

Untersuchung des Kupfertransporters *ATP7B* auf Chromosomen- und
Genebene in Hinblick auf primäre Chemotherapieresistenz
bei Therapie mit platinhaltiger Chemotherapie.

von Sebastian Christoph Schmid

Technische Universität München
Institut für Allgemeine Pathologie und Pathologische Anatomie
Klinikum rechts der Isar

**Untersuchung des Kupfertransporters *ATP7B* auf Chromosomen- und Genebene in
Hinblick auf primäre Chemotherapieresistenz bei Therapie mit platinhaltiger
Chemotherapie.**

Sebastian Christoph Schmid

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin
der Technischen Universität München
zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors der Medizin
genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. E. J. Rummeny

Prüfer der Dissertation:

1. Priv.-Doz. Dr. G. Weirich

2. Univ.-Prof. Dr. Th. A. Meitinger

Die Dissertation wurde am 05.01.2012 bei der Technischen Universität München eingereicht und
durch die Fakultät für Medizin am 23.05.2012 angenommen.

Widmung

Diese Arbeit ist meiner Familie und meiner Freundin gewidmet:

Eva-Maria Schmid

Hans-Albrecht Schmid

Katharina Schmid

Simone Gröber

Inhalt

WIDMUNG	2
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	5
DAS UROTHELKRZINOM.....	8
EINLEITUNG	8
TNM-KLASSIFIKATION UND STADIUM	9
<i>T- Primärtumor</i>	10
<i>N - regionäre Lymphknoten</i>	10
<i>M - Fernmetastasen</i>	10
<i>Einteilung nach Stadien (Stage)</i>	11
KLINIK	11
<i>Leitsymptome</i>	11
<i>Diagnostik</i>	11
<i>Operative Behandlung</i>	12
<i>Prognose</i>	13
EPIDEMIOLOGIE DES UROTHELKRZINOMS	14
WIRTSCHAFTLICHE ASPEKTE	16
VERÄNDERUNGEN DER ZELLBIOLOGIE BEIM UROTHELKRZINOM.....	17
<i>Strukturelle Aberrationen</i>	17
<i>Sequenzveränderungen der DNA</i>	20
ÄTIOLOGIE	25
FAKTOREN DER KREBSENTSTEHUNG:	25
<i>Chemische Noxen</i>	26
<i>Strahlentherapie</i>	27
<i>Infektionen</i>	27
CHEMOTHERAPIE	28
GESCHICHTE DES CISPLATINS	28
CISPLATIN UND CARBOPLATIN.....	29
<i>Wirkungsweise:</i>	30
<i>Resistenzentwicklung</i>	30
MECHANISMEN DER CISPLATINRESISTENZ	33
DIE AUFNAHME IN DIE ZELLE:	35
CISPLATIN IN DER ZELLE:.....	35
EFFLUX AUS DER ZELLE:	36
ATP7B.....	37
EINLEITUNG	37
FUNKTION IM KUPFERSTOFFWECHSEL	37
STRUKTUR VON ATP7B.....	39
MUTATIONEN IM ATP7B-GEN: MORBUS WILSON.....	40
<i>Klinik</i>	40
<i>Diagnose</i>	40
<i>Geographische Verteilung der Mutationen</i>	41
<i>Ätiologie & Epidemiologie</i>	41
ZIEL DER VORLIEGENDEN UNTERSUCHUNG/STUDIENHYPOTHESE.....	43
ZUSAMMENFASSUNG DER EINLEITUNG.....	43
MATERIAL UND METHODEN	45
MATERIAL:	45
BEARBEITUNG DES MATERIALS:	46
DNA-EXTRAKTION AUS PARAFFINMATERIAL:.....	46
POLYMERASEKETTENREAKTION (PCR).....	47
<i>Prinzip der PCR</i>	47
<i>Amplifikation der DNA mittels PCR:</i>	48

<i>Amplifikation:</i>	48
<i>Primersequenzen:</i>	49
<i>Darstellung des Amplifikates auf Agarose-Gel:</i>	50
MIKROSATELLITENANALYSE.....	51
<i>Prinzip der Mikrosatellitenanalyse</i>	51
<i>Methode</i>	51
DENATURIERENDE HOCHLEISTUNGSFLÜSSIGKEITSCROMATOGRAPHIE (DHPLC)	52
<i>Prinzip der DHPLC</i>	52
<i>Auswertung der DHPLC</i>	53
SEQUENZIERUNG.....	54
<i>Prinzip der zyklischen DNA-Sequenzierung</i>	54
<i>Methode</i>	56
STATISTISCHE PLANUNG UND METHODEN	58
ERGEBNISSE	59
PACIENTENGUT	59
DHPLC.....	60
MIKROSATELLITENANALYSE.....	62
<i>Auswertung</i>	62
<i>Zusammenschau von Mikrosatellitenanalyse und DHPLC bezüglich LOH-Situation</i>	64
SEQUENZIERUNG.....	68
<i>Mutationen und Sequenzvariationen</i>	68
<i>Verteilung auf die Fälle</i>	71
<i>Vergleich von Mutationen in Tumorgewebe, morphologisch normalem Urothel und morphologisch normaler glatter Muskulatur der Blasenwand</i>	73
<i>Vergleich mit bekannten genetischen Veränderungen</i>	76
STATISTISCHE AUSWERTUNG.....	77
DISKUSSION	79
ATP7B UND UROTHELIALE KARZINOME.....	79
MAMMALIAN COPPER TRANSPORTER – CTR1	89
GLUTATHION	92
SLC22A - ORGANIC CATION TRANSPORTERS.....	96
ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK	97
ABBILDUNGSVERZEICHNIS	100
LITERATURVERZEICHNIS	101
DANKSAGUNG.....	113

Abkürzungsverzeichnis

ABC Transporter	ATP Binding Cassette Transporter
AK	Antikörper
Aqua dest.	destilliertes Wasser
ATP	Adenosintriphosphat
<i>ATP7B</i>	Wilson Protein, Mitglied der P-Typ Kationen Transporter-ATPase-Familie
BCG	Bacillus Calmette-Guerin
BSO	Buthionin-Sulfoximin
cDNA	complementary DNA: DNA-Sequenz, durch das Enzym Reverse Transkriptase auf der Grundlage von RNA gewonnen
Cis	Carcinoma in situ: intraepitheliales Karzinom, infiltriert nicht die Submukosa
CML	Chronisch myeloische Leukämie
CNV	Copy Number Variations/Veränderung der Kopienzahl
CT	Computertomographie
<i>CTR1</i>	Copper Transporter 1
DACH	1,2-diaminocyclohexangruppe
ddNTP	Didesoxynucleotide
DHPLC	denaturing high-performance liquid chromatography
DNS	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynucleotid
EGFR	Endothelial Growth Factor Receptor
ELISA	Enzyme Linked Immunoabsorbent Assay

FISH	Fluoreszenz in Situ Hybridisierung
GC	Chemotherapie mit Gemcitabin und Cisplatin
GCL	Glutamatcysteinligase
GIST	Gastrointestinaler Stromatumor
GS	Glutathionsynthese
GSH	Glutathion
GSSG	Glutathiondisulfid
GST	Glutathion-S-Transferase
GS-X	Transporter von Glutathion(komplexen)
i.v.	intravenös
<i>LOH</i>	Loss of Heterozygosity/ Verlust der Heterozygotie
M	Mutation
MBS	Metall Binding Sites/Metallbindende Domäne
mRNA	messenger/Boten RNA
<i>MRP</i>	Multidrug Resistance Protein
MRT	Magnetresonanztomographie
MSA	Mikrosatellitenanalyse
MVAC	Chemotherapie mit Methotrexat, Vinblastin, Doxorubicin und Cisplatin
NADPH	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat
<i>OCT</i>	Organic Cation Transporter
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerase Chain Reaction/Polymerase Kettenreaktion
PET	Positronenemissionstomographie
RB1	Retinoblastom Genlocus
RNS	Ribonukleinsäure

ROS	Reaktive Sauerstoffspezies/freie Radikale
siRNA	small interfering RNA
SLC	Mitglied der Solute Carrier Familie
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
TMA	Tissue Micro Array
TURB	Transurethrale Resektion der Blase
UICC	Union internationale contre le cancer/Internationale Vereinigung gegen Krebs
WND	Wilson Disease/Morbus Wilson

Das Urothelkarzinom

Einleitung

Das Urothel ist die spezialisierte Epithelschicht der ableitenden Harnwege, die das Nierenbeckenkelchsystem, die Harnleiter, die Harnblase und die Urethra auskleidet. Es ist aus 7-8 Epithellagen aufgebaut. Im gedehnten Zustand verschmälert sich das Urothel auf eine Breite von 3-4 Lagen. Die Zellmembran der Urothelien verhindert eine Rückresorption des potentiell toxischen Urins. Die Zellen sind durch stark verzahnte Interzellularverbindungen gekoppelt, um eine erhebliche Dehnung zu ermöglichen.

Die Wand der harnableitenden Organe besteht aus mehreren Schichten: Das Urothel steht als Schleimhaut in Kontakt mit dem von den Nieren produzierten Urin. Darunter folgt das suburotheliale Bindegewebe, das zwischen der glatten Muskulatur der Blase und der Schleimhaut liegt. Die Faserbündel der Muskulatur sind in verschiedenen Zugrichtungen angeordnet; zuäußerst liegt Fettgewebe.

Die Malignome der ableitenden Harnwege entstehen überwiegend im Urothel (Synonyme: Übergangsepithel, Transitionalepithel) und werden dementsprechend als Urothelkarzinome bezeichnet. Seltener sind reine Plattenepithelkarzinome und reine neuroendokrine Karzinome sowie Mischformen (< 10%). Sarkome und Lymphome spielen eine untergeordnete Rolle (Bochner et al. 2008).

Am häufigsten findet man Urothelkarzinome – entsprechend des Anteils an der gesamten, mit Urothel ausgekleideten Fläche – in der Blase (93 %), gefolgt von Nierenbecken (5%) und Harnleitern (2%) (Williams et al. 1973; Williams et al. 1973).

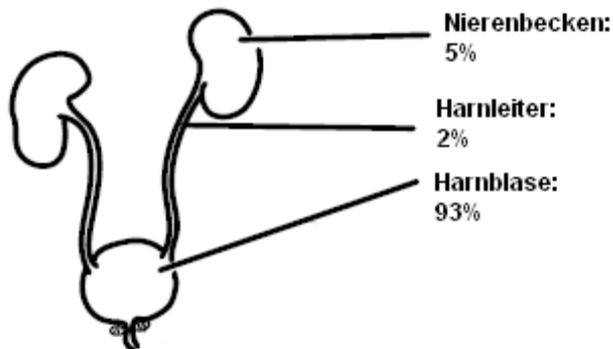


Abbildung 1: Häufigkeit von Urothelkarzinomen in Bezug zur Lage im Urogenitaltrakt

TNM-Klassifikation und Stadium

Die Urothelkarzinome werden entsprechend der UICC (Sobin et al. 2010) bzw. der WHO-Klassifikation abhängig von der Lokalisation eingeteilt. Die Stadieneinteilung ist einerseits in Hinblick auf die Therapiewahl bedeutsam, andererseits in Hinblick auf die Prognose. Da das Urothelkarzinom der Harnblase Schwerpunkt dieser Arbeit ist, wird nur die TNM für die Harnblase im Folgenden erläutert. So wird üblicherweise im Stadium 0 und I lokal und organerhaltend therapiert, ab Stadium II ist die radikale Zystektomie der Standard, während in fortgeschrittenen Stadien systemisch chemotherapeutisch behandelt wird, insbesondere im Stadium IV.

T- Primärtumor

<i>T_x</i>		Primärtumor kann nicht beurteilt werden
<i>T₀</i>		Kein Anhalt für Primärtumor
<i>T_a</i>		Nichtinvasives papilläres Karzinom
<i>T_{is}</i>		Carcinoma in situ
<i>T₁</i>		Infiltration des subepithelialen Bindegewebes
<i>T₂</i>		Infiltration der Muscularis 2a Infiltration der oberflächlichen Muskulatur 2b Infiltration der tiefen Muskulatur
<i>T₃</i>	Blase Harnleiter Nierenbecken	Infiltration des umgebenden Fettgewebes Infiltration des perivesikalen Fettgewebes 3a mikroskopisch 3b makroskopisch Infiltration des periureteralen Fettgewebes Infiltration des Nierenparenchyms oder der peripelvinen Fettgewebes
<i>T₄</i>	Blase Harnleiter/Nierenbecken	Tumor infiltriert umgebende Organe 4a Prostata/Uterus/Vagina 4b Beckenwand/Bauchwand Nachbarorgane (Wirbelkörper, Gefäße)/perirenales Fettgewebe

Tabelle 1: TNM-Klassifikation: T-Stadien

N - regionäre Lymphknoten

<i>N_X</i>	Regionäre Lymphknoten können nicht beurteilt werden
<i>N₀</i>	Kein Anhalt für regionäre Lymphknotenmetastasen
<i>N₁</i>	Metastase in solitärem Lymphknoten, maximal 2 cm in der größten Ausdehnung
<i>N₂</i>	Metastase in solitärem oder multiplen Lymphknoten, 2cm < größte Ausdehnung ≤ 5cm
<i>N₃</i>	Metastase(n) größer als 5cm in der größten Ausdehnung

Tabelle 2: TNM-Klassifikation: N-Stadien

M - Fernmetastasen

<i>M₀</i>	Kein Anhalt für Fernmetastasen
<i>M₁</i>	Fernmetastase z.B. in Lunge, Leber, Knochen

Tabelle 3: TNM-Klassifikation: M-Stadien

Einteilung nach Stadien (Stage)

<i>Stadium 0a</i>	Ta	N0	M0
<i>Stadium 0is</i>	Tis	N0	M0
<i>Stadium I</i>	T1	N0	M0
<i>Stadium II</i>	T2a,b	N0	M0
<i>Stadium III</i>	T3a,b; T4a	N0	M0
<i>Stadium IV</i>	T4b	N0	M0
	Jedes T	N1, 2, 3	M0
	Jedes T	Jedes N	M1

Tabelle 4: Stadieneinteilung

Klinik

Leitsymptome

Das häufigste Symptom bei Vorstellung ist die schmerzlose Makrohämaturie während der gesamten Miktion. Mit zunehmendem Alter und männlichem Geschlecht steigt bei Vorstellung mit Hämaturie die Wahrscheinlichkeit für ein Urothelkarzinom (Rose et al. 2008). Allgemeine Tumorsymptome wie Müdigkeit, Gewichtsverlust, Appetitmangel und Kachexie treten vor allem in späteren Stadien auf.

Diagnostik

In der Diagnostik des Urothelkarzinoms spielen vor allem die (fluoreszenzgestützte) Zystoskopie, die Sonographie sowie die computertomographische Untersuchung eine große Rolle. Zur Beurteilung der Harnleiter wird die Computertomographie, das Ausscheidungsurogramm sowie die endoskopische Spiegelung verwendet (Donat et al. 2008).

Operative Behandlung

Beim Blasenkrebs gibt es im Wesentlichen zwei Möglichkeiten der operativen Behandlung: Eine Möglichkeit ist die blasenerhaltende, endoskopische Tumorabtragung mit elektrischer Schlinge, die sogenannte transurethrale Resektion (TUR-B).

Diese Methode kommt vor allem bei Tumoren in den nicht-muskelinvasiven Stadien 0 und 1 zur Anwendung, zusätzlich wird sie in jedem Stadium zur histologischen Diagnosesicherung verwendet. Die TURB kann mit Fluoreszenzverfahren wie der Instillation von Hexaminolävulinsäure (HEXVIX®) gekoppelt werden, um die Erkennungsrate von veränderten Blasenarealen zu erhöhen.

Nach einer TURB kann eine *Bacillus Calmette-Guerin*-Instillation (BCG) bzw. intravesikale Chemotherapie folgen, um die Rezidivgefahr zu verringern.

Die andere Möglichkeit ist die Zystektomie mit anschließender künstlicher Harnableitung wie zum Beispiel die Ileum-Neoblase. Sie wird bevorzugt bei Tumoren in den Stadien 2-4 verwendet. Die perioperative Mortalitätsrate der radikalen Zystektomie liegt in den letzten 15 Jahren bei ungefähr 2% (0,6% - 4,5%) (Sternberg et al. 2007).

Weitere Verfahren, wie die partielle Zystektomie, sind umstritten und werden nur bei speziell ausgewählten Patienten eingesetzt. Ureter- und Nierenbeckenkarzinome werden überwiegend durch Nephroureterektomie behandelt.

Prognose

Der wichtigste Prognosefaktor beim Blasenkarzinom ist das pathologische Staging.

In einer retrospektiven Analyse von 15 Studien wurde das pathologische Staging mit der Fünf-Jahres-Überlebensrate nach Cystectomy bei muskelinvasivem Karzinom korreliert (Sternberg et al. 2007):

Stage (pathologisch)	5-Jahres-Überlebensrate
pT2	66% (40%-79%)
pT3	35% (15%-57%)
pT4	27% (0%-36%)

Das Ausmaß der Lymphknotenbeteiligung ist ein prognostischer relevanter Faktor.

Weitere Studien lassen vermuten, dass die Invasion der Lymphgefäße und das Ausmaß der Lymphknotenresektion eine Rolle in Bezug auf die Prognose spielen. (Dalbagni et al. 2008)

Epidemiologie des Urothelkarzinoms

Maligne Neubildungen der Harnblase (inklusive Neubildungen unsicheren Verhaltens) sind die vierthäufigste maligne Erkrankung bei Männern und die achthäufigste bei den Frauen bezogen auf die Inzidenz.

Prozentualer Anteil ausgewählter Tumorlokalisationen an allen Krebsneuerkrankungen ohne nicht-melanotischen Hautkrebs in Deutschland 2004
Quelle: Schätzung der Dachdokumentation Krebs im Robert Koch-Institut

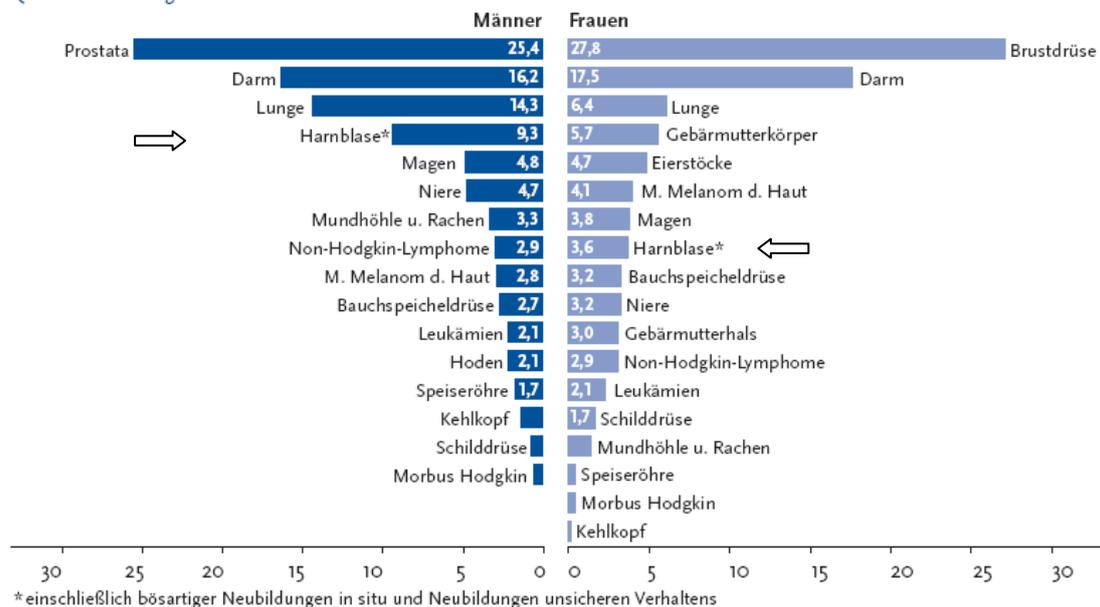


Abbildung 2: Häufigkeit der Tumorlokalisationen

(Quelle: GEKID 2008)

Jedes Jahr erkranken nach aktuellen Schätzungen etwa 28.750 Menschen in Deutschland an einer Tumorerkrankung der Harnblase. Männer sind dabei knapp dreimal so häufig betroffen wie Frauen. Pro Jahr sterben 3.565 Männer und 2.629 Frauen an Blasenkrebs. Dieser ist damit die achthäufigste Tumortodesursache bei Männern und die neunthäufigste bei Frauen.

Prozentualer Anteil ausgewählter Tumorlokalisationen an allen Krebssterbefällen in Deutschland 2004
 Quelle: Amtliche Todesursachenstatistik, Statistisches Bundesamt, Wiesbaden

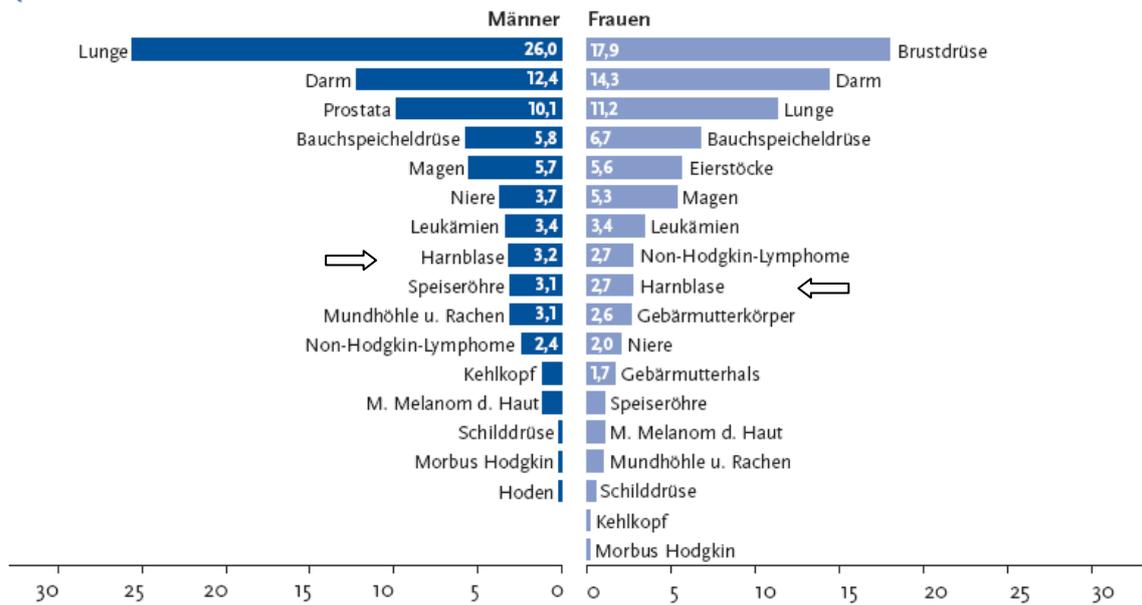


Abbildung 3: Mortalitätsraten der verschiedenen Tumorlokalisationen

(Quelle: GEKID 2008)

Das mittlere Erkrankungsalter liegt für Männer bei 71, für Frauen bei 74 Jahren, damit zählen die Harnblasentumoren zu den Erkrankungen mit relativ hohem mittlerem Erkrankungsalter.

Im internationalen Vergleich sind Harnblasenkarzinome in Deutschland relativ häufig.

Hinzu kommen noch etwa 1700 Neuerkrankungen des Nierenbeckens und der ableitenden Harnwege, die verglichen mit den Blasenkarzinomen eine untergeordnete Rolle bezüglich Inzidenz und Mortalität spielen (GEKID 2008).

Weltweit unterscheiden sich die Erkrankungsraten deutlich, ungefähr um den Faktor 10.

Westeuropa und USA haben die höchsten Inzidenzen, Osteuropa und Asien die niedrigsten.

Interessant sind die ausgeprägten Geschlechtsunterschiede in der Inzidenz. In den USA ist das Geschlechterverhältnis Männer zu Frauen ca. 3:1, in Italien 7:1 und unter nordamerikanischen Indianern 10:1. Möglicherweise liegt die Ursache für diese Unterschiede im

geschlechtsspezifischen Konsum von Tabak und unterschiedlicher Exposition zu schädlichen

Arbeitsstoffen und nicht in hormonellen oder genetischen Gegebenheiten (Bochner et al. 2008).

In bestimmten Regionen ist das Urothelkarzinom mit endemischen Erkrankungen oder Schadstoffexpositionen, wie zum Beispiel arsenbelasteten Trinkwasser in Taiwan, assoziiert (Chen et al. 1986; Chiang et al. 1993; Lin et al. 1998; Tsai et al. 1998; Chiou et al. 2001). Ein anderes Beispiel hierfür ist die endemische Balkan-Nephropathie, die mit einer hohen Urothelkarzinomrate assoziiert ist (Sattler et al. 1977; Cukuranovic et al. 1991; Petronic et al. 1991).

Wirtschaftliche Aspekte

Blasenkrebs ist im Vergleich mit allen anderen Krebsarten die Krebserkrankung mit den höchsten Behandlungskosten pro Patient (Botteman et al. 2003; Sievert et al. 2009). Landesabhängig kostet ein Blasenkarzinomfall von der Diagnose bis zum Tod zwischen 89.287 und 202.203 US-Dollar, was in etwa Behandlungskosten zwischen 70.000 und 160.000 Euro entspricht. Wesentlich häufigere Krebsarten wie Prostata-, Lungen-, Brust- und Darmkrebs kosten im Vergleich weniger, was vor allem an der kostenintensiven Behandlung und Nachsorge beim Blasenkrebs liegt. So kostet in Deutschland eine Zystoskopie 46 Euro, eine TURB 2.231 Euro und eine Zystektomie 15.419 Euro. Daher ist es von großem Interesse für die Krankenkassen und Versicherten die Kosten durch verbesserte Diagnostik und Therapie zu verringern. Ein gezielterer Einsatz der systemischen Chemotherapie würde zu diesem Ziel beitragen.

