569-77.
199. Yates DR, Rehman I, Abbod MF, Meuth M, Cross SS, Linkens DA, Hamdy FC, Catto JW. Promoter hypermethylation identifies progression risk in bladder cancer. *Clin Cancer Res* 2007; **13**(7):2045-53.
200. Zaak D, Karl A, Stepp H, Tritschler S, Tilki D, Bugert M, Knuechel R, Stief C. [Fluorescence cystoscopy at bladder cancer: Present trials.] *Urologe A* 2007; **46**(11):1519-27.

8. Abkürzungsverzeichnis

AI	Allelische Imbalance
Bp	Basenpaare
BTA-Test	Blasentumorantigen-Test
CG	Cluster of differentiation
CGH	komparative Hybridisierung
CYFRA 21-1	Fragment des Cytokeratin 19
DNA	Desoxiribonukleinsäure
FDP	fibrin degradation products
FISH	Floureszenz in situ Hybridisierung
FGFR3	Fibroblastic growth factor receptor 3
DBCCR 1	Deleted in bladder cancer candidate region
G	Grading
GSTP 1	Gluthation-S-Transferase P 1 Gen
Hb-dipstick	Haemoglobin dipstick
LewisX	CD15 Antigen
LOH	Loss of heterozygosity
Mb	Megabasen
mRNA	Messenger Ribonucleinsäure
MSA	Mikrosatellitenanalyse
MSP	methylationsspezifische PCR
NMP 22	nuclear matrix protein 22
PCR	Polymerasekettenreaktion
PSA	prostataspezifisches Antigen
Rb	Retinoblastoma Gen
RNA	Ribonucleinsäure
Tis	Carcinoma in situ
TNM	Tumor, Node, Metastasis
TPS	tissue-polypeptide-specific antigen
TSG	Tumorsuppressorgen
UBC	urinary bladder cancer marker
UICC	Union International Contre Le Cancer

9. Anhang

Verzeichnis der akademischen Lehrer

Meine akademischen Lehrer in Marburg waren die Damen und Herren Professoren und Dozenten:

Arnold, Aumüller, Barth, Basler, Baum, Christiansen, Czubayko, Daut, Doss, Feuser, Giese, Gotzen, Griss, Happele, Hasilik, Hellinger, Hesse, Hofmann, Jungclas, Kern, Klenk, Knobloch von, Krieg, Lammel, Lennartz, Moll, Mueller, Müller, Niessing, Oertel, Reichardt, Remschmidt, Schäfer, Schmidt, Seitz, Steiniger, Weihe, Werner, Vohland.

in Kassel: Pausch

in Münsterlingen, Schweiz: Röthlin

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. Rolf von Knobloch für die Überlassung des Themas, die rege Betreuung und die stete Bereitschaft zum gedanklichen Austausch.

Herrn Prof. Dr. med. Rainer Hofmann danke ich für die Nutzung des Labors seiner Klinik und das große Interesse.

Ich danke auch der medizinisch technischen Assistentin Frau Heidrun Brandt für die Einarbeitung im Labor mit wertvollen praktischen Anleitungen.

Dank geht an die kooperativen niedergelassenen Urologen und die Patienten, welche uneigennützig die wissenschaftliche Arbeit unterstützt haben.

Zudem danke ich meiner Familie für das Verständnis und die Motivation.

Vorliegende Arbeit wurde in folgenden Publikationsorganen veröffentlicht:

von Knobloch R, Gäck C, Brandt H, Schrader AJ, Hofmann R. Molecular allelotyping fails to identify precise markers for progression in transitional cell bladder cancer. Der Urologe (2007) 46: Supplement 1, Abstract P exp 2.16, 59. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Urologie e.V., 26.-29.09.2007, Berlin.

von Knobloch R, Brandt H, Gäck C, Heidenreich A, Hofmann R. Molecular allelotyping identifies progression markers for transitional cell bladder cancer. J Urol (2003), 169: 192, 98th Annual Meeting of the American Urological Association, 26.04.-01.05.2003, Chicago, USA.

von Knobloch R, Gäck C, Brandt H, Heidenreich A, Hofmann R. Molekulare Progressionsmarker des Harnblasenkarzinoms. Urologe A (2002), 41 (Suppl.):19, 54. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Urologie e.V., 18.-21.09.2002 Wiesbaden.

von Knobloch R, Gäck C, Brandt H, Heidenreich A, Hofmann R. Stage independent molecular detection of DNA-alterations in serum and urine of bladder cancer patients. Eur Urol (2002), 1 (Suppl.) Abstract 71: 20, XVIIth Congress of the European Association of Urology (EAU), Birmingham (UK) 23.-26.02.2002.

Ort,

Datum,

Unterschrift