Veränderungen der Zellbiologie beim Urothelkarzinom

Strukturelle Aberrationen

Im menschlichen Körper sind die meisten autosomalen Zellen diploid und enthalten damit einen zweifachen Chromosomensatz. Einige Zellen wie zum Beispiel Leberzellen (Hepatozyten) können polyploid werden, enthalten dann also eine erhöhte, paarige Zahl an Chromosomensätzen. Keimzellen hingegen sind haploid, enthalten nur einen einfachen Chromosomensatz.

Maligne Neoplasien weisen häufig einen nicht diploiden Chromosomensatz auf (Aneuploidie) als Zeichen einer chromosomaler Instabilität. Dies bedeutet, dass Chromosomen oder Chromosomenabschnitten verlorengehen in der Folge einer gestörten Zellteilung.

Kommt es zum Verlust eines Chromosoms oder Chromosomenabschnitts – einer sogenannten „Loss of Heterozygosity“-Situation (*LOH*) – liegt nur noch ein Satz des genetischen Materials des betreffenden Abschnitts vor. Diese Veränderungen können sich auf die Menge der Genprodukte auswirken.

Mittels der sogenannten Mikrosatellitenanalyse können *LOH*-Situationen untersucht werden.

Der *LOH* ist von besonderer Bedeutung für die indirekt tumorigene Wirkung des Verlusts von Tumorsuppressorgenen (krebsverhindernde Gene). Der Verlust eines

Tumorsuppressorgenes auf chromosomaler Ebene in Kombination mit einer Punktmutation auf dem zweiten Allel kann zur Entstehung und Progression von Krebserkrankungen führen.

Beim Blasenkarzinom wurden sowohl Frühformen wie das *Carcinoma in situ* (*Cis*) als auch fortgeschrittenere Stadien des Blasenkarzinoms auf chromosomale Aberrationen untersucht.

In einer Arbeit von Zieger et al. (Zieger et al. 2009) wurden *LOH*-Situationen in zwei Drittel der untersuchten Fälle mit *Cis* gefunden. Charakteristische Veränderungen waren *LOH* der

Chromosomen 13q13-14 und 5q. Weiterhin zeigten sich Amplifikationen der Chromosomen 5p, 6p22.3, 10p15.1.

Andere Untersuchungen hoben hervor, dass die chromosomale Instabilität mit zunehmendem Tumorstadium zunimmt. Generell scheint bei zunehmender Dynamik der Krebserkrankung bzw. fortgeschrittenen Tumorstadien auch die Anzahl der chromosomalen Veränderungen zuzunehmen. So zeigten sich im Ta-Stadium nur auf 3 Chromosomen häufige Veränderungen, nämlich auf Chromosom 9, 18, und 20. Im T1-Stadium lagen schon auf 6 Chromosomen häufige Veränderungen vor, nämlich auf den Chromosomen 2, 8, 9, 10, 11, 20. In den Stadien T2-4 zeigten sich häufige Veränderungen auf 16 Chromosomen, inklusive Chromosom 13. Veränderungen auf Chromosom 13 traten dabei in mehr als 75% der untersuchten hochgradigen Karzinome auf (Koed et al. 2005).

Dies zeigt, dass in höheren Stadien ein Großteil des genetischen Materials numerischen Aberrationen unterliegt.

In einer weiteren Untersuchung wurden als häufigste betroffene Chromosomen Anteile der Chromosomen 4, 8, 9, 11, 13, 14, 17 identifiziert. Dabei war Chromosom 13 in mehr als der Hälfte der Fälle verändert (Rosin et al. 1995).

In der Zusammenschau zeigt sich, dass die Chromosomen 8, 9, 11 und 13 am häufigsten von Veränderungen betroffen sind. Auf Chromosom 8 sind dabei Gene wie *PINX1* lokalisiert, das als Inhibitor der Telomerase eine wichtige Rolle in Apoptose bzw. Überleben der Zelle spielt und als Tumorsuppressorgen angesehen wird (Zhou et al. 2001). Ein anderes Tumorsuppressorgen auf Chromosom 8 ist *DLC-1*, das hemmend auf *Rho-GTPasen* wirkt (Durkin et al. 2007). Auf Chromosom 9 finden sich Gene wie *RAD23B*, das bei der Reparatur geschädigter DNA eine Rolle spielt und bei bestimmten Formen von *Xeroderma Pigmentosum*, einer Erkrankung mit stark erhöhtem Tumorrisiko, eine Rolle spielt (Masutani et al. 1994). Veränderungen zeigen sich auch auf dem langen Arm von Chromosom 13. Dort liegt zum beispielsweise *TSC22*, das der Gruppe der „*early response genes*“ zuzurechnen ist

und eine Rolle in der frühen Modulation von Zellwachstum und Untergang spielt (Kester et al. 1999).

Ein weiteres Gen, das eine wichtige Rolle bei der Unterdrückung von Tumorentstehung spielt ist das Retinoblastom-Gen (*RBI*). Das Retinoblastom Gen liegt auf Chromosom 13q14.1-2. Das Retinoblastom-Gen ist ein bedeutendes Tumorsuppressorgen, das regulierend auf die Zellteilung wirkt. Dadurch wurde die chromosomale Situation des Chromosomenabschnittes 13q14 oft untersucht. In Untersuchungen des Locus 13q14 zeigten 56% der invasiven Blasen Tumoren *LOH*-Situationen am *RBI*-Locus. Lediglich zwei Prozent der nicht-invasiven Tumoren zeigten diese Veränderungen. Umgekehrt bedeutet dies, dass Tumoren mit *LOH* an 13q14 zu mehr als 90% invasive Tumoren waren (Cairns et al. 1991; Sengelov et al. 2000). Diese Erkenntnisse passen zu den oben beschriebenen Ergebnissen, die eine Zunahme der Veränderungen auf Chromosom 13q von den nicht-invasiven zu invasiven Blasen Tumoren beobachten.

Beim Blasenkarzinom wurden chromosomale Veränderungen hauptsächlich in Hinblick auf *LOH*-Situationen bzw. Allelverluste untersucht. In einer Arbeit von Hurst wurden Veränderungen der Kopienzahl (CNV) bei 22 Blasen Tumorzelllinien untersucht. Dabei zeigte sich, dass auf Chromosom 13q Verluste ca. dreimal häufiger auftraten als Zugewinne im Sinne von Amplifikationen oder Duplikationen (Hurst et al. 2004). Zusammenfassend lässt sich sagen, dass *LOH*-Situationen in Blasen Tumoren häufig sind und mit fortschreitender Invasivität des Karzinoms häufiger werden sowie an einer größeren Anzahl von Chromosomen auftreten. Gerade bei invasiven Blasen Tumoren zeigen sich häufig Veränderungen von 13q. Dort finden sich prominente Tumorsuppressorgene wie das Retinoblastom-Gen *RB* oder das *BRCA2*-Gen (Breast Cancer 2 susceptibility gene) (Wooster et al. 1994). In unmittelbarer Nachbarschaft zu diesen Genen liegt *ATP7B*.

Sequenzveränderungen der DNA

Chromosomale Veränderungen betreffen ganze Abschnitte des Erbguts; Änderungen der DNA-Sequenz (DNA) betreffen die einzelnen Basenpaare, von denen die Bauanleitung für die Proteine der Zelle abgelesen wird. Mutationen können zum einen spontan entstehen wie zum Beispiel durch die spontane Umwandlung (Desaminierung) von *Cytosin* zu *Uracil*. Zum anderen entstehen Mutationen durch äußere Einflüsse wie Strahlung und chemische Noxen wie beispielsweise Röntgenstrahlen, Tabakrauch und Chemotherapie (Brennan et al. 2000; Siemiatycki et al. 2004).

Dabei kann es zur Auswechslung einer Base kommen (Punktmutation) bzw. zur Auswechslung weniger Basenpaare, sowie zum Einfügen (Insertion) oder Entfernen einer Base (Deletion). Die so entstandenen Mutationen können entweder neutral sein oder zum Aktivitätsgewinn bzw. Aktivitätsverlust des Genprodukts führen („*gain-of-function/loss-of-function*“).

Auch beim Urothelkarzinom wurden verschiedene Versuche unternommen, um die molekularen Veränderungen zu charakterisieren.

Dabei gibt es vor allem zwei Wege, die beschritten werden können:

Ein globaler, sich auf das gesamte Genom/Proteom beziehender Ansatz sowie spezifische Ansätze, die bestimmte Signalwege oder Genfamilien untersuchen. Dabei dienen die globalen Verfahren eher zum Screening, während in den spezifischeren Ansätzen enger definierte Fragestellungen untersucht werden.

In globalen Ansätzen werden Microarrays benutzt, in denen markiertes Untersuchungsmaterial mit DNA-Oligonukleotiden oder kurzen DNA-Sequenzen hybridisiert wird. Durch die geringe Größe der Oligonukleotid-„Spots“ können eine sehr große Anzahl

derselben untersucht werden. In den globalen Ansätzen wurde eine sehr große Anzahl von möglicherweise beteiligten Genen identifiziert. Die Bedeutung dieser Veränderungen ist nur zum Teil geklärt.

Bei spezifischen Ansätzen wird ein Ausschnitt gezielt untersucht. Die Auswahl findet dabei auf der Basis von in-Vitro-Experimenten, explorativen Studien oder globalen Ansätzen statt. Typische Methoden sind die Analyse von Mutation und Expression z.B. mit PCR und Sequenzierung, Western Blot und Immunhistochemie.

Der spezifische Ansatz basiert üblicherweise auf einer Hypothese, die untersucht wird. Daher ist die Untersuchung durch die eingegrenzte Fragestellung gezielt. In den spezifischen Studien konnte gezeigt werden, dass molekulare Veränderungen Anteil an der Entstehung des Blasenkrebses haben. Dabei wurden Hinweise auf zentrale Wege in der Tumorgenese gefunden. Dennoch wurden bisher keine Marker gefunden, die das Staging und Grading bezüglich prognostischer Aussage übertreffen würden. (Mitra et al. 2009).

Wichtige genetische Veränderungen findet man beim Urothelkarzinom zum Beispiel in der Regulation des Zellzyklus (siehe Abbildung 4). Schlüsselspieler dabei sind P53 und das Retinoblastom-Protein (Rb).

P53, das von dem *TP53*-Gen auf Chromosom 17p13.1 kodiert wird, ist ein Protein, das nicht nur im Zellzyklus zentrale Aufgaben in der Zelle übernimmt. Zusätzlich ist P53 an der Regulation von DNA-Reparatur, Apoptose sowie Angiogenese beteiligt.

Mutationen des *TP53*-Gens sind beim invasiven Blasenkrebs häufig anzutreffen. Dabei wird oft durch Mutationen die Sekundärstruktur des Proteins verändert. Dies führt zu einer verlängerten Halbwertszeit und vermehrter Akkumulation im Zellkern.

Daher korreliert eine erhöhte Nachweisbarkeit in z.B. der Immunhistochemie mit Mutationen

des Gens und Verschlechterung der Prognose (Sarkis et al. 1993; Esrig et al. 1994; George et al. 2007).

P53 aktiviert die Transkription des *CDKN1A*-Gens auf Chromosom 6p21.2, das für das p21/WAF1 Protein kodiert. Der Verlust der p21 Expression ist ein unabhängiger und signifikanter Prädiktor für das Fortschreiten der Erkrankung, wohingegen erhaltene p21-Expression die Effekte von P53 Veränderungen abschwächen kann (Stein et al. 1998; Mitra et al. 2007).

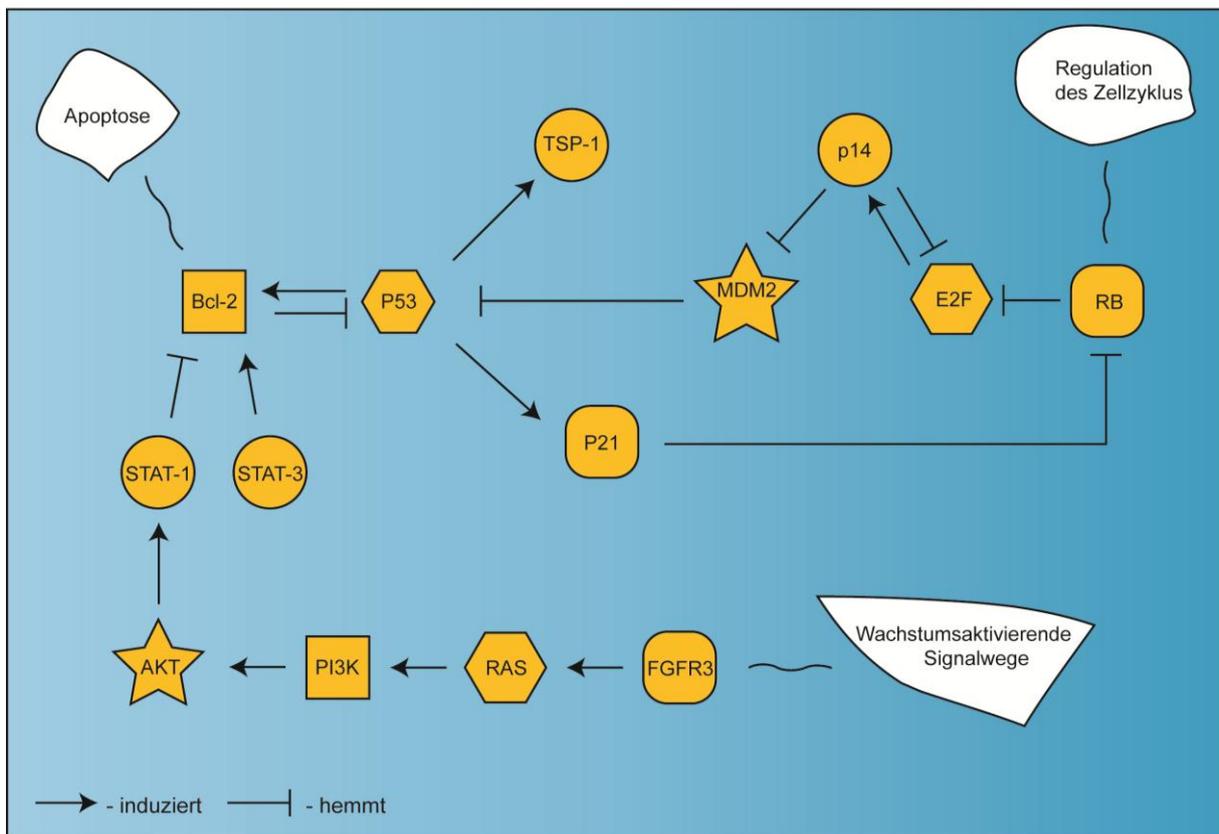


Abbildung 4: Kandidatengene im Zusammenhang mit dem urothelialen Karzinom

(Quellen: siehe Text).

Das MDM2 hemmt über eine Feedbackschleife die Aktivität des P53. MDM2 wird durch P53 aktiviert und vermittelt über die Ubiquitinierung den Abbau im Proteasoms. Die

Amplifikation von *MDM2* wurde in Blasenkrebs beobachtet, und nimmt mit höheren Stadien zu (Simon et al. 2002).

Ein Single-Nucleotid-Polymorphismus, SNP309, ist bei *MDM2* bekannt. Dieser ist mit schlechter Prognose und *P53*-Mutationen assoziiert (Sanchez-Carbayo et al. 2007).

MDM2 wird von p14 inhibiert, das wiederum von E2F induziert wird. E2F wird von RB sequestriert und inaktiviert. Damit stellt p14 das Bindeglied zwischen P53 und Retinoblastom-Signalweg dar. Das Retinoblastom-Gen spielt eine wichtige Rolle in der Regulierung des Zellzyklus. Dephosphoryliertes, aktiviertes RB bindet E2F, das als Transkriptionsfaktor wirkt. Bei Phosphorylierung von RB durch Cyclin-abhängige Kinasen (CDK) wird E2F wieder freigegeben, welches Gene zur DNA-Synthese aktiviert.

Inaktivierende RB Mutationen wurde sowohl in invasiven als auch in nicht-invasiven Blasenkarzinomen beobachtet (Miyamoto et al. 1995). Weiterhin kann es auch ohne Mutation zur konstitutiven Hyperphosphorylierung von RB kommen, zum Beispiel durch Verlust von CDK1, p16 oder Cyclin D1-Überexpression (Chatterjee et al. 2004).

Interessanterweise ist bei behandelten Retinoblastompatienten die Rate an Blasenkrebs im Vergleich zur Normalbevölkerung erhöht, was auch klinisch für eine Beteiligung des Retinoblastomgens an der Tumorigenese des Blasenkrebses spricht (Gibas et al. 1997).

Weitere Veränderungen findet man in Zusammenhang mit Apoptose. Dabei ist vor allem die BCL-2 Proteinfamilie erwähnenswert. Sie spielt eine Rolle im intrinsischen Weg der Apoptose. Der intrinsische Weg kann durch Tumorsuppressorgene wie *TP53* oder auch durch zelltoxische Substanzen wie Chemotherapeutika ausgelöst werden. P53 stimuliert dabei Mitglieder der BCL-2 Familie wie BAX (BCL-2-associated X Protein) oder BAD (BCL-2-associated death promoter), die zur Freisetzung von proapoptotischen Substanzen wie *Cytochrom C* führen. In einer Untersuchung wurde eine Assoziation zwischen einer erhöhten Expression von BCL-2 und verkürztem tumorfreiem Überleben bei T1G3-Blasenkarzinomen

festgestellt. Zusätzlich wurde ein Verkürzung des freien Überlebens von im Mittel 82 Monaten auf 30 Monate bei erhöhter P53-Immunoreaktivität beobachtet (Wolf et al. 2001). Auf Grundlage dieser Arbeiten wurde von Maluf et al. ein Prognosemodell vorgestellt, das die Expression von *P53*, *MDM2* und *BCL-2* zur Prognosevorhersage benutzt. Dabei korreliert die erhöhte Expression aller drei Marker mit der schlechtesten Prognose, während die normale Expression aller drei Marker mit der besten Prognose assoziiert ist (Maluf et al. 2006).

Im Zusammenhang mit wachstumsfördernden Signalwegen sind die *MAPK (Mitogen Activated Protein Kinase)*-Kaskade und der *JAK (Janus Kinase)-STAT(Signal Transducer and Activator of Transcription)*-Signalweg bedeutsam. Konstitutive Aktivierung dieser Signalwege wird häufig bei nicht-invasiven Blasenkarzinomen beobachtet. Diese Aktivierung wird oft durch aktivierende Mutationen im *FGFR3*-Rezeptor verursacht. Interessanterweise kommen die *FGFR3*-Mutationen im Vergleich zum Carcinoma in Situ ausschließlich bei nicht invasiven, papillären Karzinomen (Stadium Ta) vor. Daher sind *FGFR3*-Mutationen möglicherweise als Marker zur Unterscheidung der beiden Wege geeignet (Mitra et al. 2006; Zieger et al. 2009). Zusätzlich findet man auch *HRAS*-Mutationen, die zur konstitutiven Aktivierung des Proteins führen und so einen permanenten Wachstumsreiz setzen (Fitzgerald et al. 1995; Pasin et al. 2008). Ein weiterer interessanter Wachstumsfaktorrezeptor ist *VEGFR2 (Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 2)*. Die Expression von *VEGFR2* korreliert mit zunehmendem Stadium und invasivem Wachstum (Xia et al. 2006). Weiterhin wurde eine Assoziation von erhöhter *VEGFR2*-Expression und Lymphknotenmetastasen sowie Fortschreiten der Erkrankung beobachtet (Mitra et al. 2006; Birkhahn et al. 2010). Auch innerhalb der Signalwege der Angiogenese gibt es interessante Kandidaten wie zum Beispiel Thrombospondin-1 (TSP-1), das von P53 induziert wird. TSP-1 ist ein Inhibitor der Angiogenese, der von P53 abhängig ist. Erhöhte TSP-1 Expression korreliert mit Gesamtüberleben und Rezidivfreiheit (Grossfeld et al. 1997).

Ätiologie

Man nimmt an, dass Umwelteinflüsse eine wichtige Rolle für die Entstehung von Urothelkarzinomen spielen. Durch die Konzentration des Urins in der Niere und die unter Umständen lange Speicherung in der Harnblase können potentiell toxische Stoffe langen Kontakt mit dem Urothel haben. Diese allgemeine Einwirkung könnte das häufige Auftreten von multifokalen Veränderungen der Harnblasenschleimhaut erklären.

Faktoren der Krebsentstehung:

Die Ursachen für Blasenkrebs sind vielfältig. Einerseits spielt die individuelle Prädisposition eine Rolle. Die Effizienz von tumorverhindernden Systemen, beispielsweise der DNA-Reparaturmechanismen oder Abbau/Bindung toxischer Substanzen durch z.B. *Glutathion*, ist dabei von Bedeutung. Ebenso spielt die Aktivität tumorfördernder Systeme wie zum Beispiel das Vorliegen aktivierender Mutationen im *RET*-Protoonkogen, die im Rahmen des *MEN*-Syndroms zu verschiedenen Tumoren führen, eine Rolle.

Zu diesen unveränderlichen inneren Merkmalen des Individuums kommen äußere Einflüsse wie Lebensstil und die Exposition gegenüber verschiedensten Noxen.

Im Folgenden werden einige der äußeren Einflüsse erläutert, die die Entstehung von Blasenkrebs begünstigen.

Chemische Noxen

Tabakkonsum ist einer der wesentlichen Risikofaktoren für die Entstehung von Blasenkrebs. Auch Passivrauchen trägt zur Steigerung des Risikos bei (Brennan et al. 2000; Brennan et al. 2001).

Über die genauen molekularen Mechanismen ist wenig bekannt. Ein möglicher Mechanismus geht über die Hydroxylierung und Acetylierung von Arylaminen in Leber und Blase. Dabei werden DNS-bindende Moleküle geschaffen, die karzinogen wirken. Die Empfänglichkeit eines Individuums für Blasenkrebs wird also unter anderem über die Expression und Aktivität seiner aktivierenden bzw. inaktivierenden Enzyme bestimmt.

Neben dem Tabakkonsum gelten die Exposition gegenüber bestimmten Chemikalien als Risiko (Siemiatycki et al. 2004).

Dabei handelt es sich vor allem um aromatische Amine und ihre Abkömmlinge.

Man vermutet, dass bis zu 20% der Blasenkrebskrankungen durch Industriechemikalien verursacht sind. Obwohl die bekannten gefährlichsten Arbeitsstoffe in Europa inzwischen weitgehend aus den Arbeitsprozessen der chemischen Industrie sowie der Gummi-, Textil- und Lederverarbeitung entfernt wurden oder Schutzmaßnahmen vorgeschrieben sind, treten bei den langen Latenzzeiten auch heute noch berufsbedingte Harnblasenkarzinome auf.

Durch die lange Latenzzeit bei der Entwicklung des Blasenkarzinoms und die häufige Mischexposition ist es schwierig, weitere Karzinogene zu identifizieren.

Die molekularen Mechanismen ähneln denen bei Tabakkonsum.

Ebenso gibt es iatrogene Noxen: Die Behandlung mit Cyclophosphamid und Ifosfamid sowie weiteren Chemotherapeutika erhöht das Blasenkrebsrisiko bis auf das Neunfache. Beide Therapeutika werden zu dem Karzinogen Acrolein abgebaut. Das Risiko scheint proportional zur kumulativen Gesamtdosis zu sein (Bermejo, Sundquist et al. 2009).

Strahlentherapie

Strahlentherapie des Beckens erhöht das Blasenkrebsrisiko. (Singh et al. 2010) Dabei scheint das Risiko von der Gesamtdosis abzuhängen. Die Latenzzeit beträgt 5-10 Jahre. Bei der Strahlentherapie werden wahrscheinlich freie Radikale erzeugt, die direkt die DNA angreifen und Mutationen verursachen.

Infektionen

Die Schistosomen-Zystitis ist mit sowohl plattenepithelialen als auch urothelialen Blasenkarzinomen assoziiert. Über die molekularen Mechanismen ist bisher wenig bekannt. Man vermutet, dass Nitrit und Nitrosamine sowie verwandte Stoffe eine Rolle spielen, die durch Nitrat-reduzierende Bakterien gebildet werden, die als Sekundärinfektion zur Bilharziose auftreten. Nitrosamine und Nitrosamide wirken unter anderem durch DNS-Alkylierung karzinogen. (Jung et al. 2000)

Chemotherapie

Im vorangegangenen Abschnitt wurde chemische Noxen besprochen, die zum Beispiel über alkylierende Effekte als Mutagene auf die DNA einwirken. Paradoxe Weise basiert die Chemotherapie fortgeschrittener Urothelkarzinome auf ähnlichen Wirkmechanismen. Im Folgenden soll also die „therapeutische Noxe“ Cisplatin vorgestellt werden, das als wesentliches Chemotherapeutikum verwendet wird.

Geschichte des Cisplatins

Das Cisplatin wurde zum ersten Mal 1844 von Michele Peyrone, einem italienischen Schüler von Justus von Liebig, in seiner Arbeit „Ueber die Einwirkung des Ammoniak auf Platinchlorür“ beschrieben (Peyrone 1844). 1893 wurde die Struktur durch den Schweizer Chemiker Alfred Werner aufgeklärt. In den folgenden Jahren verlor sich das Interesse an Cisplatin. Bis in die 1960er Jahre blieb Cisplatin weitgehend unbeachtet. Dies änderte sich, als Barnett Rosenberg und seine Mitarbeiter an der Universität von Michigan Versuche durchzuführen begannen, um die Einwirkung von elektrischen Strömen auf Bakterienwachstum zu untersuchen. Es zeigte sich, dass die untersuchten E. Coli-Bakterien sich nicht mehr teilten, sondern auf gigantische Ausmaße wuchsen. Die Gruppe um Rosenberg entdeckte, dass dies nicht auf den Effekt des elektrischen Stroms zurückzuführen war, sondern auf eine Verbindung, die beim Zusammenspiel der Platinelektrode mit dem Nährmedium der Bakterien entstand. Diese Verbindung wurde später als Cisplatin identifiziert (Rosenberg et al. 1965). In Experimenten mit tumorerkrankten Mäusen zeigte sich die hohe Wirksamkeit von Cisplatin, so dass 1971 zum ersten Mal klinische Studien durchgeführt wurden (Trzaska 2005). Heute hat Cisplatin trotz der Entwicklung von

Therapeutika wie Tyrosinkinaseinhibitoren immer noch einen hohen Stellenwert in der Behandlung solider Tumoren.

Cisplatin und Carboplatin

Cisplatin enthält ein komplex gebundenes Platinatom.

Es stellt einen planaren Komplex dar, der am zentralen Platinatom zwei cis-ständige Chloroliganden und zwei Aminliganden gebunden hat. Intrazellulär werden die Chloroliganden durch Wasser ersetzt (Aqualiganden) (Wikimedia 2011).

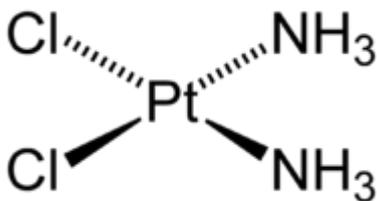


Abbildung 5: Cisplatin

Carboplatin ist ein Abkömmling des Cisplatin. Anstelle der Chloroliganden enthält es eine zweizählige Dicarboxylatgruppe.

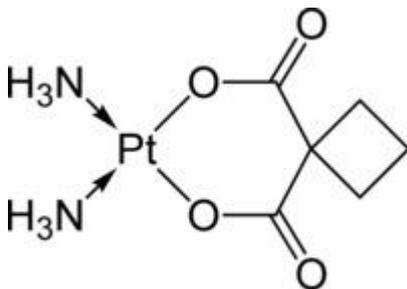


Abbildung 6: Carboplatin

Wirkungsweise:

Cisplatin wirkt ähnlich Alkylantien durch Vernetzung von DNA-Strängen. Aufgrund der hohen Nukleophilie des Aqua-Cisplatin-Komplexes reagiert Cisplatin bevorzugt mit dem N₇-Atom von Guanin und Adenin. Es entstehen so Verknüpfungen innerhalb eines DNA-Stranges (Intrastrang-Quervernetzung) und zwischen benachbarten DNA-Strängen (Interstrang-Quervernetzungen).

Ein weiteres wichtiges Wirkungsprinzip des Cisplatin ist die Auslösung von Punktmutationen. Neben diesen Wirkungen führt Cisplatin auch zur Hemmung der DNA-Reparatur und hemmt die Telomeraseaktivität.

Bei Carboplatin wird ein ähnlicher Wirkungsmechanismus angenommen. Zusätzlich spielen möglicherweise Abkömmlinge mit offenem Kohlenstoffring eine Rolle, die unter der Einwirkung von Bikarbonat entstehen (Di Pasqua et al. 2006).

Resistenzentwicklung

Die Chemotherapie mit Cisplatin und Abkömmlingen ist ein zentraler Teil der Behandlung vor allem des fortgeschrittenen Blasenkarzinoms. Dabei kommt es nur bei einem Teil der Patienten zum Ansprechen auf das Chemotherapeutikum. Zusätzlich kommt es im Verlauf der Behandlung oft zum Verlust der Wirksamkeit. Einerseits limitiert dies den Therapieerfolg, andererseits leiden die Nichtansprecher unter den teils erheblichen Nebenwirkungen und Komplikationen, ohne dass es zu Verlängerung von Lebenszeit und Lebensqualität kommt. Daher ist es nötig, Instrumente zu finden, die den Therapieerfolg voraussagen können, um unnötige bzw. unwirksame Behandlung zu vermeiden.

Im nachfolgenden sollen die chemotherapeutischen Möglichkeiten kurz vorgestellt werden.

Neoadjuvante Chemotherapie

Diese Chemotherapie wird vor einer Operation durchgeführt. Dabei sollen einerseits Mikrometastasen zerstört werden, andererseits kann die neoadjuvante Therapie dazu dienen, lokal inoperable Tumoren soweit zu verkleinern, dass ein kurativer Operationsversuch möglich wird. Große Metaanalysen mit den Daten von 3005 Patienten haben gezeigt, dass die neoadjuvante Chemotherapie leichte Vorteile (50% vs. 45% 5-Jahres-Überleben) in Hinblick auf die Überlebensrate bringt (Advanced bladder cancer (ABC) meta-analysis collaboration 2005). Der Effekt der neoadjuvanten Chemotherapie scheint bei fortgeschrittenem Leiden (T3, T4) ausgeprägter zu sein. Bei diesen Studien wurde ein möglicher Verlust von Lebensqualität unzureichend berücksichtigt (Sternberg et al. 2007).

Adjuvante Chemotherapie

Diese Chemotherapie wird nach einer Operation durchgeführt. Dadurch soll einerseits ein Zeitverlust in der Behandlung des Primärtumors vermieden werden, andererseits vorhandene (Mikro-)Metastasen zerstört werden. In einer Metaanalyse der Daten von 491 Patienten zeigte sich ein signifikant verbessertes Überleben (59% vs. 50% 3-Jahres-Überleben). Bei Patienten mit tumorbefallenen Lymphknoten scheint der Nutzen der adjuvanten Chemotherapie noch höher zu sein (Advanced bladder cancer (ABC) meta-analysis collaboration 2005). Die bisherige Studienlage zur adjuvanten Chemotherapie ist unzureichend, daher müssen weitere Studien abgewartet werden, bis der Stellenwert dieser Therapie endgültig beurteilt werden kann (Sternberg et al. 2007).

Chemotherapie des fortgeschrittenen/metastasierten Karzinoms

Beim fortgeschrittenen Urothelkarzinom wird die Chemotherapie in der Absicht durchgeführt, die Überlebenszeit zu verlängern und das Fortschreiten der Erkrankung zu verlangsamen.

Es wurde gezeigt, dass die Cisplatin-Kombinationsschemata die Überlebenszeit deutlich erhöhen.

Patienten, die nur eine palliative Therapie erhalten, haben eine durchschnittliche Überlebenszeit von 4-6 Monaten. Patienten, die mit Cisplatin-Kombinationsschemata behandelt werden, überleben durchschnittlich 12-14 Monate bei einer 3 Jahresüberlebensrate von ca. 20%.

Die Chemotherapiekombinationen MVAC (Methotrexat/Vinblastin/Doxorubicin/Cisplatin) und GC (Gemcitabin/Cisplatin) sind im Vergleich zu anderen Kombinationen am wirksamsten. Dabei ist GC besser verträglich als das MVAC-Regime (von der Maase et al. 2000). Bei Patienten mit Niereninsuffizienz oder schlechtem Allgemeinzustand kann Cisplatin durch Carboplatin ersetzt werden. Viele Studien, die vor allem in Hinblick auf das nicht kleinzellige Lungenkarzinom durchgeführt wurden, kommen insgesamt zu dem Schluss, dass Carboplatin etwas weniger wirksam ist. In einer großen Metaanalyse mit 2968 Patienten ergab sich eine Response-Rate von 30% für Cisplatin bzw. 24% für Carboplatin. (Ardizzoni, Boni et al. 2007).

Übliche Therapieregime sind

GC: Gemcitabin (z.B. 2x 1200mg/m²) plus Cisplatin (z.B. 70mg/m²)

MVAC: Methotrexat (z.B. 3x 30 mg/ m²) plus Vinblastin (z.B. 3x3 mg/ m²) plus Doxorubicin (z.B. 30 mg/)

plus Cisplatin (z.B. 70 mg/ m²)

Die Ansprechrate beider Regime liegt für die Teilremission bei ca. 45%, für die Vollremission bei ca. 20% (Bajorin 2008).

Mechanismen der Cisplatinresistenz

Das Ansprechen auf die Chemotherapie wird anhand von bildgebenden Verfahren, Tumormarkern im Blut/Serum sowie klinischen Parametern bestimmt.

In der Bildgebung sind vor allem die Computertomographie und (eingeschränkt) die Magnetresonanztomographie, Skelettszintigraphie und Positronen-Emissions-Tomographie (PET) wichtig, die Identifizierung und Ausmessung von Markerläsionen (Metastasen) möglich machen. Dabei spielen einheitliche radiologische Kriterien wie die RECIST-Kriterien (Therasse et al. 2000) eine große Rolle. Darin wird das Ansprechen (Response) anhand der Größenveränderung von messbaren Tumormanifestationen bestimmt und objektiviert.

Tumormarker spielen bei der Bestimmung des Therapieansprechens eine untergeordnete Rolle. Tumormarker sind Proteine, die im Serum nachgewiesen werden können und eine gewisse Tumorspezifität zeigen. Ein besonders bekannter Vertreter ist z.B. das prostataspezifische Antigen (PSA), das in Diagnostik und Behandlung des Prostatakarzinoms eine zentrale Rolle spielt. Beim Urothelkarzinom ist weder für die Diagnostik oder die Messung des Ansprechens ein zuverlässiger Tumormarker bekannt.

Abgesehen von den klinischen Markern gibt es klinische Parameter, die Hinweis auf das Ansprechen geben können. Dazu zählen das Körpergewicht, Schmerzen sowie die insgesamt Leistungsfähigkeit und Lebensqualität, die im Rahmen von Skalen wie dem Karnovsky-Index in einem gewissen Ausmaß quantifiziert werden kann (Karnovsky 1949).

Im Rahmen der Untersuchungen des Chemotherapie-Ansprechens zeigt sich immer wieder, dass nur ein Teil der Patienten mit Urothelkarzinom auf die Chemotherapie mit cisplatinhaltigen Schemata anspricht. Davon erreicht wiederum nur ein Teil ein komplettes Ansprechen. Dies lässt sich auf die meisten anderen soliden Tumore übertragen.

Aus diesem Grund stellt sich die folgende Frage: Warum sind/werden manche Tumoren gegenüber Chemotherapeutika resistent, andere aber nicht? Warum spricht nur ein Teil der Patienten auf die Therapie an?

Prinzipiell gibt es auf zellulärer Ebene verschiedene Faktoren, die die Pharmakokinetik und -Dynamik eines Wirkstoffes in der Zelle und damit letztlich auch die Wirksamkeit beeinflussen. Betrachten wir diese Faktoren beim Cisplatin.

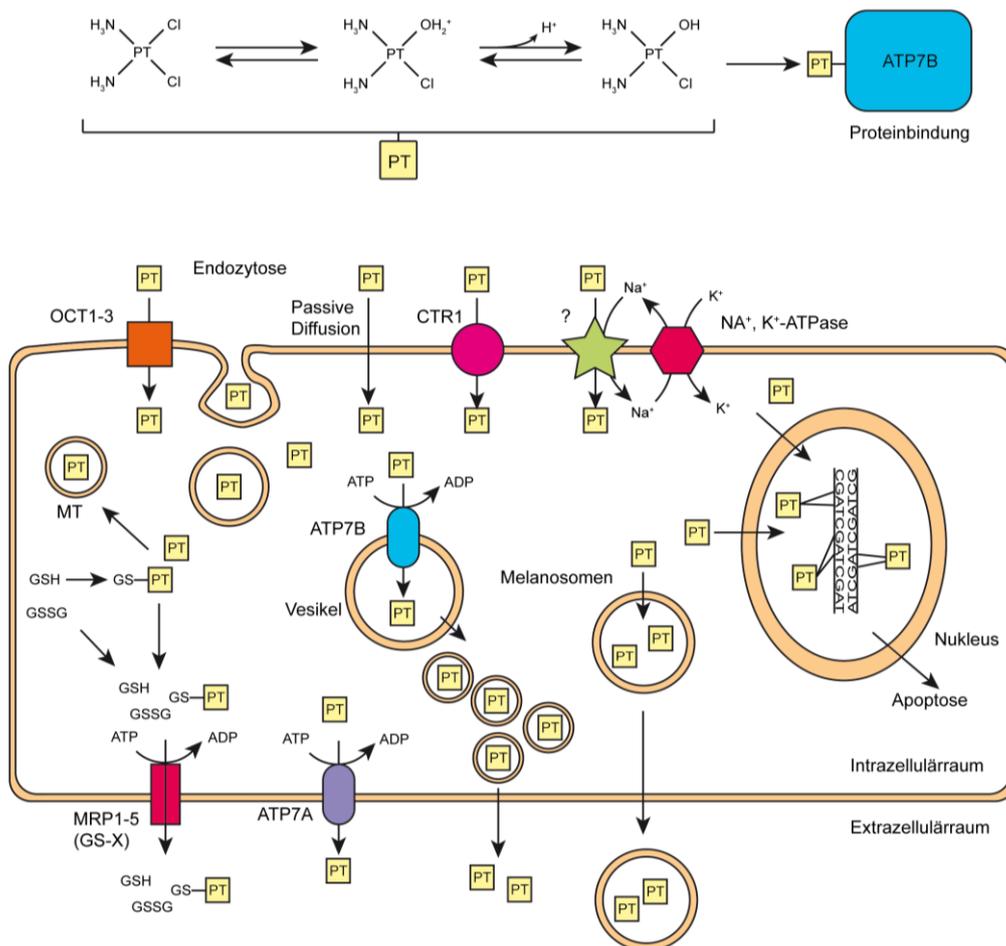


Abbildung 7: Der Platinstoffwechsel in der Zelle

(angelehnt an Hall et al. 2008)

Die Aufnahme in die Zelle:

Parallel zur Kupferaufnahme wird auch Cisplatin durch den Kupfertransporter *hCTR1* in die Zelle transportiert. Im Gegensatz zu früherer Meinung spielt die passive Diffusion *in vivo* wahrscheinlich eine geringe Rolle. Bei defektem *CTR1* kann das Cisplatin nicht in die Zelle als den Zielort seiner Wirkung transportiert werden. Dadurch kann die Zelle resistenter gegen Cisplatin werden, indem die Konzentration des toxischen Cisplatins intrazellulär niedrig bleibt. Bei Überexpression dagegen akkumulieren die Zellen mehr Cisplatin (Sinani et al. 2007). Weitere Aufnahmewege wie z.B. Endozytose sind möglich, da Cisplatin in verschiedenen Metaboliten vorkommt, die unterschiedliche Eintrittspforten nutzen könnten. Kandidaten für weitere Aufnahmetransporter wären die „Organic Cation Transporters“ (*OCT*) aus der Solute Carrier Familie (*SLC22*) (Hall et al. 2008).

Cisplatin in der Zelle:

Man nimmt an, dass Cisplatin - analog zum Kupfer - in der Zelle fast ausschließlich an Proteine wie beispielsweise ATOX1, Metallochaperone, Metallothionine und Glutathion gebunden vorliegt. Die Metallothionine und Glutathion entgiften Cisplatin. Cisplatin bindet nichtenzymatisch an die Thiolgruppen von zwei Glutathion-Molekülen. Dieser Komplex wird ATP-abhängig von sogenannten GS-X Transportern aus der MRP-Gruppe (Multidrug Resistance Protein) ausgeschieden. Dasselbe gilt für den Metallothionin-Komplex.

Erhöhte Glutathion/GS-X-Synthese könnte also durch gesteigerte Inaktivierung und Ausschleusung eine Cisplatin-Resistenz bewirken.

Wenn das Cisplatin in der Zelle von den ATP7-Transportern in Vesikel verpackt wird, verliert es seine Wirksamkeit. Eine erhöhte Aktivität dieser Enzyme würde also nicht nur den Efflux

aus der Zelle erhöhen, sondern auch die Menge an biologisch wirksamem Cisplatin verringern (Hall et al. 2008).

Efflux aus der Zelle:

Das Cisplatin wird durch die beiden Kupfertransporter *ATP7A* und *ATP7B* ausgeschieden.

Die Ausscheidung über die *GS-X* Transporter wurde bereits erwähnt. Man vermutet die Existenz von weiteren Transportern (Hall et al. 2008).

Bei der Ausscheidung durch *ATP7B* wird das Cisplatin von *ATP7B* intrazellulär in Vesikel verpackt, was wahrscheinlich zur Deaktivierung von Cisplatin führt.

Es zeigt sich, dass der Stoffwechsel des Cisplatins in der Zelle durch *ATP7B* beeinflusst wird.

Die Sequestrierung des Cisplatins in Vesikel oder die erhöhte Ausscheidung durch *ATP7B* ist also ein möglicher Grund für die Resistenzentwicklung. Das *ATP7B*-Gen ist allerdings nicht im Zusammenhang mit Chemotherapie entdeckt und beforscht worden, sondern im Rahmen einer erblichen Kupferstoffwechselstörung, die im Folgenden vorgestellt wird. Dieses bereits bestehende Wissen lässt sich auch zur Untersuchung der Cisplatinresistenz nutzen.

ATP7B

Einleitung

Das *ATP7B*-Gen wurde in Zusammenhang mit dem Morbus Wilson, einer erblichen Kupferstoffwechselstörung, entdeckt. Das Wilson Disease-Gen (Synonyme: *ATP7B*, *PWD*, *WC1*, *WD*, *WND*) (OMIM: 606882 (Hamosh et al. 2005)) kodiert auf dem langen Arm von Chromosom 13 (13q14.3) für ein kupfertransportierendes Membranprotein aus der Familie der P-Typ-ATPasen (Petrukhin et al. 1993; Tanzi et al. 1993; Petrukhin et al. 1994). Diese ATPasen sind evolutionär stark konserviert und kommen in sehr ähnlicher Form in allen Eukaryonten vor. Das Protein wird hauptsächlich in Gehirn und Leber exprimiert. *ATP7B* transportiert nicht ausschließlich Kupfer, sondern mit niedrigerer Affinität auch andere Metalle wie Eisen oder Platin (Safaei et al. 2005; Lutsenko et al. 2007).

Funktion im Kupferstoffwechsel

Kupfer ist ein essentielles Spurenelement. Die durchschnittliche tägliche Aufnahme liegt ungefähr zwischen 1mg bis 3 mg. Das Kupfer wird durch den Kupfertransporter *CTR1* mit der Nahrung in den Zellen des Dünndarms aufgenommen. Innerhalb der Zelle wird das Kupfer an ein Protein (Atox1) gebunden transportiert. Atox1 ist der metallbindenden Domäne der Kupfer-ATPasen sehr ähnlich. In der Dünndarmzelle wird es durch den Transporter *ATP7A* in den Blutkreislauf abgegeben. *ATP7A* ist sowohl strukturell als auch funktionell nah mit *ATP7B* verwandt. Dennoch spielen sie verschiedene Rollen und kompensieren sich gegenseitig nur teilweise. Der größte Teil des Kupfers im Blut wird in der Leber verstoffwechselt. Dort wird das Kupfer intrazellulär von *ATP7B* zum einen in das Trans-

Golgi-Netzwerk transportiert, in dem verschiedene kupferabhängige Enzyme wie z.B. Coeruloplasmin mit dem Metall versorgt werden.

Zum anderen wird *ATP7B* - durch den Kupferspiegel reguliert - in Vesikel eingebaut, die dann mit der kanalikulären Zellwand verschmelzen, um überschüssiges Kupfer in die Gallenflüssigkeit auszuschcheiden.

ATP7B erfüllt im Körper also einerseits homöostatische und andererseits Biosynthesefördernde Funktionen (Lutsenko et al. 2007).

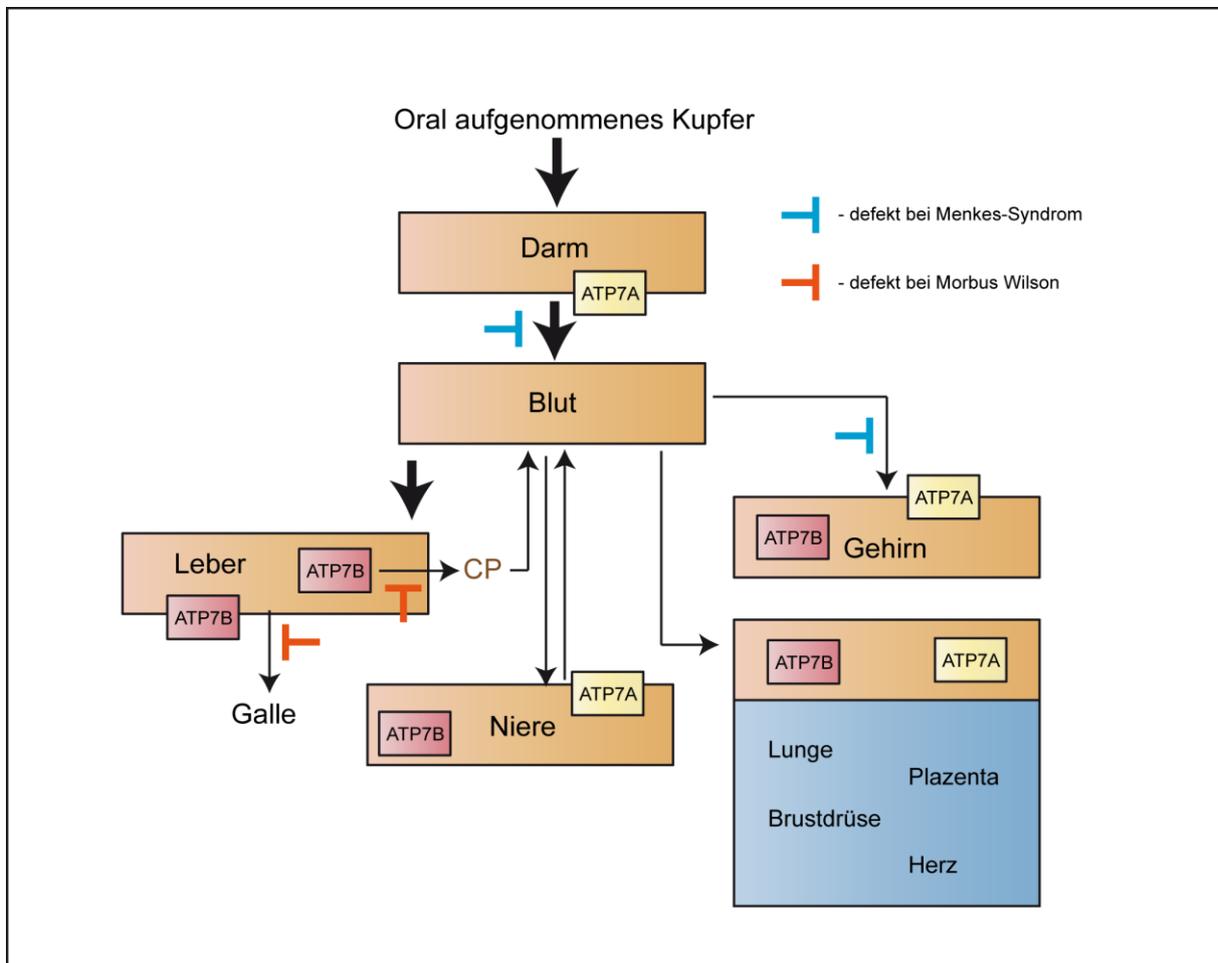


Abbildung 8: Der Kupferstoffwechsel

(angelehnt an Lutsenko et al. 2007)

Struktur von ATP7B

Das Genprodukt *ATP7B* besteht aus folgenden Einheiten:

Sechs metallbindende Domänen, einer „Kupplungs“-Domäne, die als Bindeglied zwischen ATP-Hydrolyse und Kationentransport dient, dem Kationenkanal mit Phosphorylierungsstelle, eine Nukleotid-bindende Domäne und acht hydrophobe Transmembrandomänen. Durch alternatives Splicing entsteht eine Vielfalt von Proteinvarianten. Die Funktion der Splicingvarianten ist bisher unklar. Da es Proteinvarianten gibt, denen essentielle Teile zur Funktion als Kupfertransporter fehlen, könnte es sein, dass sie regulatorische Funktionen in der Zelle übernehmen (Yang et al. 1997).

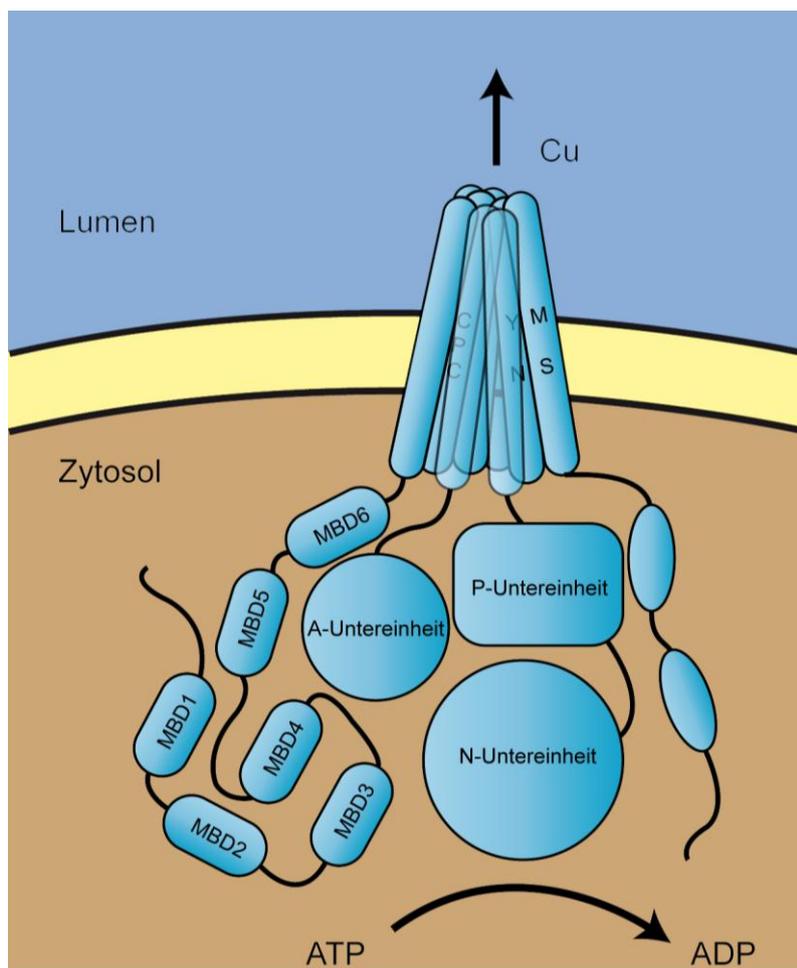


Abbildung 9: ATP7B Tertiärstruktur

(angelehnt an Lutsenko et al. 2007)

Mutationen im ATP7B-Gen: Morbus Wilson

Der Morbus Wilson ist eine autosomal-rezessiv vererbte Erkrankung. Verschiedene Mutationen im *ATP7B*-Gen verursachen den Morbus Wilson (englisch: Wilson Disease) (Wilson 1912).

Klinik

Die Erkrankung zeigt sich vor allem in Leber und Gehirn. Die Ausprägung der verschiedenen Symptome ist ausgesprochen variabel. Häufig stellen sich die Patienten mit einer Beeinträchtigung der Leberfunktion und/oder neuro-psychiatrischen, parkinsonartigen Symptomen vor (Oder et al. 1993). Seltener treten tubuläre Funktionsstörungen in der Niere auf wie z.B. die renale tubuläre Azidose.

Diagnose

Die Erkrankung wird normalerweise zwischen dem 5. und 40. Lebensjahr diagnostiziert. Allerdings gibt es berichtete Fälle zwischen dem 3. und 80. Lebensjahr.

Bei unklarer Leberschädigung und/oder neuropsychiatrischer Auffälligkeit sollte differentialdiagnostisch an einen Morbus Wilson gedacht werden.

Man findet bei der Erkrankung erhöhte Transaminasen und einen erniedrigten Serum-Coeruloplasmin-Spiegel. Die Kupferausscheidung ist im 24h-Urin erhöht. Bei der augenärztlichen Untersuchung kann bei fortgeschrittener Erkrankung ein sogenannter Kayser-Fleischer-Ring oder Kupferablagerungen in der Linse („Sonnenblumenkatarakt“) sichtbar sein (Kaplan 2008).

Geographische Verteilung der Mutationen

Die geographische Verteilung der Mutationen ist für diese Arbeit besonders interessant. Die häufigsten Mutationsorte variieren in Abhängigkeit von der geographischen Region.

Es existiert eine relevante Anzahl von Arbeiten, die diese Fragestellung untersucht haben.

Dabei zeigt sich, dass im mittel- und osteuropäischen Raum Mutationen in den Exons 8, 13, 14, 15 und 20 überwiegen (Bachmann et al. 1991; Reilly et al. 1993; Shah et al. 1997; Curtis et al. 1999; Ivanova-Smolenskaya et al. 1999; Caca et al. 2001; Firneisz et al. 2002; Loudianos et al. 2003; Todorov et al. 2005; Vrabelova et al. 2005; Ferenci 2006).

Im Mittelmeerraum sind zusätzlich Mutationen in den Exons 6, 16 und 17 häufig (Loudianos et al. 1996; Shah et al. 1997; Loudianos et al. 1998; Loudianos et al. 1998; Loudianos et al. 1999; Loudianos et al. 1999; Loudianos et al. 2000; Loudianos et al. 2003; Margarit et al. 2005).

In der vorliegenden Arbeit wurden die Exons berücksichtigt, die in der europäischen Population häufig mutiert vorliegen.

Ätiologie & Epidemiologie

Wie oben erwähnt ist der Morbus Wilson eine autosomal-rezessiv vererbte Erkrankung, bei der eine große Anzahl verschiedener Mutationen bekannt sind. Die häufigste ist die H1069Q-Punktmutation. Bisher sind ca. 380 verschiedene Mutationen bekannt, sowie ca. 130 verschiedene Polymorphismen (Cox 2007).

Die meisten Erkrankten haben zwei verschiedene Mutationen („*Compound Heterozygotes*“).

Die Erkrankungsrate zeigt geographische Unterschiede und liegt bei geschätzten 1: 40 000 - 1: 55 000 Neugeborenen, demnach wären ungefähr 0,9 % der Bevölkerung heterozygote Träger (Olivarez et al. 2001).

Dies bedeutet, dass ca. 1 % der Bevölkerung heterozygote Träger von Mutationen sind, die die Funktion von *ATB7B* einschränken, da es im homozygoten Fall zum Ausbruch der Erkrankung kommt. Zusätzlich ist ein vermutlich weitaus größerer Anteil der Bevölkerung mit genetischen Varianten von *ATP7B* ausgestattet, deren Bedeutung ungeklärt ist.

Mutationen können dabei zum Funktionsverlust des Proteins führen und zum Morbus Wilson führen. Ebenso ist eine Funktionsverstärkung durch Mutationen denkbar. Gerade im Zusammenhang mit Cisplatinresistenz könnten Überfunktionen eine wichtige Rolle spielen.

Ziel der vorliegenden Untersuchung/Studienhypothese

Ziel der vorliegenden Untersuchung ist es, Veränderungen des Schwermetalltransportproteins *ATP7B* und seine möglichen Wirkungen auf platinhaltige Chemotherapie am Beispiel des Urothelkarzinoms zu klären.

Die Studienhypothesen sind:

- 1) Aktivierende (bzw. inaktivierende) Mutationen von *ATP7B* führen zu Nicht-Ansprechen (bzw. Ansprechen) auf die Chemotherapie.
- 2) Der Verlust einer aktivierenden Mutation/Wildtyp (bzw. einer inaktivierenden Mutation) von *ATP7B* führt relativ zu einem besseren (bzw. schlechteren) Ansprechen.

Zusammenfassung der Einleitung

Das Urothelkarzinom ist eine Krebserkrankung, die in den fortgeschrittenen Stadien schwierig zu behandeln ist und eine schlechte Prognose hat. Die wirksamste Therapie ist die Chemotherapie mit Cisplatin-haltigen Schemata. Dennoch werden die Behandlungserfolge durch die hohe Zahl der primär oder sekundär therapieresistenten Fälle eingeschränkt. Eine Möglichkeit zur Therapieverbesserung liegt daher im besseren Verständnis der Resistenzmechanismen. Eine mögliche Rolle könnte dabei ein Protein des Kupferstoffwechsels namens *ATP7B* spielen. In *in-vitro*-Untersuchungen konnte seine Fähigkeit gezeigt werden, Cisplatin zu transportieren. Daher kann eine unterschiedliche Funktion dieses Proteins unter Umständen die zelluläre Akkumulation und Verfügbarkeit von Cisplatin beeinflussen. Variationen des Gens sind keine Rarität. Untersuchungen zum Morbus Wilson zeigen, dass das Wilson-Gen häufig in verschiedenen Variationen vorliegt, deren Bedeutung nur teilweise geklärt ist. Daher erscheint es sinnvoll, die häufigsten Varianten bei

fortgeschrittenen Urothelkarzinomen festzustellen und mit dem Ansprechen auf die Chemotherapie in Beziehung zu setzen. Des Weiteren soll die Häufigkeit von LOH festgestellt werden und mit dem Ansprechen auf die Chemotherapie korreliert werden. Da bisher keine Daten zu dieser Fragestellung vorliegen, ist keine Fallzahlschätzung oder Powerberechnung möglich.

Material und Methoden

Material:

Alle bearbeiteten Fälle sind Fälle aus der Routinediagnostik und stammen aus dem Archiv des Institutes für Pathologie an der Technischen Universität München. Dabei handelt es sich um Gewebe von 17 Patienten mit Urothelkarzinomen der Blase oder der Harnleiter. Alle verwendeten Urothelkarzinome wurden im Rahmen der Routinediagnostik als Stadium pT2a G3 (high grade) oder höher klassifiziert (nach der TNM-Klassifikation der WHO 2004). Alle Gewebe stammen aus Operationspräparaten der Urologischen Klinik, die am OP-Tag bearbeitet wurden. Die Patienten wurden im Zeitraum von 1996 – 2006 an der Urologischen Klinik und Poliklinik der Technischen Universität München behandelt. Die Patienten erhielten postoperativ eine Chemotherapie mit einem Cisplatin- oder Carboplatinhaltigen Schema mit 2 – 8 Zyklen Cisplatin bzw. 2 – 27 Zyklen Carboplatin. Nach zwei Zyklen Chemotherapie fand ein Restaging statt, bei dem die Patienten den Gruppen „Fortschreitende Erkrankung (Progressive Disease)“, „Teilweise Remission (Partial Remission)“ und „Komplette Remission (Complete Remission)“ zugeordnet wurden. Diese Zuordnung erfolgte nach den RECIST 1.0 Kriterien (Therasse et al. 2000) anhand von Markerläsionen im CT sowie bei einem Fall anhand des tumorbedingten Todes. Alle klinischen Daten wurden von Dr. med. Markus Groffmann, Urologische Klinik und Poliklinik, erhoben.

Bearbeitung des Materials:

Alle Präparate wurden am OP-Tag zugeschnitten und für 18 Stunden in 10% gepufferten Formalin fixiert. Danach wurden die Präparate in Paraffinblöcke aufgearbeitet und für die Routinediagnostik verwendet. Die Präparate wurden lichtabgeschlossen bei ca. 18 ° C im Archiv gelagert.

DNA-Extraktion aus Paraffinmaterial:

Abhängig von der Größe des Präparates wurden drei bis neun Schnitte á 10 µm von Hand mit einem Mikrotom (Microm HM 335 E, Microm GmbH, Walldorf, Deutschland) geschnitten und auf einem Glasobjektträger (Starfrost® Objektträger, Waldemar Knittel Glasbearbeitungs GmbH, Braunschweig, Deutschland) aufgebracht. Danach wurden die Schnitte für 30 Minuten bei 20°C getrocknet und in einer absteigenden Alkoholreihe (Xylol, Propanol, Ethanol 96%, Ethanol 70%, Aqua dest.) deparaffiniert. Die Schnitte wurden dann ca. 15 Sekunden lang in Hämalaun gefärbt und ca. 10 Sekunden mit Leitungswasser gespült und 10 Minuten bei 20°C getrocknet.

Die Tumorgewebsschnitte, morphologisch normales Urothel und morphologisch normale glatte Muskulatur der Blasenwand wurden pathologisch beurteilt (PD Dr. med. Gregor Weirich) und für die Mikrodissektion markiert. Mit Kanülen wurden die markierten Areale abgekratzt und in gekennzeichnete Sarstedtröhrchen überführt. Diese waren je nach Gewebemenge mit 50 µl - 100µl PK-Puffer (5% 1M TRIS-HCl pH 8,3; 0,2% 0,5M EDTA pH 8; 0,5 % TWEEN 20; in Aqua dest gelöst; steril filtriert) gefüllt. Dazu wurde 5% Proteinase K (20mg/ml) hinzugegeben. Die Röhrchen wurden in einem Thermoschüttler

(Thermomixer Comfort, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) bei 55°C und 550 rpm über Nacht inkubiert. Zur Proteinase K – Inaktivierung wurden die Röhren für 10 Minuten in kochendem Wasser inkubiert.

Polymerasekettenreaktion (PCR)

Prinzip der PCR

Die PCR ist eine Methode, die zur Vervielfältigung von DNA-Abschnitten genutzt wird.

Dabei macht man es sich zu Nutze, dass es hitzestabile Formen der DNA-Polymerase gibt, die aus Heißwasserbakterien wie *Thermophilus aquaticus* isoliert werden konnten.

Da die Polymerase eine doppelsträngige Ansatzstelle benötigt, um einen Einzelstrang zu vervielfältigen, müssen noch sogenannte Primer benutzt werden.

Primer sind kurze Antisense-DNA-Fragmente, die an Beginn und Ende der zu vervielfältigenden Sequenz binden. Das Probenmaterial (DNA) wird durch Hitze denaturiert und in Einzelstränge aufgeteilt. Die zwei zugegebenen Primer binden an eine Sequenz jeweils am Anfang und Ende der gewünschten Sequenz. Die Polymerase vervielfältigt nun diesen DNA-Abschnitt. Ab dem zweiten Zyklus liegt das gewünschte DNA-Fragment vor und wird nun annähernd exponentiell vervielfältigt. Die so gewonnene DNA kann nun auf Gelen dargestellt oder anderweitig verwendet werden

Amplifikation der DNA mittels PCR:

Zur Amplifikation der DNA wurde die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) verwendet. Dabei wurde 25µl der folgenden Lösung erstellt bzw. Vielfache davon:

15,25 µl H₂O

4 µl dNTPs 1,25 mM (GeneAmp ® dNTPs, Applied Biosystems, Foster City, USA)

2,5 µl Puffer (Perkin Elmer Puffer pH 8,3: 100 mM TrisHCl pH 8,3 1%; 500 mM KCl 5%;

0,1% Gelatine 0,01%; 1 bzw. 1,5 bzw. 2 mM MgCl₂)

je 0,5 µl von Vorwärts- & Rückwärtsprimer

0,25 µl Taq-Polymerase (GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, Schweden)

2 µl DNA (1:10 Verdünnung in Aq. dest.)

Amplifikation:

Alle Amplifikationen wurden mit dem Thermocycler Primus 96 plus (MWG-Biotech AG, Ebersberg, Deutschland) ausgeführt. Dabei wurde folgendes Protokoll verwendet, wobei die Hybridisierungstemperatur je nach Primer variiert wurde:

Denaturierung: 94 °C für 5 Minuten

40x die folgende Schleife:

Denaturierung bei 94 °C für 30 Sekunden

Hybridisierung bei 55 °C für 30 Sekunden

Elongation bei 72 °C für 30 Sekunden

Elongation bei 72 °C für 7 Minuten

Kühlung auf 10 °C

Ende des Protokolls

Primersequenzen:

Mikrosatellit	Richtung (Synonym)	Primersequenz
D13S133	F (cu13/1382*)	5' – GGC AAC ATA GGG AAA CCC TAG C – 3'
	R (cu13/1707)	5' – GCT AGG ACT ACA GGT GCA AAC C – 3'
D13S296	F (2970*)	5' – CAA ACT TTT AGT ATG AGT CTA TCT CTC TCT CC – 3'
	R (2971)	5' – TCA TTA AAG TGA GGA GTG AGG TAA ATG – 3'
D13S297	F (2842*)	5' – TTA TGA TGA AAA GTA ATA TAA GAG GTC CC – 3'
	R (3044)	5' – AGC TGT ATC TGG GGT TGG – 3'
D13S298	F (2861*)	5' – GGT ATG TTG TAT AAT ACT ACC TTC CAT CA – 3'
	R (3097)	5' – AGT TTC TAC ATG AAT AAA ATC GTA CTA GAA AG – 3'
D13S301	F (3229*)	5' – ATC ATA CCT GGT TGT GCA ACC – 3'
	R (3230)	5' – CCA GAT GCT TCT TTC TAA ACA CAC A – 3'
D13S314	F (ca46#1*)	5' – GAG TGG AGG AGG AGA AAA GA – 3'
	R (ca46#2)	5' – GTG TGA CTG GAT GGA TGT GA – 3'
D13S316	F (ca403#1*)	5' – GCA GCA ATG CTT TGT TGC ATA A – 3'
	R (ca403#2)	5' – TGT TTC CCA CCA ATC TTA CCG – 3'

Tabelle 5: Primersequenzen der Mikrosatelliten um ATP7B

(Quelle: Petrukhin et al. 1993; Thomas et al. 1994)

(* - Fluoreszenzmarkiert)

Exon	Richtung	Primersequenz
6	F	5' – CTG CCA ATG CAT ATT TTA AC – 3'
	R	5' – GGT AGA GGA AGG GAC TTA GA – 3'
8	F	5' – AAC CCT TCA CTG TCC TTG TC – 3'
	R	5' – AGG CAG CTC TTT TCT GAA – 3'
13	F	5' – TGA ACT CTC AAC CTG CCT – 3'
	R	5' – TCT CAG ATG GGA AAG CCG – 3'
14	F	5' – TCC ATC TGT ATT GTG GTC AG – 3'
	R	5' – CAG CTA GGA GAG AAG GAC AT – 3'
15	F	5' – CTT TCA CTT CAC CCC TCT – 3'
	R	5' – AGC TGA CAG AGA CAA AAG C – 3'
16	F	5' – CCA TTT AGA AAT AAC CAC AG – 3'
	R	5' – AGG AAG GCA GAA GCA GA – 3'
17	F	5' – CAA GTG TGG TAT CTT GGT G – 3'
	R	5' – CTG GTG CTT ACT TTT GTC TC – 3'
20	F	5' – CTA GGT GTG AGT GCG AGT T – 3'
	R	5' – CAG CAT TTG TCC CAG GT – 3'

Tabelle 6: Primersequenzen zur Analyse ausgewählter Exons des ATP7B-Gens

(Quelle: Thomas et al. 1995; Weirich et al. 2002)

Darstellung des Amplifikates auf Agarose-Gel:

Ein 2% Agarosegel (Seakem® LE Agarose, Cambrex Bioscience Rockland, USA) mit einem Tropfen Etidium-Bromid 0,7 mg/ml (EtBr, Eurobio, Frankreich) pro 100 ml TBE -Puffer (TRIS Borat EDTA: TRIS Base 1,08%, Boric Acid 0,55%, 0,5 M EDTA pH 8,0 0,4%, ad 1000 ml H₂O) wurde erhitzt und in einer handelsüblichen Form gegossen. Zu je 4 µl des Amplifikates wurde 1 µl Dyes 10x (0,2% Bromphenolblau 20 %, 0,2% Xylene-Cyanol 20 %, Glycerol 50%, 1 mM EDTA pH 8,0 0,2%, Aqua dest. 9,8%) gegeben. Diese Mischung wurde in die Taschen des Gels pipettiert. Als Längenmarker wurde „DNA Molecular Weight Marker IX“ (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland) verwendet. In einer Elektrophoresekammer (Wide Mini SUB™ Cell, Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA) wurde die DNA bei 130 Volt und 400 mA für 30 Minuten mittels eines Spannungserzeugers (Power Pac 300, Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA) aufgetrennt. Nach der Elektrophorese wurden die Banden unter UV-Licht sichtbar gemacht und fotografiert (Eagle Eye™ III, Stratagene, La Jolla, USA).

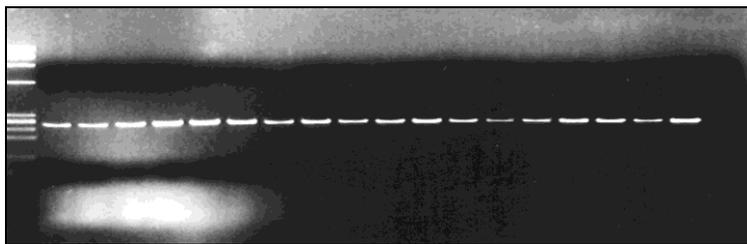


Abbildung 10: Unter UV-Licht fotografiertes Agarosegel mit einem Teil der Amplifikate des Exon 15. Ganz rechts die Negativkontrolle (keine Bande).

Mikrosatellitenanalyse

Prinzip der Mikrosatellitenanalyse

Mikrosatelliten sind polymorphe Abschnitte von kurzen, sich wiederholenden Basenpaarfolgen und befinden sich meist in nicht-kodierenden Intronsequenzen. Dabei unterscheidet sich die Anzahl der Wiederholungen sowohl von Individuum zu Individuum als auch innerhalb eines Individuums. Ein diploider Chromosomensatz hat dadurch oft heterozygote Mikrosatelliten, die sich in ihrer Länge unterscheiden. Die Mikrosatelliten, die in der Nähe eines Gens liegen, können als Marker für Allelverluste dienen. Einen solchen Verlust bezeichnet man als „*LOH* - Loss of Heterozygosity“.

Eine *LOH*-Situation mit Verlust des Wildtyp-Allels kann so zur ausschließlichen Expression des mutierten Allels führen und umgekehrt.

Da Mikrosatelliten auch homozygot sein können und dann nicht informativ in Bezug auf *LOH* sind, benötigt man im Allgemeinen mehrere Marker, um den *LOH*-Status eines Gens zu charakterisieren.

Methode

Die Mikrosatelliten-Loci samt Primerpaaren wurden der Literatur (Petrukhin et al. 1993; Thomas et al. 1994) entnommen und in Datenbanken überprüft (2007; NCBI 2008). Die *ATP7B* flankierenden Mikrosatelliten wurden mit fluoreszenzmarkierten Primern wie weiter oben beschrieben amplifiziert. Die Amplifikate wurden zunächst per Elektrophorese auf Agarosegel nachgewiesen. Nach erfolgreicher Amplifikation wurden die Amplifikate im Verhältnis von 1:1 bis 1:40 mit H₂O verdünnt. Dabei wurde die Bandenstärke der Amplifikate auf dem Agarosegel als Anhaltspunkt für die Verdünnung genommen. Anschließend wurden 5 µl der Verdünnung, 15 µl Formamid und 0,5 µl Marker (GeneScan-500 Standard, Applied

Biosystems, New York, USA) gemischt und mittels Kapillargelelektrophorese (3130 Genetic Analyzer, Applied Biosystems, New York, USA) ausgewertet.

Denaturierende Hochleistungsflüssigkeitschromatographie

(DHPLC)

Prinzip der DHPLC

Die DHPLC ist eine Methode, die ein schnelles Mutations- bzw. Polymorphismus-Screening bei einer großen Anzahl von Proben erlaubt. Die Funktion der DHPLC beruht auf dem unterschiedlichen Schmelzverhalten von Homo- und Heteroduplices. Dabei handelt es sich um DNA-Doppelstränge, die entweder eine homologe Basenpaarfolge haben (Homoduplex) oder eine heterologe Basenpaarfolge (Heteroduplex). Solche Doppelstränge entstehen beim langsamen Abkühlen von denaturierter DNA. Liegen z.B. die zwei Allele Wildtyp (W) und Mutant (M) des interessierenden DNA-Abschnittes im Verhältnis 1:1 vor, bilden sich nach Denaturierung und Abkühlung (2 min bei 94°C, Abkühlung auf 10°C über 30 min; GeneAmp PCR System 9700) zum einen zwei Homoduplices (WW und MM) sowie zwei Heteroduplices (WM und MW). Bei homozygot veränderten Proben muss mit Wildtyp-DNA gepoolt werden, um eine Heterozygotie zu erreichen. Die DNA-Fragmente werden auf eine Säule übertragen, die aus einer hydrophoben, neutralen Polymermatrix aus Polystyren-Divinylbenzol besteht. Über das hydrophile Brückenmolekül TEAA (Triethylammonium-Kation) können sich die negativen Phosphatgruppen der DNA an die Säule anlagern. Die DNA-Fragmente werden durch die kontinuierliche steigende Acetonitrilkonzentration im Puffer eluiert. Aufgrund der unterschiedlichen Bindungskräfte der „passenden“ (Homoduplex) und „nicht passenden“ Stränge (Heteroduplex) ergeben sich bei partiell denaturierenden Bedingungen unterschiedliche Schmelzpunkte für Homo- und Heteroduplex. Daher sind die Heteroduplices bei einer grenzwertigen Temperatur teilweise denaturiert,

während die bindungsstärkeren Homoduplexe als Doppelstrang vorliegen. Die doppelsträngige DNA bindet stärker an die Säule als die Einzelstränge. Daher werden die Heteroduplexe vor den Homoduplexen abgespült. Die abgespülte DNA wird als Funktion der Zeit optisch bei 260 nm gemessen und als Chromatogramm dargestellt (Wave, Transgenomic LTD).

Die optimalen Temperaturen für die verschiedenen Exons des *ATP7B*-Gens wurden in Vorarbeiten von Weirich et al. (Weirich et al. 2002) ermittelt.

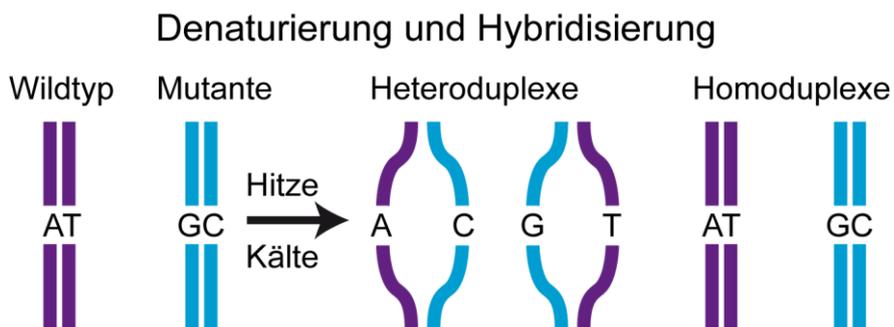


Abbildung 11: Denaturierung und Hybridisierung (angelehnt an Transgenomic, Inc.)

Auswertung der DHPLC

Zur Auswertung wurden die Chromatogramme analysiert. Sie zeigen bei einer Sequenzvariation im Idealfall vier *Peaks* (*Gipfel*) im Gegensatz zum Einzelpeak von homozygotem Material. In der Praxis zeigen Sequenzvariationen eher zwei bis drei *Peaks*. Bei nicht optimaler Temperatur kann ein Peak eine Schulter aufweisen, die entweder Folge einer Sequenzvariation oder einer Verunreinigung ist. In einem solchen Fall wurde die Temperatur erhöht, um näher an die grenzwertige Schmelztemperatur zu kommen.

Die Chromatogramme von Tumor, Urothel und Muskulatur je eines Falles wurden verglichen. Eine Sequenzvariation bringt auch ein spezifisches Elutionsprofil hervor. So kann man bei gleicher Signatur von verschiedenen Proben von der gleichen genetischen Veränderung ausgehen. Diese „Signatur“ kann also auch zur Suche nach einer bekannten Veränderung mit bekanntem Elutionsprofil verwendet werden.

Sequenzierung

Prinzip der zyklischen DNA-Sequenzierung

Die zyklische Sequenzierung kombiniert das Kettenabbruch- bzw.

Didesoxynucleotidverfahren nach Sanger und die PCR.

Der Begriff „Didesoxynucleotidverfahren“ beruht auf der Eigenschaft der Didesoxynucleotide (ddNTP), beim Einbau in eine Nucleotidsequenz für einen Strangabbruch zu sorgen, da die zur Kettenbildung notwendige OH-Gruppe am dritten C-Atom der Ribose fehlt (siehe Abbildung 12). Im Falle eines Desoxynucleotids (dNTP) wird diese 3'-OH-Gruppe zur Bildung einer Phosphodiesterbrücke mit der 5'-Phosphatgruppe des nächsten dNTPs genutzt.

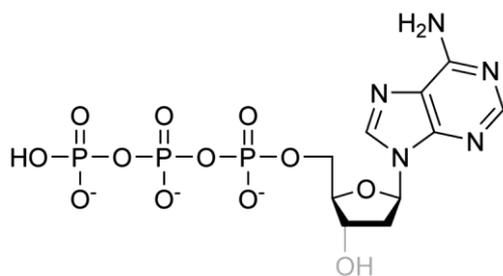


Abbildung 12: Dideoxyribonucleotid (ddATP).

Die im Vergleich zu dATP fehlende 3'-OH-Gruppe ist hellgrau angedeutet.

(modifiziert nach Wikimedia Commons 2011)

Diese Eigenschaft lässt sich zur Sequenzierung nutzen. Dazu muss die DNA, üblicherweise ein PCR-Amplifikat, zunächst in eine einzelsträngige Form, die Matrize, überführt werden. Dazu wird sie mit dem Sequenzierprimer hybridisiert. Der Primer ist ein Oligonukleotid, der nur zu einer Stelle der Matrize komplementär ist. Im Gegensatz zur PCR gibt es aber keinen „Rückwärtsprimer“ der zur Doppelstrangbildung nötig wäre.

Zur Kettenverlängerung benötigt man wie bei der PCR die vier Desoxynucleotide und die hitzestabile TAq-Polymerase zur Synthese. Zusätzlich konkurrieren aber auch die entsprechenden vier Didesoxynucleotide mit der Fähigkeit zum Strangabbruch um den Einbau in die neue Nucleotidsequenz. Wird statt eines dNTPs ein ddNTP eingebaut, kommt es zum Strangabbruch. Man erhält also viele Stränge unterschiedlicher Länge. Um diese darzustellen, sind die ddNTPs unterschiedlich und eindeutig fluoreszenzmarkiert. Werden die unterschiedlichen Fragmente per Kapillarelektrophorese der Größe nach aufgetrennt und mit einem Laserstrahl analysiert erhält man ein farbstoffspezifisches Intensitätsdiagramm (Abbildung 13), das die Reihenfolge der Basen widerspiegelt.

T C A A G

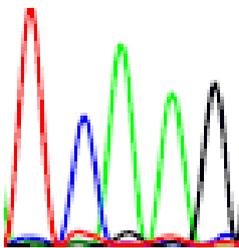


Abbildung 13: Sequenzdiagramm:

Die Farbe der *Peaks*

korreliert mit der entsprechenden Base.

So lässt sich aus den Farbintensitäten

direkt die zugehörige Sequenz ablesen.

Method

Die PCR-Produkte der interessanten Fälle wurden mittels des „QIAquick PCR Purification Kit“ (QIAGEN, Hilden, Deutschland) aufgereinigt.

Der Reaktionsansatz (ABI PRISM Big Dye Terminator, Applied Biosystems, New York, USA) zur Sequenzierung wurde auf Eis nach folgendem Protokoll pipettiert:

Big Dye Premix	4 µl
Big Dye Puffer	2 µl
Primer	0,25 µl
DNA-Template	4 -14 µl
Aqua dest.	ad 20 µl

Für jede Probe wurde die Sequenzierung sowohl mit dem Vorwärts- als auch dem Rückwärtsprimer ausgeführt.

Für die Sequenzierungsreaktion wurde der Thermocycler Primus 96 plus (MWG-Biotech AG, Ebersberg, Deutschland) verwendet. Dabei wurde folgendes Protokoll verwendet, wobei die Hybridisierungstemperatur je nach Primer variiert wurde:

Denaturierung: 96 °C für 1 Minuten

25x die folgende Schleife:

Denaturierung bei 96°C für 10 Sekunden

Hybridisierung bei 53°C für 5 Sekunden

Elongation bei 60°C für 240 Sekunden

Kühlung auf 10°C

Das Produkt der Sequenzierungsreaktion wurde mit dem „DyeEx 2.0 Spin Kit“ (QIAGEN, Hilden, Deutschland) gereinigt.

Anschließend wurden 5 µl des gereinigten Amplifikates und 15 µl Formamid in eine 96-Well-Platte gegeben und mittels Kapillargelelektrophorese (3130 Genetic Analyzer, Applied Biosystems, New York, USA) ausgewertet.

Da die Sequenzierergebnisse in der Nähe des Primers unzuverlässig sind, wurden -wie oben erwähnt- ein Vorwärts- und ein Rückwärtsprimer verwendet. In den beiden so erhaltenen Sequenzen ist jeweils die Primerregion des entgegengesetzten Primers zuverlässig dargestellt. Pro Probe erhält man also zwei Sequenzen, eine in Leserichtung sowie eine Antisense-Sequenz. Die Antisensesequenz enthält von rückwärts gelesen die komplementären Basen zu der Sequenz in Leserichtung.

Die beiden Intensitätsdiagramme einer Sequenzierung wurden mehrmals auf Mutationen sowie Fehler und Plausibilität überprüft, jeweils mit der entgegen gerichteten Sequenz als Kontrolle. Danach wurde Vorwärts- und Rückwärtssequenz zusammengeführt.

Die zusammengeführte Sequenz sowie beide Ursprungssequenzen wurde mit der Referenzsequenz mittels Nucleotide BLAST verglichen (NCBI 2009), um homozygote Sequenzvariationen zu erkennen. Dabei wurden folgende Einstellungen verwendet: Die „Query Sentence“ wurde direkt in die Maske kopiert, als „Search Set“ wurde „Human Genomic plus Transcript“ verwendet. Die Option „blastn“ wurde als Programm verwendet. Die Ergebnisse wurden übersichtshalber in neuen Fenstern dargestellt.

Statistische Planung und Methoden

Die Planung der Studie sowie die statistische Auswertung der erhobenen Daten erfolgte unter beratender Hilfestellung von Dr. Tibor Schuster, Institut für Medizinische Statistik und Epidemiologie, Klinikum rechts der Isar, der Technischen Universität München. Da zum Zeitpunkt der Studienplanung keine Daten in der Literatur zur vorliegenden Fragestellung existierten, war eine Fallzahlschätzung a priori nicht möglich. Aufgrund des daraus resultierenden explorativen Charakters der Arbeit wurde eine Fallzahl von 20 bis 30 Patienten angestrebt um reliable Schätzungen von Lage- und Streuungsmaßen interessierender Parameter zu erhalten, um somit die Planung nachfolgender konfirmatorischer Studien zu ermöglichen. Im Rahmen der deskriptiven Datenauswertung wurden für kategoriale Merkmale Kreuztabellen erstellt und absolute sowie relative Häufigkeiten angegeben. Quantitative Merkmale wurden mit Hilfe des Mittelwertes und der Standardabweichung bzw. mittels des Medians und dem Interquartilsbereich (25. bis 75. Verteilungsperzentile) beschrieben. Für explorative Vergleiche von Häufigkeitsverteilungen zwischen Therapie-Ansprechern und Nicht-Ansprechern kam, aufgrund der geringen Fallzahl, der exakte Test von Fisher zum Einsatz. Zweigruppenvergleiche hinsichtlich der Verteilung quantitativer Merkmale wurden mit dem Mann-Whitney U Test vorgenommen. Alle statistischen Auswertungen erfolgten zu einem zweiseitigen Signifikanzniveau von 5%. Eine Korrektur des globalen Fehlers erster Art bzw. von p-Werten für multiple Vergleiche wurde nicht vorgenommen, da es sich bei den vorgenommenen Tests um hypothesengenerierende Vergleichsuntersuchungen handelte, welche keine konfirmatorische Aussagekraft besitzen.

Ergebnisse

Patientengut

In der Auswertung des klinisch-radiologischen Materials zeigte sich, dass 11/17 Patienten der Kategorie „Progressive Disease“ (65%) zuzuordnen waren (inklusive ein Fall „early death from malignant disease“), sowie 6/17 Patienten der Kategorie „Partial Remission“ (35%) . In unserem Kollektiv gab es keine „Complete Remission“.

Fall 1	Progressive Disease
Fall 2	Progressive Disease
Fall 3	Progressive Disease
Fall 4	Partial Remission
Fall 5	Partial Remission
Fall 6	Progressive Disease
Fall 7	Progressive Disease
Fall 8	Partial Remission
Fall 9	Progressive Disease
Fall 10	Partial Remission
Fall 11	Partial Remission
Fall 12	Partial Remission
Fall 13	Early death from malignant disease
Fall 14	Progressive Disease
Fall 15	Progressive Disease
Fall 16	Progressive Disease
Fall 17	Progressive Disease

Tabelle 7: Ansprechen auf die Chemotherapie nach RECIST 1.0 Kriterien

DHPLC

Die Ergebnisse der DHPLC werden als Diagramm dargestellt, bei dem die Intensität als Funktion der Zeit aufgetragen wird. So ergibt sich ein Kurvenprofil. Wie weiter oben beschrieben, weisen zwei bis vier Gipfel auf eine heterozygote Situation hin, während ein Gipfel eine homozygote Situation wahrscheinlich macht (siehe Abbildung 14 und Abbildung 15).

Zur Auswertung wurden die Chromatogramme der Normalgewebe mit den jeweiligen Tumor- und Urothelgeweben verglichen. Bei mehreren Gipfeln (*Peaks*) im Normalgewebe kann man von einer heterozygoten Keimbahnsituation ausgehen. Haben dazugehöriges Urothel und Tumor dasselbe Elutionsprofil, so ist eine Neumutation im Tumor unwahrscheinlich.

Ist das Chromatogramm des zugehörigen Tumors dagegen eingipflig, so ist das ein Hinweis auf eine *LOH*-Situation.

Zeigt das Normalgewebe nur einen Gipfel, der Tumor dagegen mehrere, dann ist das ein Hinweis auf eine im Tumor erworbene Mutation.

In beiden oben beschriebenen Fällen wurden die jeweiligen Proben sequenziert.

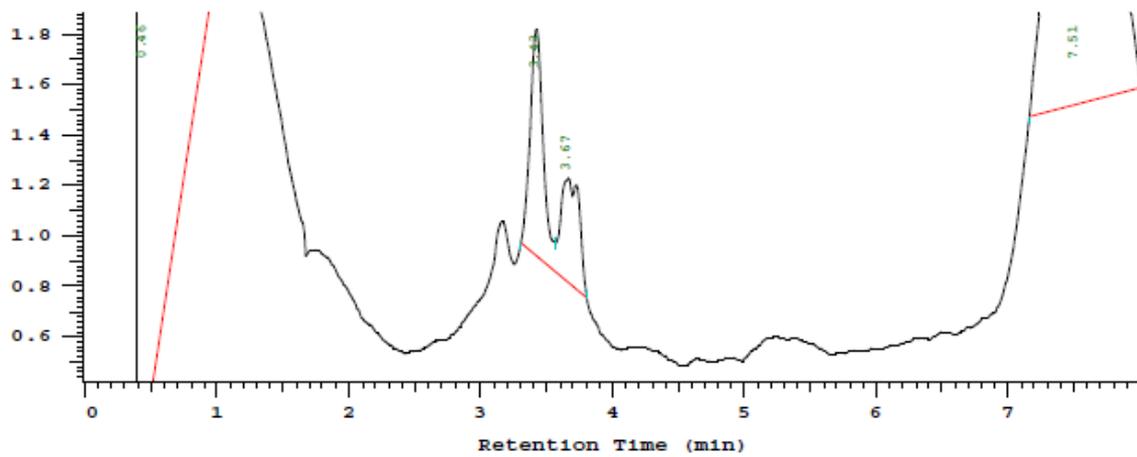


Abbildung 14: DHPLC-Chromatogramm (Fall 2 Normalgewebe).

Die Mehrspitzigkeit weist auf eine heterozygote Situation hin.

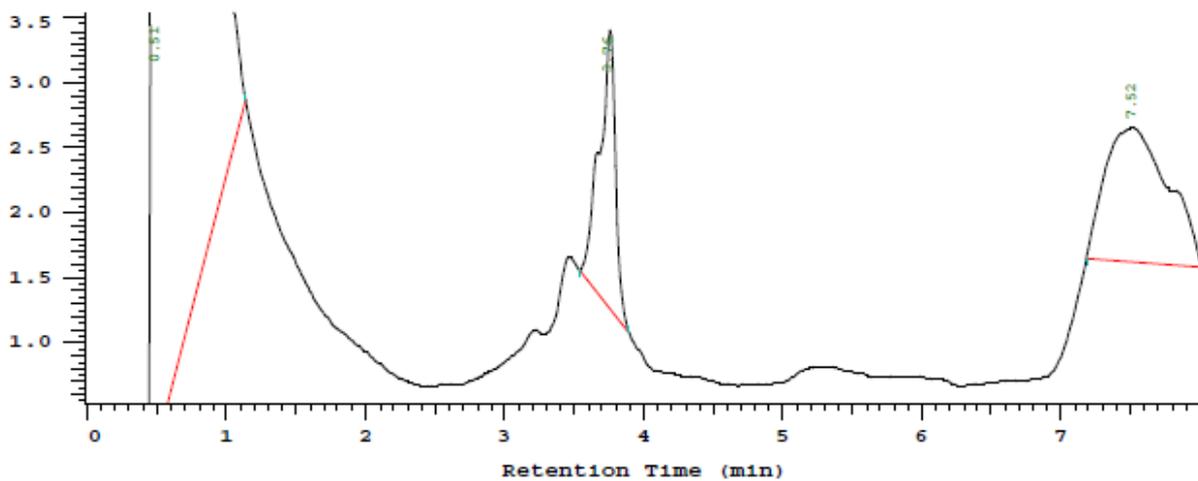


Abbildung 15: DHPLC-Chromatogramm (Fall 2 Tumor).

Die Eingipfligkeit weist im Vergleich zum Normalgewebe auf eine LOH-Situation hin.

Mikrosatellitenanalyse

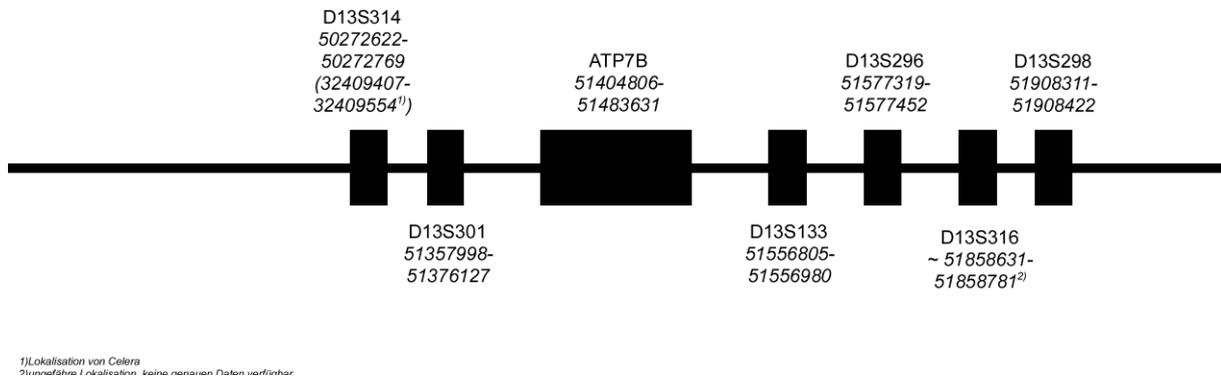


Abbildung 16: Mikrosatelliten um ATP7B. Unter der Bezeichnung des jeweiligen Mikrosatelliten ist die genaue Position auf Exon 13 angegeben.

Auswertung

Zur Auswertung wurden nur informative Marker herangezogen, das heißt polymorphe Marker. Dabei wurde der Quotient der Höhen der zwei *Peaks* des Normalgewebes (Muskulatur) als Referenz genommen und mit dem Quotienten im Tumorgewebe verglichen. Die Höhen der *Peaks* wurden durch die benutzte Software genau bestimmt und zur Auswertung verwendet. Eine relative Abnahme eines *Peaks* um mehr als 50% wurde als *LOH* gewertet. Die Abnahme eines *Peaks* um 30% bis 50% wurde nicht als *LOH* gewertet, in der Tabelle sind diese Fälle mit einem Stern (*) gekennzeichnet.

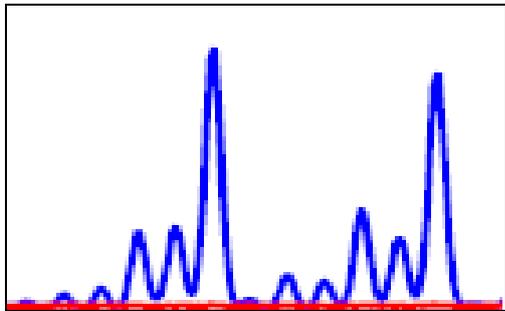
Durch Verunreinigung des Tumorgewebes mit Normalgewebe (wie zum Beispiel Bindegewebe) kommt es dazu, dass der Peak des verlorenen Allels nicht ganz verschwindet.

Wenn die folgende Bedingung erfüllt war, wurde eine *LOH*-Situation angenommen:

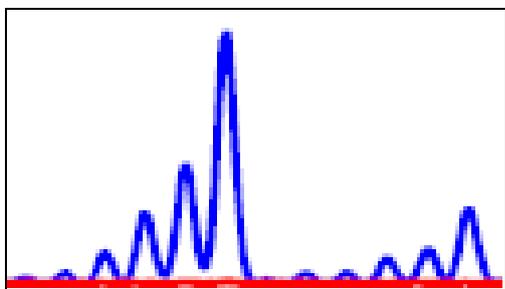
$$\frac{Peak1_{Tumor}}{Peak2_{Tumor}} \div \frac{Peak1_{Muskulatur}}{Peak2_{Muskulatur}} > 50\%$$

Dabei wurde eine *LOH* als „komplett“ beurteilt, wenn Marker zu beiden Seiten des Genlocus positiv waren, als „teilweise“, wenn nur Marker auf einer Seite des Genlocus positiv waren (Beckmann et al. 1996).

Beispielhaft ist hier ein Bandenverlust im Fall 9 von 67% zwischen Normalgewebe (Abbildung 17) und Tumorgewebe (Abbildung 18) dargestellt.



**Abbildung 17: Banden des Mikrosatelliten D13S297
im Normalgewebe (Fall 9)**



**Abbildung 18: Banden des Mikrosatelliten D13S297
im Tumorgewebe (Fall 9)**

Nach der wie oben beschriebenen Auswertung zeigte sich das folgende Ergebnis:

	<i>Mikrosatellitenanalyse</i>	<i>bestätigt durch DHPLC und Sequenzierung</i>	<i>Zusammenschau</i>
Fall 1	kompletter LOH	nicht konklusiv	kompletter LOH
Fall 2	kompletter LOH	ja	kompletter LOH
Fall 3	kein <i>LOH</i>	Hinweise auf <i>LOH</i>	teilweiser <i>LOH</i>
Fall 4	teilweiser LOH	nicht konklusiv	teilweiser LOH
Fall 5	teilweiser LOH	ja	teilweiser LOH
Fall 6	keine LOH	nicht konklusiv	kein LOH
Fall 7	teilweiser LOH	nicht konklusiv	teilweiser LOH
Fall 8	teilweiser LOH	nicht konklusiv	teilweiser LOH
Fall 9	teilweiser LOH	ja	teilweiser LOH
Fall 10	teilweiser LOH	nicht konklusiv	teilweiser LOH
Fall 11	kein LOH	Hinweise auf <i>LOH</i>	teilweiser LOH
Fall 12	teilweiser LOH	ja	teilweiser LOH
Fall 13	kein LOH	nicht konklusiv	kein LOH
Fall 14	kein LOH	nicht konklusiv	kein LOH
Fall 15	kompletter LOH	nicht konklusiv	kompletter LOH
Fall 16	teilweiser LOH	ja	teilweiser LOH
Fall 17	kein LOH	Hinweise auf <i>LOH</i>	teilweiser LOH

Tabelle 8: Ergebnisse der Mikrosatellitenanalyse

Zusammenschau von Mikrosatellitenanalyse und DHPLC bezüglich LOH-Situation

Die DHPLC konnte die *LOH*-Situation für die Fälle 2, 5,9,12,16 bestätigen (siehe Tabelle 8).

Für die Fälle 4,7,8,10,15 konnte die *LOH*-Situation nicht bestätigt werden. Dies spricht

allerdings nicht gegen eine *LOH*-Situation in diesen Fällen, da die DHPLC nur bei heterozygoten Proben eine *LOH*-Situation detektieren kann. In Tabelle 12 zeigt sich, dass diese homozygote Form bei allen Proben vorgelegen hat, die nicht durch DHPLC bestätigt wurden.

Interessant ist die Beobachtung, dass die DHPLC Hinweise auf eine *LOH*-Situation z.B. im Fall 11 gibt, der in der Mikrosatellitenanalyse unauffällig war.

Dies kann zum Beispiel bei einer *LOH*-Situation vorliegen im Sinne einer Mikrodeletion, die nur im Gen selber oder der nächsten Nachbarschaft auftritt, so dass die umliegenden Mikrosatelliten nicht betroffen sind.

Auch in der Sequenzierung des Exons 13 von Fall 11 kommt es zum Verlust der im Muskel heterozygot vorliegenden Sequenzvariation P5, eine Tatsache, die für ein *LOH* spricht.

Das Gesagte gilt auch für Fall 3 und Fall 17, wo zumindest in bestimmten Genabschnitten (Fall 3: Exon 8; Fall 17: Exon 15) von *LOH*-Situationen ausgegangen werden muss.

Daher wurden Fall 3, 11 und 17 als teilweise *LOH*-Situation gewertet.

Im Ergebnis zeigt sich also, dass bei 3 Patienten komplette, langstreckige *LOH*-Situationen nachgewiesen werden konnten; bei 11 Patienten zumindest teilweise, kurzstreckigere *LOH*-Situationen. Bei 3/17 Patienten konnte keine *LOH*-Situation nachgewiesen werden.

In der folgenden Tabelle sind die Ergebnisse des Mikrosatellitenanalyse detailliert dargestellt.

Mikrosatelliten	296	298	301	314	316	297	133
Fall 1 Tumor	*	neg.	-52%	neg.	neg.	neg.	-79%
Fall 1 Urothel	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
Fall 2 Tumor	-58%	-67%	neg.	-100%	neg.	-68%	-90%
Fall 2 Urothel	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
Fall 3 Tumor	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
Fall 3 Urothel	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
Fall 4 Tumor	-54%	-53%	*	neg.	neg.	*	*
Fall 4 Urothel	*	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
Fall 5 Tumor	neg.	neg.	neg.	neg.	*	neg.	neg.
Fall 5 Urothel	neg.	neg.	neg.	neg.	+60%	neg.	-100%
Fall 6 Tumor	2p			2p			2p
Fall 7 Tumor	neg.	neg.	neg.	neg.	-82%	neg.	neg.
Fall 7 Urothel	neg.	neg.	MSI	neg.	neg.	neg.	neg.
Fall 8 Tumor	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
Fall 8 Urothel	neg.	neg.	neg.	-83%	neg.	neg.	neg.
Fall 9 Tumor	*	neg.	*	neg.	neg.	-67%	neg.
Fall 9 Urothel	neg.	neg.	*	neg.	neg.	-20%	neg.
Fall 10 Tumor	neg.	neg.	+70%	-56%	neg.	neg.	neg.
Fall 10 Urothel	neg.	neg.	+65%	neg.	neg.	neg.	neg.
Fall 11 Tumor	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
Fall 11 Urothel	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
Fall 12 Tumor	-82%	*	neg.	neg.	-58%	-100%	-90%
Fall 12 Urothel	neg.	neg.	neg.	neg.	>-50%	neg.	neg.
Fall 13 Tumor	*	neg.	neg.	*	neg.	neg.	neg.
Fall 13 Urothel	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.

Fall 14 Tumor	neg.	*	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
Fall 14 Urothel	neg.						
Fall 15 Tumor	-75%	neg.	-84%	-61%	neg.	-59%	-72%
Fall 15 Urothel	neg.						
Fall 16 Tumor	neg.	neg.	*	neg.	neg.	neg.	neg.
Fall 16 Urothel	neg.	neg.	-58%	neg.	neg.	neg.	neg.
Fall 17 Tumor	neg.						
Fall 17 Urothel	neg.						

Tabelle 9: Ergebnisse der Mikrosatellitenanalyse.

Legende: "neg." -- <30%; "*" -- 30% - 50% Peakverlust;

hellgrau: LOH; dunkelgrau: LOH 3' und 5' des Gens; 2p: Zwei Peaks

MSI: Hinweise auf Mikrosatelliteninstabilität im Sinne einer Amplifikation

Sequenzierung

Mutationen und Sequenzvariationen

In der Sequenzierung wurden 12 Mutationen sowie 20 Sequenzvariationen gefunden.

Bis auf die Mutation M11 trat jede Mutation pro Fall nur einmal auf.

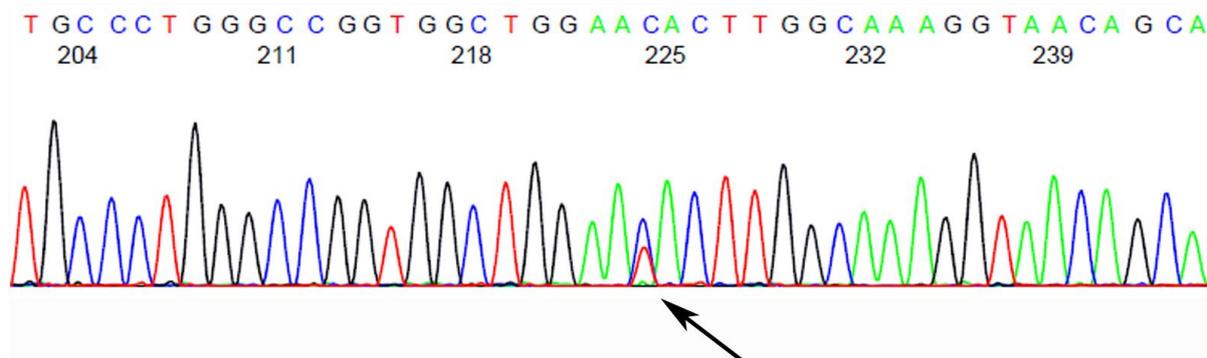


Abbildung 19: Darstellung der Mutation M1 (Fall 16).

An der Position 2344 (siehe Pfeil) sieht man den Doppelgipfel als Ausdruck der Mutation.

In Abbildung 19 ist beispielhaft die heterozygot vorliegende Mutation M1 aus Fall 16 dargestellt. Bei homozygoten Mutanten gelingt die Mutationsdetektion durch den Sequenzvergleich mit der Referenzsequenz.

In Tabelle 10 und Tabelle 11 sind die gefundenen Abweichungen von der Referenzsequenz in der Form $(cDNA\ Position)(Nukleotid_{Referenz}) > (Nukleotid_{Fall})$ dargestellt.

Als Mutation wurden dabei Missense-Mutationen bezeichnet, die zu einer Veränderung der Aminosäurefolge im Protein führen.

Dies wurde in der Form $(Aminosäure_{Referenz}) (Position) (Aminosäure_{Fall})$ dargestellt.

Als Sequenzvariation wurden alle nicht-kodierenden Punktmutationen (Non-Coding-Mutations) bezeichnet, die eine Veränderung der Basenfolge ohne Auswirkung auf die Aminosäurefolge im Protein bewirken. Im Intronbereich gefundene Veränderungen wurden mit (Intron) bezeichnet und der Abstand von der Exongrenze angegeben.

Mutation (M)	Referenz #	Lokalisation Tertiärstruktur	Minimum Allele Frequency
2344C>T H782Y	1	Transmembran Helix	5,9%
2870C>T P957L	2	Extrazelluläre Domäne	5,9%
3017G>A G1005D	3	Cytoplasmatische Domäne	5,9%
2932G>A V978M	4	Transmembran Helix	5,9%
3214G>A G1072S	5	Cytoplasmatische Domäne	5,9%
3122G>A R1041Q	6	Cytoplasmatische Domäne	5,9%
3369C>T A1124V	7	Cytoplasmatische Domäne	5,9%
3281G>A C1100Y	8	Cytoplasmatische Domäne	5,9%
3299G>A C1160Y	9	Cytoplasmatische Domäne	5,9%
3294C>T P1098S	10	Cytoplasmatische Domäne	5,9%
3419T>C V1140A	11	Cytoplasmatische Domäne	29,4%
3604G>A A1202T	12	Cytoplasmatische Domäne	5,9%

Tabelle 10: Mutationen mit zugehörigen Aminosäureaustausch.

Die Lokalisation innerhalb der Tertiärstruktur wurde Uniprot (UniProt 2010) entnommen.

Sequenzvariation (P)	Referenz #	Minimum Allele Frequency
2175 G>A (R->R)	1	5,9%
2338 C>T (L->L)	2	5,9%
2973G>A (T->T)	3	11,8%
3009G>A (A->A)	4	5,9%
2904C>T (I->I)	5	5,9%
3036C>T (K->K)	6	5,9%
2976C>T (P->P)	7	5,9%
2946C>T (A->A)	8	5,9%
3129C>T (L->L)	9	5,9%
3243+5G>A (Intron)	10	5,9%
3243+12G>A (Intron)	11	5,9%
3244-20C>T (Intron)	12	5,9%
3244-24C>T (Intron)	13	5,9%
3354C>T (R->R)	14	5,9%
3700+23C>T (Intron)	15	5,9%
3557-31G>A (Intron)	16	5,9%
3612G>A (L->L)	17	5,9%
3675G>A (K->K)	18	5,9%
3597G>A (K->K)	19	5,9%
4124+55C>T (Intron)	20	5,9%

Tabelle 11: Sequenzvariationen ohne Einfluss auf die Aminosäurefolge (Non-Coding-Mutations)

Verteilung auf die Fälle

Die Veränderungen in Tumor und Normalgeweben verteilten sich auf die Fälle wie folgt:

Fall 1	x
Fall 2	P 3, 4, 9, 12, 15, 16, 20; M 7,11
Fall 3	P1 ; M11
Fall 4	x
Fall 5	P 2,3,17; M 2
Fall 6	M 11
Fall 7	x
Fall 8	x
Fall 9	P18,19; M 3,4,8,11,12
Fall 10	x
Fall 11	P5
Fall 12	P 6,10,13; M 5,9,11
Fall 13	x
Fall 14	x
Fall 15	x
Fall 16	P7,8,11; M1,6,11
Fall 17	P14; M10

Tabelle 12: Fallbezogene Darstellung von Mutationen und Sequenzvariationen in Tumor- und Normalgewebe.

Legende: P- Sequenzvariation; M – Mutation; X- keine Mutation/Sequenzveränderung nachweisbar

Dabei zeigt sich, dass in einigen Fällen mehrere *ATP7B*-Genveränderungen vorliegen, während andere Fälle keine Abweichungen von der Referenzsequenz zeigen.

In der folgenden Tabelle 13 sind die Veränderungen auf die verschiedenen Gewebe bezogen dargestellt.

Fall Nr.	Normalgewebe (Muskulatur)	Tumor	Urothel
Fall 1	*	*	*
Fall 2	M7, 11; P 3, 4,12,16, 20	M11; P 3, 4, 9, 15	*
Fall 3	M11; P1	M11	*
Fall 4	*	*	*
Fall 5	P2, 3	M2; P3	P17
Fall 6	*	M11	*
Fall 7	*	*	*
Fall 8	*	*	*
Fall 9	M3, 4, 11, 12; P19	M8, 11; P18	*
Fall 10	*	*	*
Fall 11	P5	*	*
Fall 12	M9, 11	P6, 13	M5; P10
Fall 13	*	*	*
Fall 14	*	*	*
Fall 15	*	*	*
Fall 16	M1, 11; P7, 8	M11	M6, P11
Fall 17	M10; P14	*	*

Tabelle 13: Gewebebezogene Darstellung von Mutationen und Sequenzvariationen.

Legende: P- Sequenzvariation; M - Mutation; * - Keine Sequenzänderungen

8 der 17 Fälle weisen im Normalgewebe Veränderungen auf. Auffällig sind die Veränderungen im Urothel, die weder in Tumor noch im Normalgewebe auftreten.

Vergleich von Mutationen in Tumorgewebe, morphologisch normalem Urothel und morphologisch normaler glatter Muskulatur der Blasenwand

In Fall 2 lässt sich im Exon 13 in Tumor und Muskulatur (Normalgewebe) die Sequenzvariationen P3, P4 nachweisen.

In den Intensitätsdiagrammen der Sequenzierung zeigt sich, dass in der Muskulatur die *Peaks* der Veränderungen annähernd gleich hoch (1:1) sind. Daraus kann man auf das Verhältnis der Zellmengen schließen. In diesem Fall tragen ca. 50% der Zellen im Normalgewebe die Veränderung.

In den Intensitätsdiagrammen des Tumors hat sich dieses Verhältnis allerdings verändert auf <1:2 bzw. 2:1, also weniger als 25%.

Insofern liegt am wahrscheinlichsten eine Verunreinigung mit DNA des Bindegewebes vor, dass noch zu einem geringen Teil im Tumor vorhanden ist. Möglich, aber unwahrscheinlicher ist, dass nur eine gewisse Fraktion der Tumorzellen homo- bzw. heterozygot ist.

Daher ist es am wahrscheinlichsten, dass im Tumor die Sequenzvariation P3 verloren ist, während P4 hemizygot vorliegt, entsprechend den hohen Peaks in den Intensitätsdiagrammen.

Dies spricht für die Annahme der *LOH*-Situation.

In den weiteren Exons bestätigt sich das Bild einer *LOH*-Situation: In Exon 15 verliert der Tumor im Vergleich zum Normalgewebe die heterozygot vorliegende Mutation M7 und die Variation P12, im Exon 16 geht die Wildtypallel verloren, so dass M11 hemizygot vorliegt. In Exon 17 geht im Tumor die Variation P16 verloren, ebenso in Exon 20 die Variation P20.

Im Exon 14 von Fall 2 ist im Tumorgewebe die Sequenzvariation P9 heterozygot nachweisbar, aber nicht in der Muskulatur. Im Intensitätsdiagramm ist der Peak der Variation

im Vergleich zum Wildtyp-*Peak* erniedrigt. Im Unterschied zu P3, P4 liegt diese Variation nicht im Normalgewebe vor.

Daher handelt es sich im Fall von P9 und den folgenden vermutlich um eine heterogene Population von Tumorzellen, in der ein kleiner Teil der Zellen diese Variation erworben hat. Ein ähnliches Bild liegt im Exon 17 vor: Ein kleiner Teil der Tumorzellen trägt die neu erworbene Variation P15.

Im Fall 3 zeigt sich in Exon 8 im Tumor der Verlust der heterozygoten Variation P1 im Vergleich zum Normalgewebe. Die Mutation M11 lässt sich im Normalgewebe homozygot als auch im Tumor hemizygot nachweisen.

Im Fall 5 geht in Exon 8 im Tumor die Sequenzvariation P2 verloren. In Exon 13 gewinnt der Tumor im Vergleich zum Normalgewebe die Mutation M2. Im zugehörigen Urothel liegt keine dieser Veränderungen vor, dafür aber die Sequenzvariation P17.

In Fall 9 zeichnet sich der Tumor durch vergleichsweise große Unterschiedlichkeit zum Normalgewebe aus. Während sich im Normalgewebe M4, M11, M12 und P19 finden, lässt sich im Tumor nur M11 wiederfinden. Zusätzlich lassen sich neu M8 und P18 im Tumor nachweisen.

Das dazugehörige Urothel teilt nur M11 mit Tumor und Normalgewebe, zusätzlich zeigt es die Mutation M3, die im Normalgewebe nicht vorkommt.

In diesem Fall stellt sich die Frage, ob das morphologisch normal erscheinende Urothel schon genetische Veränderungen erfahren hat, die keine Auswirkung auf die Zellmorphologie haben. Für diese Hypothese spricht das Ergebnis der Mikrosatellitenanalyse des Urothels, die Auffälligkeiten im Sinne grenzwertiger Veränderungen zeigt.

Im Fall 11 ist im Normalgewebe P5 vorhanden und im Tumor nicht nachweisbar.

Fall 12 ist wiederum heterogen: In Exon 13 tritt im Tumor P6 neu auf. In Exon 14 kommen die Veränderungen M5 und P10 vor, die weder im Tumor noch im Normalgewebe vorhanden sind. In Exon 15 gewinnt der Tumor die Variation P13 während er die Mutation M9 verliert. Im Exon 16 kommt es im Tumor zum Verlust der Mutation M11. Ähnlich wie in Fall 5 zeigt das Urothel keine der Veränderungen von Tumor oder Muskulatur, hier zeigt sich die Mutation M5 und die Sequenzvariation P10.

Im Fall 16 zeigt sich in Exon 8 und 13 der Verlust von M1 respektive P7, P8 im Tumor. Im Exon 14 gewinnt das Urothel M6 und P11. Interessanterweise ist in Exon 16 die Sequenzvariation M11 sowohl im Normalgewebe als auch im Tumor heterozygot vorhanden. In der Mikrosatellitenanalyse des Falles ist der Mikrosatellit D13S301 auffällig, der in 3'-Richtung des Genes liegt. Möglicherweise endet eine teilweise *LOH*-Situation zwischen Exon 13 und 16, was die widersprüchliche Konstellation zwischen Exon 8 und 13 auf der einen Seite und Exon 16 auf der anderen Seite erklären würde.

Im Fall 17 geht im Exon 15 die Mutation M10 und die Variation *P14* im Tumor im Vergleich zum Normalgewebe verloren.

Bei der Analyse der *LOH*-Situationen fällt auf, dass bis auf eine Ausnahme der Allelverlust zugunsten der Referenzsequenz ausfällt. Damit ist gemeint, dass das Variationen/Mutationen tragende Allel verloren geht. Die Ausnahme ist Fall 2 im Exon 16 mit der Mutation M11, die im Normalgewebe heterozygot ist, im Tumor aber hemizygot.

Vergleich mit bekannten genetischen Veränderungen

Die Mutationen wurden mit der Wilson Disease Database sowie der *ATP7B*-Mutation Database abgeglichen. (Cox 2007; umd.be 2009)

Der Großteil der in dieser Arbeit entdeckten Mutationen und Sequenzvariationen sind nach bestem Wissen des Autors bisher nicht beschrieben.

Sowohl an der Position M6 als auch an M11 sind für den Morbus Wilson *ATP7B*-Mutationen bekannt.

Im Gegensatz zu der bekannten Mutation an der Position von M6, bei der das Arginin durch Prolin ersetzt wird, ist in unserem Fall das Arginin durch Glutamin ersetzt. Die bekannte Mutation wird als krankheitsverursachend eingeschätzt.

Die Mutation an der Stelle M11 ist identisch mit der bekannten Veränderung, sie wird bis auf eine Ausnahme als nicht krankheitsverursachend angesehen. Daher ist die Veränderung M11 als Polymorphismus zu werten

Die Sequenzvariationen P1, P3, P4, P6, P7 sind in der Wilson Disease Database bekannt und werden als „silent“ eingeschätzt. Die anderen Varianten sind nicht beschrieben.

Statistische Auswertung

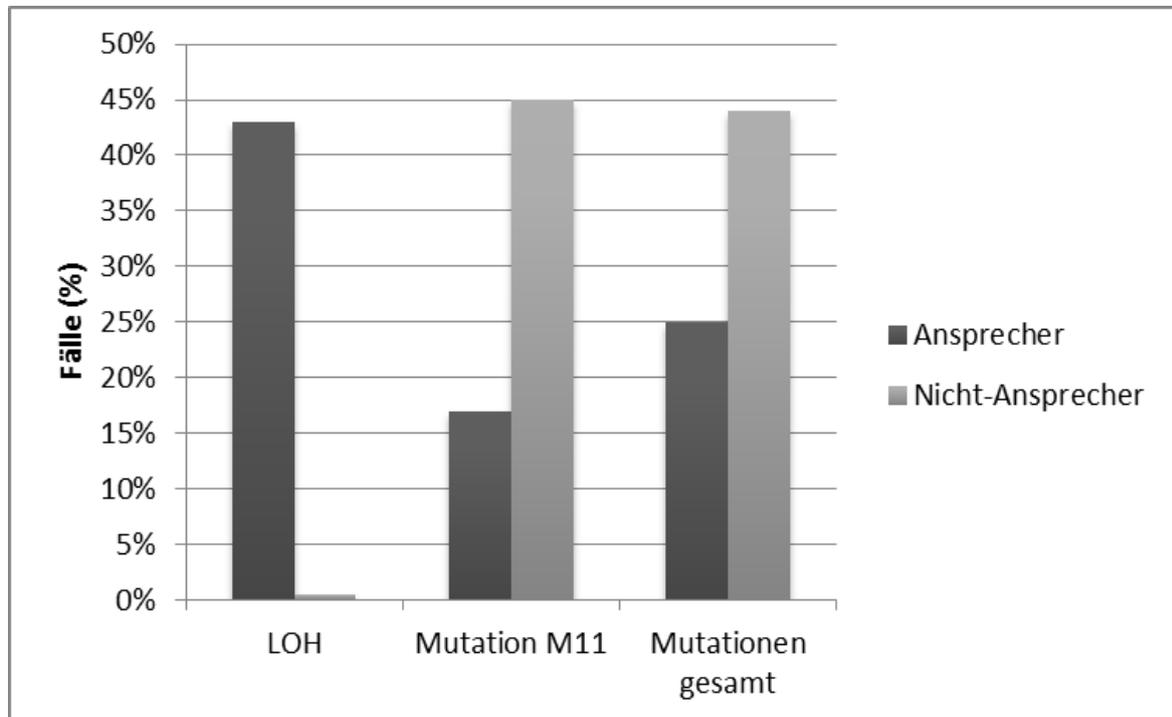


Abbildung 20: Graphische Darstellung von Tabelle 14

Parameter	Nicht-Ansprecher	Ansprecher	p-value (Fisher's exact test)
Loss of heterozygosity	0%	43%	0,515
Mutation M11	45%	17%	0,333
Mutationen gesamt	44%	25%	0,620

Tabelle 14: Signifikanzniveau und Ansprechraten beim Vorliegen von LOH bzw. Mutationen.

In Abbildung 20 und in Tabelle 14 ist die Verteilung von Ansprechern und Nicht-Ansprechern beim Vorliegen von LOH bzw. Mutationen dargestellt. Es zeigt sich eine statistisch nicht-signifikante Tendenz zu einem höheren Anteil von Ansprechern in der Gruppe mit einem LOH (43% Ansprecher vs. 0% Nicht-Ansprecher). In der Gruppe der

Mutationen bzw. beim Vorliegen von M11 ließ sich ein höherer Anteil von Nicht-Ansprechern finden (25% Ansprecher vs. 44% Nichtansprecher bzw. 17% Ansprecher vs. 45% Ansprecher für M11). Auch diese Tendenz war statistisch nicht signifikant.

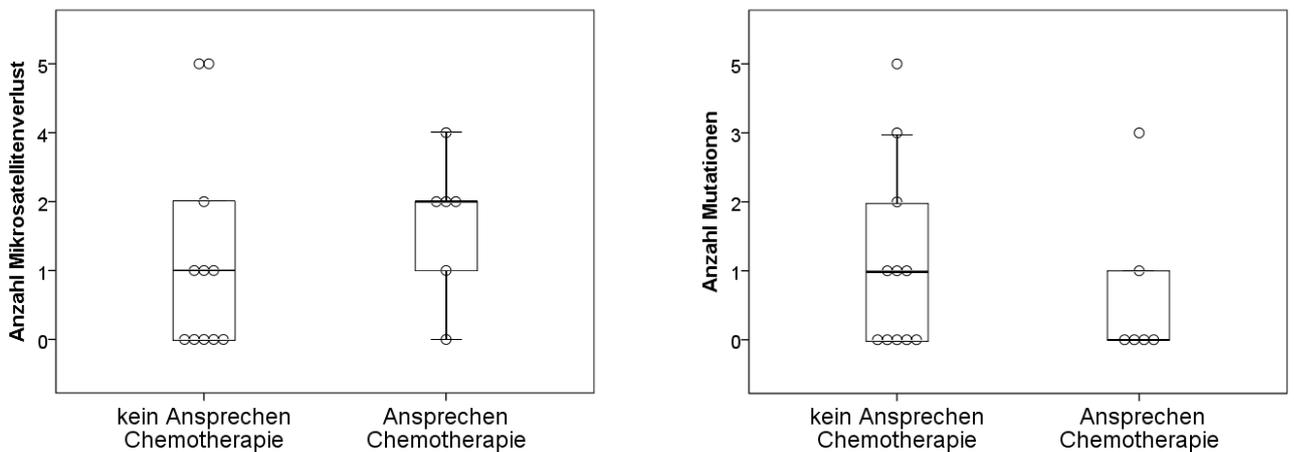


Abbildung 21: Vergleich der Ansprechraten in Bezug auf die Summenmerkmale in einer kombinierten Punkt/Box Plot Darstellung (siehe Tabelle 15).

Summenmerkmale	Asympt. Signifikanz (2-seitig)	Exakte Signifikanz
Anzahl Mikrosatellitenverlust	0,274	0,301
Anzahl Mutationen	0,443	0,525

Tabelle 15: Statistische Signifikanz der Summenmerkmale.

In Abbildung 21 und Tabelle 15 ist die Auswertung der Summenmerkmale „Anzahl von Mikrosatellitenverlusten“ und „Anzahl von Mutationen“ dargestellt. In der Gruppe der Ansprecher zeigte sich eine statistisch nicht-signifikante Tendenz zu einer höheren Anzahl an Mikrosatellitenverlusten (Median 2,0 vs. 1,0 bei Ansprechern vs. Nicht-Ansprecher). Bezüglich der Anzahl der Mutationen zeigte sich eine höhere Anzahl von Mutationen bei den Nicht-Ansprechern im Vergleich zu den Ansprechern (Median 0,0 vs. 1,0 bei Ansprechern vs. Nicht-Ansprecher). Auch diese Tendenz war statistisch nicht signifikant.

Diskussion

ATP7B und urotheliale Karzinome

Beim Menschen ist das Blasenkarzinom sowohl von der Häufigkeit als auch vom volkswirtschaftlichen Aspekt ein bedeutender Tumor.

In der Therapie dieses Krebses wurden zunächst große chirurgische Fortschritte durch Einführung endoskopischer Resektionsmethoden Anfang des 20. Jahrhunderts erzielt sowie durch die Entwicklung funktionierender, kontinenter Harnableitungen wie der Neoblase Ende der 1980er. In dieser Zeit wurde die systemische Chemotherapie entwickelt und verbessert. Dennoch haben fortgeschrittene Blasentumore eine schlechte Prognose. In der Anwendung der Chemotherapie spricht nur ein gewisser Teil der Patienten auf die Behandlung an, zusätzlich entwickelt sich häufig eine Resistenz des Tumors gegen die Chemotherapeutika. Dadurch kann nur einem Teil der Patienten geholfen werden, während der andere Teil unter den Nebenwirkungen und Komplikationen leiden muss, ohne dass es zum gewünschten therapeutischen Effekt kommt. Dieser Effekt beruht auf der Verschiedenartigkeit von sowohl Patient als auch Tumor.

Diese individuellen Unterschiede sollten ein zentrales Kriterium zur Therapiewahl sein.

Daher ist es notwendig, die zur Verfügung stehenden Mittel differenziert anzuwenden.

Im Sinne der „Targeted Therapy“ bedeutet dies, Methoden zu entwickeln, die den Therapieerfolg des einzelnen Patienten voraussagen. Dazu gehören einerseits klinische Prognosesysteme wie Nomogramme, die das TNM-System um andere Parameter wie Alter etc. erweitern (Karakiewicz et al. 2006).

Andererseits können molekularbiologische Methoden Aufschluss über den Therapienutzen geben.

Bei Magen- und kolorektalen Karzinomen wird der Mutationsstatus des *KRAS*-Gens vor Beginn der Therapie mit monoklonalen Antikörpern (z.B. Cetuximab) gegen EGFR (Endothelial Growth Factor Receptor) überprüft. Nur bei Vorliegen des *KRAS*-Wildtyps kann von einem Nutzen der Cetuximab-Therapie ausgegangen werden (Saridaki et al.). Ähnliches gilt für den Rezeptorstatus beim Brustkrebs: Immunhistochemisch wird die Expression der Östrogen-, Progesteron- und HER2-Rezeptoren überprüft.

Bei Überexpression wird mit Antikörpern therapiert, die gegen diese Rezeptoren gerichtet sind, wie z.B. Trastuzumab gegen den HER2/neu Rezeptor, der zur EGFR-Familie gehört. Weitere Beispiele sind *c-Kit* Mutationen beim GIST und die *BCR-ABL*-Translokation bei der CML, die prädiktiv für den Therapieerfolg mit Tyrosinkinaseinhibitoren wie Imatinib sind, sowie der CD20 Status bei B-Zell-Lymphomen im Zusammenhang mit Rituximab-Therapie.

Diese „Targeted Therapies“ unterscheiden sich grundlegend von der konventionellen Chemotherapie. Während klassische Chemotherapeutika wie Alkylantien und Spindelgifte oft eher zufällig entdeckt wurden und empirisch benutzt wurden, sind die Target-Moleküle gezielt in Kenntnis der zellulären Signalwege entwickelt worden. Daher ist der Wirkmechanismus z.B. eines Rezeptorantagonisten gut verstanden, dieses Wissen kann zur Voraussage des Therapieerfolgs benutzt werden. Die Funktionsweise von Cisplatin dagegen ist komplex und nur teilweise verstanden. Dies ist einer der Gründe warum es bisher bei vielen Chemotherapeutika nicht möglich ist, die Wahrscheinlichkeit des Therapieerfolgs vorherzusagen. Dies gilt auch für Cisplatin. Sowohl die intrinsische als auch die erworbene Resistenz von Tumoren gegen Cisplatin stellt ein großes Problem der Therapie dar und limitiert die Wirkung. Daher wurden verschiedene Versuche unternommen, um die Mechanismen der Cisplatinresistenz zu verstehen und diagnostische bzw. therapeutische Antworten darauf zu entwickeln. Während die meisten Untersuchungen von Cisplatinresistenz und Kupfertransportern *in vitro* an Zellkulturen durchgeführt wurden, war

es das Anliegen dieser Arbeit, *ATP7B* an Patientenmaterial zu untersuchen. Dazu wurden formalinfixierte Präparate von Tumoren untersucht, die im Rahmen von Operationen gewonnen wurden. Damit unterscheidet sich die Arbeit grundsätzlich von *in-vitro*-Experimenten. Im Gegensatz zur standardisierten Umgebung im Labor gibt es bei der Untersuchung von Patientenmaterial praktische Besonderheiten. So ist es schwierig, das Ansprechen zu objektivieren. Deshalb wurden einheitliche Responsekriterien entwickelt, wesentlich sind dabei zum Beispiel die RECIST-Kriterien 1.0 (Therasse, Arbuck et al. 2000). Doch auch diese Kriterien sind nur ein grobes Maß für das Ansprechen oder Nichtansprechen eines Patienten, da relativ große Markerläsionen sowie eine deutliche Zu- und Abnahme der Läsionen benötigt werden.

Bei Untersuchungen an Patientenmaterial sind Störgrößen höher als zum Beispiel im Knock-Out Experiment mit Mäusen, bei dem bei bekannter genetischer Ausstattung ein ganzes Gen gezielt ausgeschaltet wird und die Auswirkungen untersucht werden. Beim Menschen und insbesondere bei menschlichen Tumoren liegt dagegen eine Mischung aus molekularen Veränderungen (z.B. Mutationen) und strukturellen Veränderungen (z.B. *LOH*) vor. Dadurch können einerseits kleine Effekte in der Summation mehrerer genetischer Ereignisse unterdrückt werden. Auf der anderen Seite sind die Effekte, die unter lebensnahen Bedingungen in einer potentiellen Summationssituation („Rauschen“) beobachtet werden können, d.h. trotzdem an der Oberfläche erscheinen, auch mit höherer Wahrscheinlichkeit bedeutsam.

Beim Morbus Wilson zeigt sich, dass einzelne Mutationen für einen Funktionsverlust von *ATP7B* ausreichen, wenn beide Allele betroffen sind. Heterozygote Veränderungen liegen auch in der gesunden Bevölkerung häufiger vor. Daher wurden die Exons untersucht, in denen bei Kaukasiern außerhalb des Mittelmeerraums am häufigsten Mutationen gefunden werden.

Entdeckte Mutationen können mit beim Morbus Wilson bekannten Mutationen abgeglichen werden. Dies lässt Rückschlüsse auf die Relevanz der Mutationen zu, insbesondere ob sie inaktivierend wirken. Durch das Zusammenspiel von heterozygot vorliegender aktivierender/inaktivierender Mutation und Verlust eines Allels/*LOH* im Rahmen der Tumorentwicklung kann es wie in Abbildung 22 dargestellt zum Löschen einer aktivierenden Mutation kommen (und umgekehrt) und damit bei der gleichen genetischen Grundausstattung entweder zu einem resistenten oder zu einem sensiblen Phänotyp führen.

Falls dieses Modell zutrifft, sollten Patienten mit Morbus Wilson in wesentlich geringerem Ausmaß primäre Resistenz gegen cisplatinhaltige Chemotherapie zeigen als andere Patientengruppen. In der Literatur gibt es allerdings nach Wissen des Autors keine Untersuchungen, die sich mit dem Ansprechen von Cisplatin bei Wilson-Patienten beschäftigen.

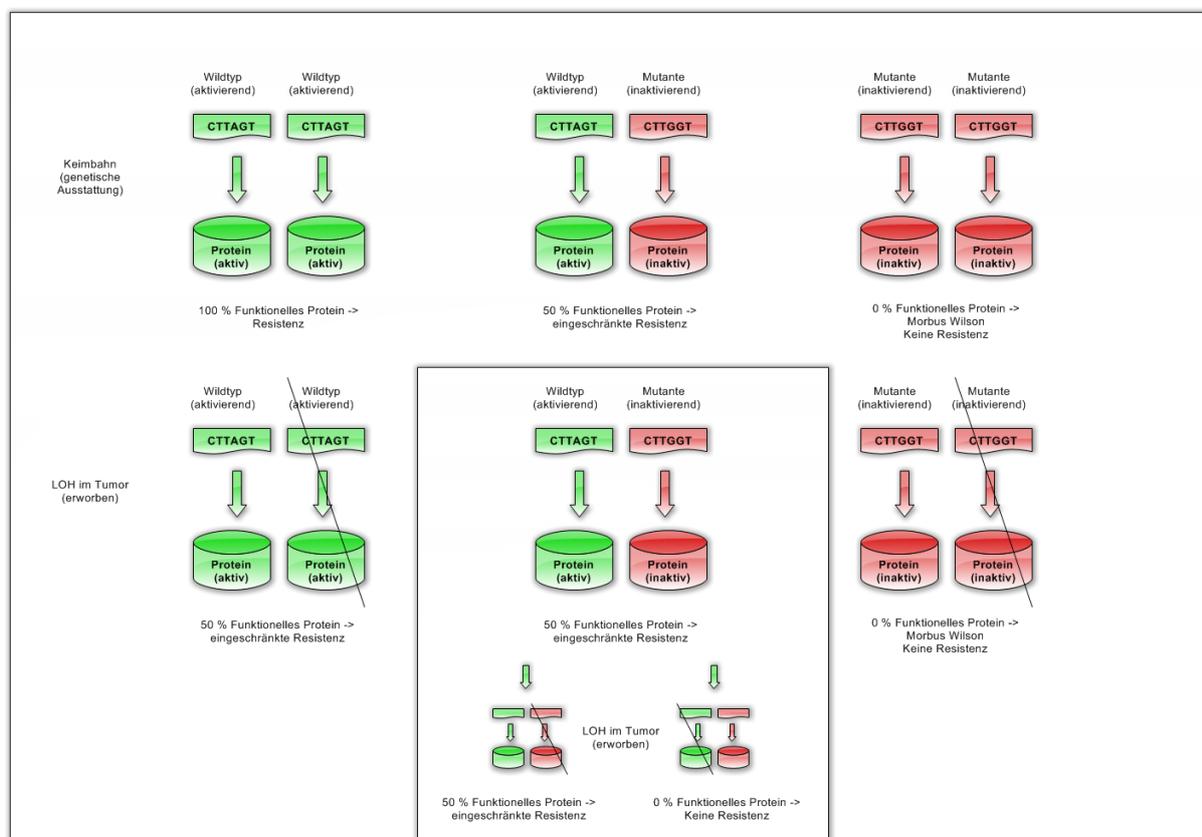


Abbildung 22: Hypothetisches Modell der Resistenzentwicklung in Abhängigkeit von genetischer Ausstattung und Allelverlust im Tumor.

In dieser Untersuchung wurden 11 Mutationen und 21 Polymorphismen in 16 Fällen entdeckt. Es wurden mehrere verschiedene Missense-Veränderungen (n=12) gefunden, wovon nur der Polymorphismus M11 häufig auftrat. Dies macht eine statistische Analyse der einzelnen Mutationen unmöglich. In dieser Arbeit lagen verschiedene Sequenzvarianten in geringer Häufigkeit vor. Dadurch ist es schwierig die Relevanz der einzelnen Mutationen einzuschätzen. Eine Validierung dieser Ergebnisse in einem größeren Kollektiv wäre notwendig, um eine eventuelle Relevanz als Marker für das Chemotherapie-Ansprechen zu beurteilen.

Insgesamt ähnelt unser Ergebnis der heterogenen Situation beim Morbus Wilson, bei dem auch eine große Anzahl verschiedener Mutationen bekannt sind, die zu der Erkrankung führen. Allerdings ist nur eine der Sequenzvariationen in dieser Form beim M. Wilson bekannt (M11), sowie eine zweite Mutation, die an bekannter Position mit anderem Aminosäuretausch stattfindet (M6). Daher konnten nur in diesen Fällen Parallelen zum Morbus Wilson gesucht werden, in allen anderen Fällen entfiel diese Möglichkeit.

Um die Relevanz der einzelnen Mutationen zu erforschen, müsste man Zellen gezielt mit der mutanten Form des Proteins transfizieren, um diese dann gezielt zu analysieren.

Dies erscheint nach den Ergebnissen dieser Untersuchung am ehesten für den Polymorphismus M11 sinnvoll, die in diesem Patientenkollektiv in 6 von 17 Fällen auftritt. Beim Vorliegen von M11 im Exon 16 findet man deutlich weniger Ansprecher als in der Gruppe ohne Mutationen. Der entsprechende Proteinabschnitt liegt dabei innerhalb der zytoplasmatischen Domäne des Proteins. Die Signifikanz liegt bei 0,333, das Ergebnis ist also nicht statistisch signifikant.

M11 war die häufigste Veränderung, die beobachtet wurde. Im Zusammenhang mit dem Morbus Wilson wird diese Mutation als nicht krankheitserzeugend gewertet, was gegen eine deaktivierende Mutation spricht.

Daher könnte diese Veränderung eine aktivierende Veränderung sein, die eine vermehrte Sequestration/Inaktivierung von Cisplatin verursacht, die zu vermehrter Resistenz führen kann.

Eine weitere nicht-signifikante Tendenz zeigt sich bei der Betrachtung aller Fälle mit Mutation. Wenn dieses Merkmal vorhanden ist, zeigt sich eine schlechtere Ansprechrate von 0,5 im Vergleich zu Fällen ohne Mutation.

Auch im Summenscore (dargestellt in Abbildung 22) zeigt sich durchschnittlich eine höhere Anzahl von Mutationen in der Gruppe der Nichtansprecher.

Interessanterweise treten nur wenige neue Mutationen im Tumor auf, die meisten sind bereits in der Keimbahn vorhanden. Man kann darüber spekulieren, ob die Mutationen im *ATP7B* Gen entweder neutral oder aktivierend wirken, da inaktivierende Mutationen einen Selektionsnachteil im Sinne des Morbus Wilson bedeuten können. Dies würde einerseits erklären, warum Patienten mit einer höheren Anzahl von Mutationen seltener einen Response zeigen. Andererseits würde der Verlust einer aktivierenden Mutation durch *LOH* erklären, warum Patienten mit *LOH* häufiger ansprechen. Dieser Trend findet sich im Summenscore der Mikrosatellitenverluste. In der Mikrosatellitenanalyse wurde in dieser Studie sehr häufig das Vorliegen von *LOH*-Situationen beobachtet. In 82% der Fälle lag eine *LOH*-Situation vor. Damit sind unsere Ergebnisse höher als in der entsprechenden Literatur, die *LOH*-Situationen in ca. 30%-60% der Fälle nachweist. In der Gruppe der Ansprecher zeigt sich durchschnittlich eine höhere Anzahl von unterschiedlichen Mikrosatelliten, die im Tumor verlorengegangen sind (Signifikanzniveau von 0,301). Falls eine erhöhte *ATP7B*-Aktivität zu erhöhten Resistenz führt, so würden höhere Ansprechraten im Falle einer *LOH*-Situation zu dieser Hypothese passen. Dies passt zu der Theorie, dass erhöhte Expression resistenzerzeugend wirkt. Daher wäre es überlegenswert, die *LOH*-Situation in Hinblick auf Cisplatinresistenz in weiteren Studien zu untersuchen, um den möglichen Nutzen als Marker für gezielte Therapie zu klären.

Es kam ausschließlich zum Verlust des mutanten Allels zugunsten des Wildtyps. Es stellt sich die Frage, ob die Zellen mit dem Wildtypallel einen Wachstumsvorteil gegenüber den Mutanten haben. Soweit dem Autor bekannt ist gibt es dazu keine Untersuchungen für *ATP7B*. In anderen Untersuchungen wurden zumindest Hinweise gefunden, dass Allel-spezifische Verluste Wachstumsvorteile für den Tumor zeigen können (Wegman, Marcus et al. 2009).

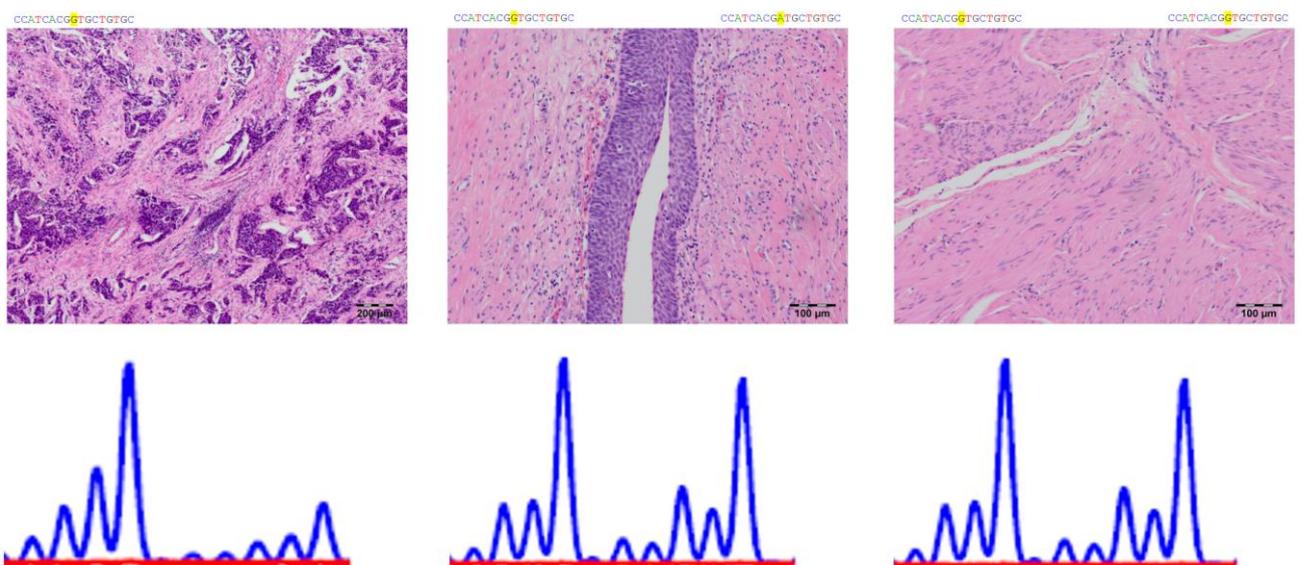


Abbildung 23: Kombination von Histologie, Mikrosatellitenstatus und Nukleotidsequenz am Beispiel der Mutation M3 im Fall 9.

Der große Anteil an Mutationen im Keimbahngewebe zeigt die Heterogenität des *ATP7B*-Gens auf. Insgesamt 6 der 17 Patienten (35%) zeigen eine Sequenzveränderung mit Aminosäureaustausch im Normalgewebe, zählt man die Sequenzvariationen dazu sind es 8 von 17.

Dies mag zum Teil das unterschiedliche Verhalten unterschiedlicher Zelllinien in *in-vitro* Experimenten zur Cisplatinempfindlichkeit erklären. Außerdem ist bis heute die genaue Funktionsweise von *ATP7B* nicht geklärt, obwohl in der Vergangenheit viele Untersuchungen dazu durchgeführt wurden.

Nach der Entdeckung der Fähigkeit von *ATP7B*, neben Kupfer auch Platin transportieren zu können, zeigte sich, dass cisplatinresistente Zellen niedrigere Kupferspiegel aufwiesen (Katano, Kondo et al. 2002). Zusätzlich zeigte sich eine Kreuzresistenz auf Kupfer bzw. Cisplatin zwischen Kupfer- und Platinresistenten Zellen (Safaei, Katano et al. 2004; Safaei and Howell 2005).

Weiterhin ergaben sich Hinweise, dass eine erhöhte *ATP7B*-Expression mit einer erhöhten Cisplatinresistenz einhergeht (Komatsu, Sumizawa et al. 2000; Kanzaki, Toi et al. 2002; Higashimoto, Kanzaki et al. 2003; Ohbu, Ogawa et al. 2003).

Daher stellte sich die Frage, durch welche Mechanismen eine *ATP7B*-vermittelte Resistenz gegen Cisplatin funktionieren könnte. Eine naheliegende Hypothese war die Annahme, dass Platin analog zu Kupfer entweder in Vesikel verpackt oder biliär ausgeschieden würde. Dabei ging das Interesse besonders zu den Metall-bindenden Untereinheiten (Metal Binding Subdomains: MBS).

In einer Arbeit von Leonhardt et al. wurden verschiedene Experimente durchgeführt, um einen möglichen Resistenzmechanismus zu finden (Leonhardt, Gebhardt et al. 2009).

Dabei zeigte sich, dass Zellen aus zwei unterschiedlichen Leberzelllinien Unterschiede in ihrer Sensitivität zu Cisplatin zeigten, obwohl *ATP7B* in vergleichbarem Maße exprimiert wurde. Dies zeigt, dass *ATP7B* nicht der einzige Spieler in der Resistenzentwicklung sein kann. Zusätzlich wurde festgestellt, dass Zellen ohne *ATP7B*, die von *ATP7B*^{-/-}-Mäusen gewonnen wurden, überraschenderweise resistenter gegenüber Cisplatin waren als der Wildtyp. Möglicherweise könnten in diesen Zellen reaktiv Schutzsysteme gegen Kupfer/Platin hochreguliert sein. Interessant wäre die Erforschung dieses Effekts in Hinblick auf die erworbene Cisplatinresistenz.

Das zelluläre Trafficking von *ATP7B* vom trans-Golgi-Netzwerk in subapikale Vesikel blieb unbeeinflusst durch Zugabe von Cisplatin.

Dennoch zeigte sich, dass Cisplatin mit *ATP7B* an der N-terminalen Region interagiert indem es - ähnlich wie Kupfer - die Phosphorylierung des Proteins katalysiert.

Dabei scheint es allerdings andere Bindungsstellen als Kupfer zu benutzen.

Die Autoren kommen zu dem Schluss, dass Cisplatin direkt mit *ATP7B* bindet und seine Aktivität beeinflusst. Über diese Bindung könnte es zu einer Aktivierung mit nachfolgendem intrazellulärem Kupfermangel kommen. In anderen Arbeiten gibt es Ergebnisse, die zeigen dass Kupfermangel zur Aktivierung von anderen zellulären Entgiftungsmechanismen führt wie zum Beispiel die Hochregulation des Glutathions (Uthus, Reeves et al. 2007).

Dies halten die Autoren für wahrscheinlicher im Sinne des gesuchten Resistenzmechanismus als den aktiven Efflux. Als eine weitere Möglichkeit sehen die Autoren die Bindung von Cisplatin an die 4 n-terminalen metallbindenden Domänen, die über eine Sequestrierung des Cisplatins zu Resistenz führen könnte.

In dieser Arbeit wurden die Exons untersucht, die im europäischen Raum am häufigsten im Rahmen des Morbus Wilson mutiert sind. Diese beziehen allerdings nicht die eben erwähnten metallbindenden Domänen ein, die sich am N-Terminalen Ende des Proteins befinden. Es ergeben sich unterschiedliche Auswirkungen in Bezug auf diese Arbeit:

Falls die Resistenzmechanismen durch Änderungen in der Kupferhomöostase aktiviert werden, ist es möglich dass Änderungen der *ATP7B*-Aktivität zu Resistenz führen. Dies wäre bei inaktivierenden Mutationen sowie bei *LOH*-Situationen der Fall. Diese *LOH*-Situation und Mutationen können im Rahmen dieser Arbeit erkannt werden, soweit sie in den untersuchten Abschnitten auftreten. Eine Sequestrierung als Resistenzmechanismus könnte in diesem Zusammenhang am besten über die Proteinexpression dargestellt werden. Dabei wäre die Proteinkonzentration zur Resistenz proportional. Da in dieser Arbeit keine spezifischen

Ergebnisse in Immunhistochemie und Westernblot gewonnen werden konnten, ist für diesen Fall keine Aussage möglich.

Falls Mutationen in den N-terminalen Metall-bindenden Untereinheiten die wesentliche Rolle für die Cisplatinresistenz spielen, kann dies auf genetischer Ebene in dieser Arbeit nicht dargestellt werden. Die genetische Information für diese Abschnitte liegt in den Exons 1-5, in der vorliegenden Arbeit wurden diese Regionen nicht untersucht.

Die Mikrosatellitenanalyse bleibt von dieser Problematik unberührt, da hiermit größere Veränderungen dargestellt werden.

Insgesamt gibt es viele Arbeiten die für eine Beteiligung von *ATP7B* und Kupferstoffwechsel in der Cisplatinresistenz sprechen, der genaue Mechanismus bleibt aber weiterhin ungeklärt.

Diese Einschätzung wird unterstützt durch eine aktuelle Arbeit von Mangala et al. (Mangala, Zuzel et al. 2009). In der Zellkultur wurde die *ATP7B* Expression durch siRNA unterdrückt.

Dies führte zu einer erhöhten Sensitivität der Tumoren gegenüber Cisplatin. Im Mausmodell in vivo führte die Herunterregulierung von *ATP7B* durch liposomale siRNA-Gabe zu einer Größenverminderung der wachsenden Tumoren auf 40% und zu einem verbesserten Wirken von cisplatinhaltiger Therapie. In einer weiteren aktuellen Studie wurde die Expression von *ATP7B* bei Patienten mit kolorektalen Karzinomen mittels quantitativer real-time-PCR untersucht und mit dem Ansprechen auf Oxaliplatin-haltige Chemotherapie korreliert. Dabei zeigte sich eine deutliche Verlängerung des Chemotherapieansprechens bei den Patienten mit niedriger *ATP7B*-Expression (Martinez-Balibrea, Martinez-Cardus et al. 2009). Allerdings lassen sich diese Ergebnisse nicht direkt auf Cisplatin/Carboplatin übertragen.

Insgesamt wird zunehmend klar, dass die Mechanismen der Resistenz komplex sind und noch weiterer Forschung bedürfen. Dennoch scheint die Analyse der Spieler des Kupferstoffwechsels ein erfolgversprechender Weg zu sein.

Deshalb konzentriert sich bei der Platinresistenz das Interesse auch auf andere am Kupferstoffwechsel beteiligte Proteine wie *CTR1* und *SLC22A* sowie auf zelluläre Entgiftungssysteme wie das Glutathion-System, die in Abbildung 24 noch einmal dargestellt sind.

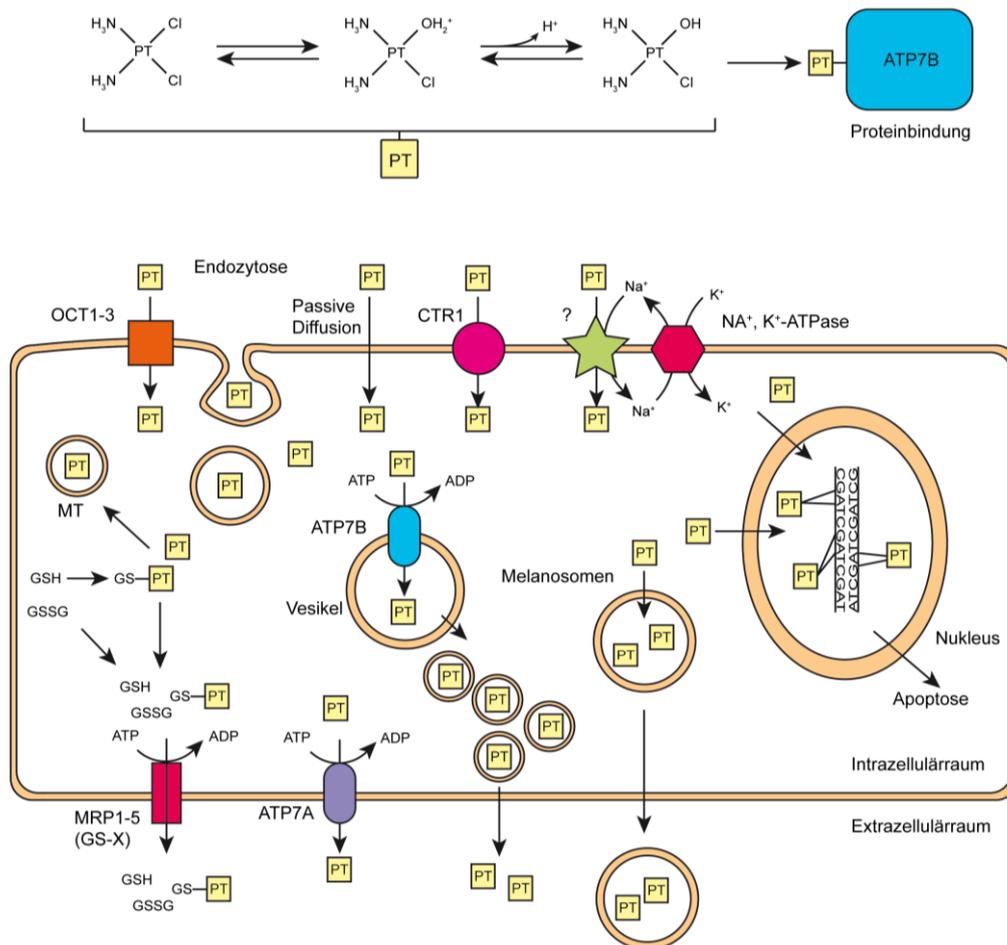


Abbildung 24: Der Platinstoffwechsel in der Zelle

(angelehnt an Hall et al. 2008)

Mammalian Copper Transporter – CTR1

CTR1 ist das Produkt des Gens *SLC31A1* auf Chromosom 9q31-q32. Damit ist dieser Transporter in einer Region gelegen, in der beim Blasenkarzinom häufig chromosomale Instabilitäten und *LOH*-Situationen auftreten (siehe Kapitel „Strukturelle Aberrationen“).

Dieser essentielle Kupfertransporter kommt sowohl in der Zellmembran als auch in intrazellulären Membranen vor (Lee et al. 2000; Aller et al. 2006). Er ist essentiell in der Embryogenese, das Ausschalten beider Allele (*CTRI*^{-/-}) führt zum Versterben des Embryos in utero (Kuo et al. 2001). In Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass *CTRI*-defiziente Zelllinien eine verminderte Cisplatin Aufnahme zeigen, sowie Zelllinien mit vermehrter Expression eine ebenso vermehrte Aufnahme (Ishida et al. 2002; Lin et al. 2002; Holzer et al. 2004). In einer Arbeit von Larson et al. (Larson et al. 2009) wurde beobachtet, dass *CTRI*^{-/-} Zellen auch gegen hohe Konzentrationen von Cisplatin resistent waren. Wurde über einen Lentivirus die DNA des Wildtyps in die *CTRI*^{-/-}-Zellen eingebracht, wurden diese wieder Cisplatin sensibel. In einer Studie zum nicht-kleinzelligen Lungenkarzinom wurde die Expression von *CTRI* mit dem Ansprechen auf Chemotherapie korreliert. Dabei zeigte sich ein signifikant besseres Ansprechen bei dem Vorliegen einer Überexpression von *CTRI* (Chen et al. 2011).

Cisplatin führt zum raschen Abbau von *CTRI*, indem es im Proteasom abgebaut wird (Holzer et al. 2006). Dieser Abbau kann *In Vivo* durch *Lactacystin*, *proteasome inhibitor 1* und *MG-132* gehemmt werden (Holzer et al. 2006). In einer weiteren Studie (Jandial et al. 2009) konnte im Mausmodell der Abbau von *CTRI* in Ovarialkarzinomen durch Bortezomib verhindert werden. Bortezomib ist ein Proteasom-Inhibitor, der in der Therapie des multiplen Myeloms klinisch angewendet wird. Die Inhibierung des Proteasoms führte zu einem verminderten Abbau von *CTRI* und einer erhöhten Cisplatin Aufnahme. Ebenso führte es zu einer erhöhten Zytotoxizität des Cisplatin.

In klinischen Studien kam es allerdings nur zu geringem Ansprechen auf die Kombination von Bortezomib und Carboplatin. Dies liegt möglicherweise an der Reihenfolge der Medikamentengabe und kann eventuell durch sequentielle Gabe von zuerst Bortezomib und darauf folgend Platin verhindert werden (Aghajanian et al. 2005; Ma et al. 2007).

Zusätzlich existiert ein weiterer Kupfertransporter, der als *CTR2* bezeichnet wird. Im Gegensatz zu *CTR1* fehlt bei *CTR2* die große N-terminale Domäne von *CTR1*.

In Studien wurde festgestellt, dass *CTR2* hauptsächlich an intrazellulären Membranen zu finden ist (Gupta et al. 2009). Die Affinität zu Kupfer ist deutlich geringer als die von *CTR1*. Die Funktion ist letztlich ungeklärt, es wurde spekuliert, ob der intrazelluläre Transporter ein großes Reservoir bildet, das unter bestimmten Umständen in die äußere Zellmembran eingebaut wird. Weiterhin wurde vorgeschlagen, dass *CTR2* Kupfer aus Lysosomen freisetzt, das aus degradierten, kupferhaltigen Enzymen stammt und so zur intrazellulären Wiederverwendung von Kupfer beiträgt.

Zusammenfassend scheint das Vorliegen von funktionellem *CTR1* eine Cisplatinempfindlichkeit zu begünstigen, während das Fehlen von funktionellem *CTR1* z.B. durch inaktivierende Mutation oder *LOH*-Situationen wahrscheinlich zu einer Cisplatinresistenz führt.

Glutathion

Glutathion (GSH) ist ein Pseudotripeptid, das aus den Aminosäuren Glutamat, Cystein und Glycin synthetisiert wird. Es handelt sich dabei um ein Pseudotripeptid, da die Bindung zwischen Glutamat und Cystein über die γ -Carboxylgruppe des Glutamats zustande kommt und nicht über die α -Carboxylgruppe.

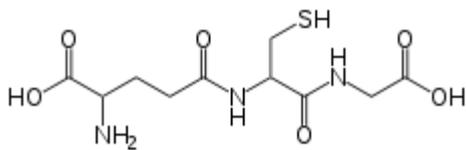


Abbildung 25: Chemische Struktur des Glutathions

Glutathion wird in einem zweischrittigen Prozess hergestellt. Zuerst wird aus Glutamat und Cystein durch die Glutamatcysteinligase (GCL) das Produkt γ -Glutamylcystein hergestellt. In einem zweiten Schritt wird das Glycin unter ATP-Verbrauch durch das Enzym Glutathionsynthase (GS) hinzugefügt.

Im Körper nimmt Glutathion verschiedene Funktionen wahr.

Ein Schlüsselement ist dabei die Schwefelgruppe des Cysteins, die als Redox-Partner freie Elektronen anbietet. Damit können sogenannte freie Radikale - also reaktive Sauerstoffspezies (ROS) - reduziert und somit neutralisiert werden.

Jeweils zwei oxidierte Glutathionmoleküle verbinden sich unter Ausbildung einer Disulfidbrücke zu Glutathiondisulfid (GSSG). Durch Enzyme wie die Glutathionreduktase kann GSSG unter NADPH-Verbrauch wieder zu GSH regeneriert werden.

In einem ähnlichen Mechanismus können potentiell toxische Stoffe im Körper entgiftet bzw. biotransformiert werden. Durch Bindung des Glutathions an elektrophile Kohlenstoffe des Moleküls wird die Wasserlöslichkeit erhöht und dadurch die Ausscheidungsfähigkeit über die Niere erhöht.

Dieser Schritt wird durch die Glutathion-S-Transferase (GST) katalysiert.

Zusätzlich zu diesen Schutzfunktionen ist Glutathion das wichtigste Reservoir für die schwefelhaltige Aminosäure Cystein. Im Glutathionpool sind Cysteinovorräte für etwa drei Tage gespeichert.

Im Zusammenhang mit Cisplatinresistenz wurde das Glutathionsystem untersucht.

Als Effluxmechanismus wurde die Transporter *MRP1* und *MRP2* (Synonym: *ABCC1* bzw. 2, *GS-X*.) vorgeschlagen.

Diese Transporter gehören zur Familie der ABC-Transporter (ATP-Binding-Cassette)(Allikmets et al. 1996), und zwar zur Unterfamilie ABCC, die die *MRP*-Proteine enthält (Borst et al. 2000). Diese sind auf Chromosom 16p13.1 bzw. auf Chromosom 10q24 gelegen. Damit liegen sie in Regionen, die beim Blasenkarzinom seltener chromosomaler Instabilität unterworfen sind. *MRP* kann sowohl Glutathion-Konjugate als auch GSH und GSSG transportieren. Die *MRP*-Familie zeichnet sich durch die Fähigkeit aus, sehr viele kleine Moleküle transportieren zu können, darunter viele Chemotherapeutika wie z.B. Methotrexat und unter anderen auch Cisplatin. Besonders der Transporter *MRP2* vermittelt Cisplatinresistenz in transfizierten Zelllinien, während dies bei *MRP1* nicht der Fall zu sein scheint (Ohga et al. 1996; Cui et al. 1999).

Die Glutathion-Synthese kann durch verschiedene Hemmstoffe wie Buthionin-Sulfoximin (*BSO*), Methionin-Sulfoximin und Indomethacin gehemmt werden.

In einer Studie von Byun et al. konnte für menschliche Blasenkrebszelllinien gezeigt werden, dass die Cisplatinsensitivität sowohl bei resistenten als auch bei nichtresistenten Zellen erhöht war, wenn die Glutathionproduktion in der Zelle durch BSO, Indomethacin und Ethacrynsäure inhibiert wurde (Byun et al. 2005). Allerdings konnte die Sensitivität der resistenten Zellen durch GSH-Inhibition nicht auf das Niveau nicht-resistenter Zellen zurückgebracht werden, was für weitere Beteiligte in der Cisplatinresistenz spricht.

In einer Untersuchung von Ishikawa et al. (Ishikawa et al. 1993) wurde beobachtet, dass Cisplatin und GSH Komplexe im Sinne eines Chelats bilden können. In dieser Untersuchung lagen maximal 60% des intrazellulären Cisplatins in dieser Form vor.

Allerdings konnte in anderen Untersuchungen kein klarer Zusammenhang zwischen der Platinierung der DNA und dem GSH-Gehalt der Zelle festgestellt werden, obwohl der GSH-Gehalt und die Cisplatinresistenz korrelieren (Newkirk et al. 1997). Dies spräche eher gegen einen direkten Engiftungsmechanismus, bei dem Cisplatin mit GSH gekoppelt und ausgeschaltet wird.

In diesem Zusammenhang wurde von Rudin die Hypothese aufgebracht, dass die beobachtete Cisplatinresistenz nicht auf oben erwähnter GSH-Cisplatinbindung beruht, sondern auf der Inhibition mitochondrialer Veränderungen, die im Zusammenhang mit Apoptose auftreten (Rudin et al. 2003). In den Mitochondrien werden im Rahmen der Apoptose vermehrt reaktive Sauerstoffspezies (ROS) gebildet; ein Wirkmechanismus könnte die direkte Entgiftung der reaktiven Sauerstoffspezies durch vermehrte GSH-Konzentration sein und so den Zelluntergang verhindern.

Das Protein *BCL-2* wirkt antiapoptotisch, es wurde beobachtet, dass die Überexpression dieses Proteins den erwähnten Anstieg der ROS bei apoptotischen Stimuli inhibiert (Hockenbery et al. 1993; Voehringer 1999).

In der erwähnten Arbeit von Rudin konnte gezeigt werden, dass in ihrem Versuchsaufbau die Glutathionkonzentration bei *BCL-2* Expression erhöht war. Außerdem wurde beobachtet, dass die *BCL-2* vermittelten Cisplatinresistenzen vom Glutathionspiegel abhängig waren. In beiden Gruppen zeigte sich die gleiche Menge an Platin-DNA-Addukten, was wieder für einen Resistenzmechanismus spricht, der unabhängig von der Platinierung der DNA ist. Daher sind weitere Untersuchungen nötig um die Rolle von Proteinen der *BCL-2* Familie sowie der Balance des Redoxpotentials der Zelle im Hinblick auf Chemotherapieresistenz aufzuklären.

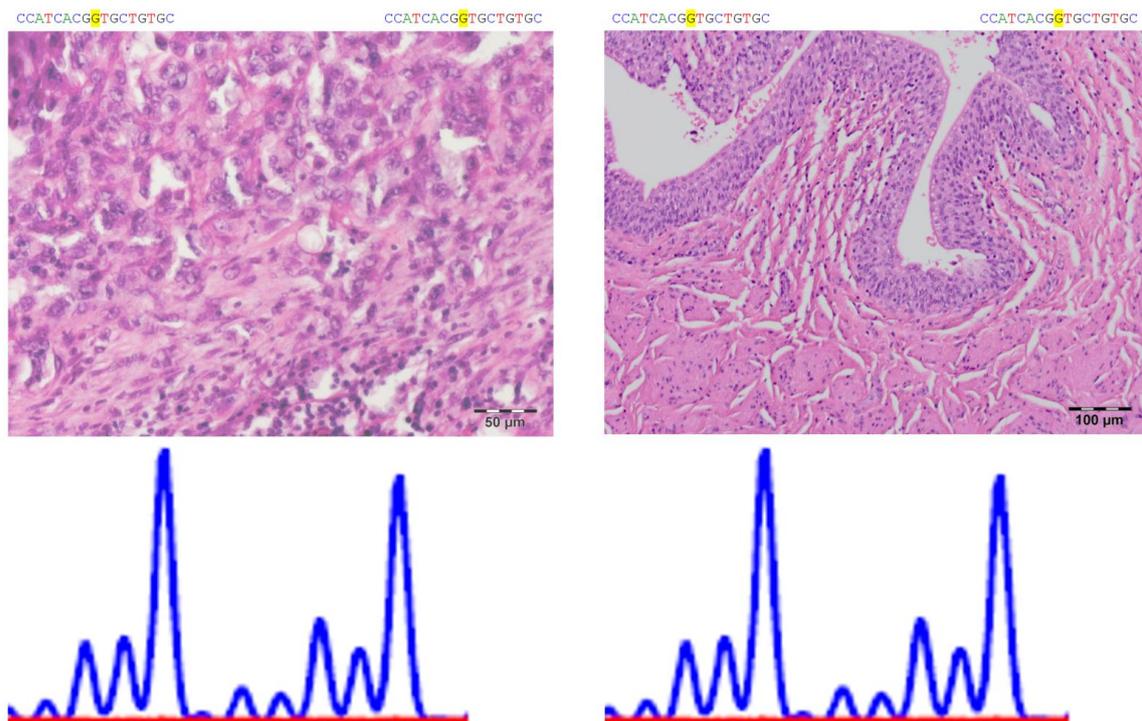


Abbildung 26: : Kombination von Histologie, Mikrosatellitenstatus und Nukleotidsequenz am Beispiel der Mutation M3 im Fall 13.

SLC22A - Organic Cation Transporters

Eine weitere Transporterfamilie, die in Zusammenhang mit Chemotherapieresistenz untersucht wurde, ist die Gruppe der Organic Cation Transporters 1-3 (*OCT*). Diese sind auf Chromosom 6q25.3 gelegen und liegen damit in einer Region, die beim Blasenkarzinom seltener strukturellen Veränderungen unterworfen ist.

Sie gehören zur Solute Carrier-Familie in der Untergruppe 22A (*SLC22A*). Zur SLC-Familie gehören mehr als 300 heterogene Membrantransportproteine. Die Untergruppe 22A sind Transporter die organische Anionen, Kationen und Zwitterionen transportieren können.

Verschiedene Arbeiten haben sich mit der Rolle von *OCT 1-3* beschäftigt (Zhang et al. 2006; Burger et al. 2010).

Dabei zeigte sich, dass *OCT1* und *OCT2* eine wesentliche Rolle in der Aufnahme von Oxaliplatin spielt, aber nicht von Cisplatin und Carboplatin. Dies kann eventuell die deutlich bessere Wirksamkeit von Oxaliplatin beim kolorektalen Karzinom erklären.

Weiterhin wurde beobachtet, dass Platinkomplexe mit einem organischen Liganden an den Aminogruppen (wie die 1,2-diaminocyclohexangruppe (DACH) beim Oxaliplatin) Substrat für *OCT 1* und *2* sind.

Dagegen sind Platinkomplexe mit zwei freien Aminliganden wie Cisplatin und Carboplatin kein oder nur ein sehr schwaches Substrat für die *OCT*-Transporter.

Zusammenfassung und Ausblick

Es gibt mehrere Untersuchungen, die Hinweise geben, dass *ATP7B* an der Resistenz von Tumorzellen gegenüber Cisplatin und Carboplatin beteiligt ist. Der genaue Mechanismus der Resistenz ist unklar; er ist vermutlich komplexer als anfangs angenommen und entsteht vermutlich im Zusammenspiel mit anderen Mitgliedern des Kupferstoffwechsels sowie reduzierender Systeme in der Zelle.

In dieser Pilotstudie wurde *ATP7B* auf genetischer und Allel-Ebene untersucht. In dieser Arbeit wurden bisher unbekannte Sequenzveränderungen des *ATP7B*-Gens beobachtet. Die klinische Bedeutung dieser Mutationen ist unklar; es zeigt sich die statistisch nicht-signifikante Tendenz, dass eine größere Anzahl von Mutationen mit schlechterer Ansprechrate vergesellschaftet ist.

Für eine große Anzahl der Fälle konnte gezeigt werden, dass eine *LOH*-Situation vorliegt. In der statistischen Auswertung ergab sich eine statistisch nicht-signifikante Tendenz zu einer höheren Anzahl von positiven *LOH*-Markern in der Ansprechergruppe (siehe Kapitel „Statistische Auswertung“).

Dies ließe sich in zukünftigen Arbeiten noch genauer untersuchen, da genetische Ereignisse auf Allel-Ebene vielfältig sein können. Dabei kann es zur Deletion oder Amplifikation von Allelen kommen. Dies wird als „Copy Number Variations“ (CNV) bezeichnet. So ist es möglich, dass in einer Zelle keine Kopie oder auch sehr viele Kopien eines Allels vorliegen (siehe Abbildung 27).

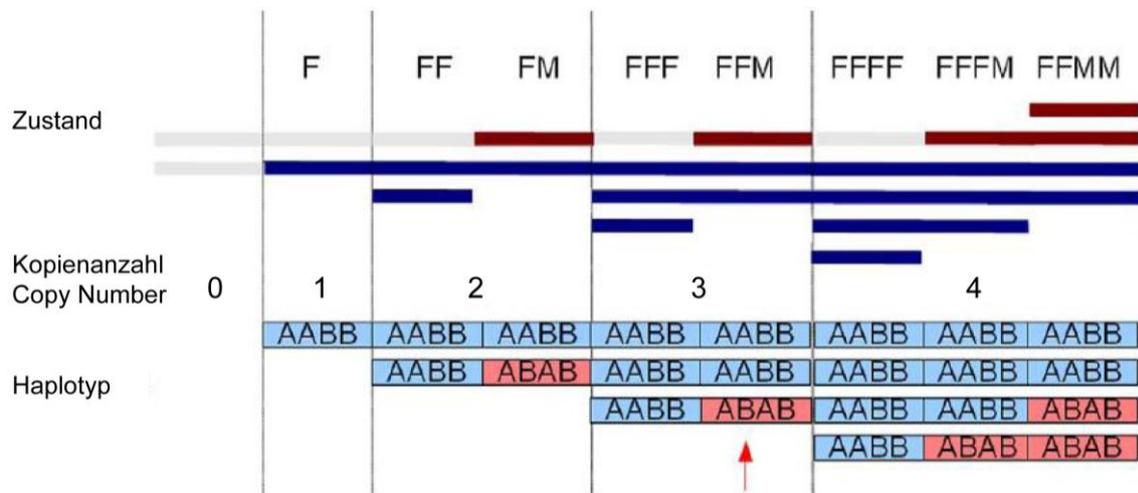


Abbildung 27: Schematische Darstellung der Allelsituation bei Copy Number Variation.

Dabei stellen F (rot) und M (blau) das Ursprungsallel dar. Nicht dargestellt sind die spiegelbildlichen Zustände wie MMM, MMF etc. (modifiziert aus Liu et al. 2010)

Diese Verringerung oder Vermehrung kann balanciert oder unbalanciert sein. Im balancierten Zustand ist die Zahl der beiden Allele gleichgroß, in der Abbildung entspricht dies den Zuständen 0, FM, FFMM etc.

Im unbalancierten Zustand, der der *LOH*-Situation entspricht, überwiegt eines der beiden Allele, im Beispiel sind dies die Zustände F, FF, FFF, FFM, etc. Das Gesagte gilt spiegelbildlich für die unbalancierten Zustände, in denen M überwiegt.

Dies ist insofern relevant als Krebszellen oft sehr komplexe Genprofile zeigen.

In einer von (Liu et al. 2010) untersuchten Brustkrebszelllinie zeigte sich, dass viele wichtige Regionen *LOH*-Situationen zeigten sowie dass mehr als die Hälfte des kompletten Genoms auf verschiedene Arten amplifiziert vorlag.

In der durchgeführten Mikrosatellitenanalyse ist nur der Vergleich der beiden Allele möglich. Damit werden nur unbalancierte Deletionen/Amplifikationen erfasst. Außerdem ist eine unbalancierte Amplifikation nicht von einer echten *LOH*-Situation zu unterscheiden.

Im Fall einer Amplifikation ist eine quantitative Aussage über die Anzahl der Allelkopien mit der hier benutzten Methode nicht möglich (Staaf et al. 2008).

Eine Möglichkeit den Amplifikationsstatus der Fälle zu überprüfen wäre z.B. die Fluoreszenz In-Situ Hybridisierung (FISH), auf Genomebene sind Verfahren möglich wie „Array Comparative Genomic Hybridization“ (aCGH) oder sogenannte „WholeGenome Genotyping“ Arrays, die auf der Analyse von Single Nucleotide Polymorphisms (SNP) beruhen.

Weiterhin wäre die Untersuchung der Proteinexpression im Zusammenhang mit chromosomalen und molekularen Veränderungen interessant. Dies ließe sich mit antikörpergestützten Nachweisverfahren wie Immunhistochemie und Western Blot durchführen. In der Vorbereitung dieser Arbeit wurden alle Antikörper getestet, die 2007 kommerziell in Deutschland erhältlich waren (Daten nicht abgebildet). Es konnte kein spezifischer Nachweis von *ATP7B* in formalinfixiertem Material geführt werden. Mit weiterentwickelten Antikörpern werden sich in Zukunft diese Fragestellungen möglicherweise beantworten lassen.

Die weitere Untersuchung des Zusammenspiels der verschiedenen Elemente des Kupferstoffwechsels auf molekularer und chromosomaler Ebene an Patientenmaterial mit den oben genannten Methoden wird das Verständnis der Resistenzmechanismen erweitern. Damit verbindet sich die Hoffnung, einerseits Marker zu entwickeln, die eine gezielte Therapie möglich machen. Andererseits ist es wünschenswert Medikamente zu entwickeln, die die Resistenz vermindern, indem sie gezielt gegen Schlüssel-moleküle wie *ATP7B* und andere Beteiligte wirken.

Abbildungsverzeichnis

Alle Abbildungen wurden durch den Autor mit den Programmen Software Ideas Modeler 4.97 (Dušan Rodina, Bratislava, Slowakei) und Adobe Creative Suite 3 (Adobe Systems Inc., San Jose, USA) erstellt.

ABBILDUNG 1: HÄUFIGKEIT VON UROTHELKRZINOMEN IN BEZUG ZUR LAGE IM UROGENITALTRAKT.....	9
ABBILDUNG 2: HÄUFIGKEIT DER TUMORLOKALISATIONEN	14
ABBILDUNG 3: MORTALITÄTSRATEN DER VERSCHIEDENEN TUMORLOKALISATIONEN	15
ABBILDUNG 4: KANDIDATENGENE IM ZUSAMMENHANG MIT DEM UROTHELIALEN KARZINOM	22
ABBILDUNG 5: CISPLATIN	29
ABBILDUNG 6: CARBOPLATIN	29
ABBILDUNG 7: DER PLATINSTOFFWECHSEL IN DER ZELLE.....	34
ABBILDUNG 8: DER KUPFERSTOFFWECHSEL.....	38
ABBILDUNG 9: ATP7B TERTIÄRSTRUKTUR	39
ABBILDUNG 10: UNTER UV-LICHT FOTOGRAFIERTES AGAROSEGEL MIT EINEM TEIL DER AMPLIFIKATE DES EXON 15.	50
ABBILDUNG 11: DENATURIERUNG UND HYBRIDISIERUNG (ANGELEHNT AN TRANSGENOMIC, INC.).....	53
ABBILDUNG 12: DIDESOXYRIBONUCLEOTID (DDATP).....	54
ABBILDUNG 13: SEQUENZDIAGRAMM:.....	55
ABBILDUNG 14: DHPLC-CHROMATOGRAMM (FALL 2 NORMALGEWEBE).....	61
ABBILDUNG 15: DHPLC-CHROMATOGRAMM (FALL 2 TUMOR).	61
ABBILDUNG 16: MIKROSATELLITEN UM ATP7B. UNTER DER BEZEICHNUNG DES JEWEILIGEN MIKROSATELLITEN IST DIE GENAUE POSITION AUF EXON 13 ANGEGEBEN.....	62
ABBILDUNG 17: BANDEN DES MIKROSATELLITEN D13S297	63
ABBILDUNG 18: BANDEN DES MIKROSATELLITEN D13S297	63
ABBILDUNG 19: DARSTELLUNG DER MUTATION M1 (FALL 16).	68
ABBILDUNG 20: GRAPHISCHE DARSTELLUNG VON TABELLE 14	77
ABBILDUNG 21: VERGLEICH DER ANSPRECHRATEN IN BEZUG AUF DIE SUMMENMERKMALE IN EINER KOMBINIERTEN PUNKT/BOX PLOT DARSTELLUNG (SIEHE TABELLE 15).	78
ABBILDUNG 22: HYPOTHETISCHES MODELL DER RESISTENZENTWICKLUNG IN ABHÄNGIGKEIT VON GENETISCHER AUSSTATTUNG UND ALLELVERLUST IM TUMOR.	82
ABBILDUNG 23: KOMBINATION VON HISTOLOGIE, MIKROSATELLITENSTATUS UND NUKLEOTIDSEQUENZ AM BEISPIEL DER MUTATION M3 IM FALL 9.	85
ABBILDUNG 24: DER PLATINSTOFFWECHSEL IN DER ZELLE.....	89
ABBILDUNG 25: CHEMISCHE STRUKTUR DES GLUTATHIONS.....	92
ABBILDUNG 26: : KOMBINATION VON HISTOLOGIE, MIKROSATELLITENSTATUS UND NUKLEOTIDSEQUENZ AM BEISPIEL DER MUTATION M3 IM FALL 13.	95
ABBILDUNG 27: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DER ALLELSITUATION BEI COPY NUMBER VARIATION.	98
TABELLE 1: TNM-KLASSIFIKATION: T-STADIEN	10
TABELLE 2: TNM-KLASSIFIKATION: N-STADIEN	10
TABELLE 3: TNM-KLASSIFIKATION: M-STADIEN	10
TABELLE 4: STADIENEINTEILUNG	11
TABELLE 5: PRIMERSEQUENZEN DER MIKROSATELLITEN UM ATP7B	49
TABELLE 6: PRIMERSEQUENZEN ZUR ANALYSE AUSGEWÄHLTER EXONS DES ATP7B-GENS.....	49
TABELLE 7: ANSPRECHEN AUF DIE CHEMOTHERAPIE NACH RECIST 1.0 KRITERIEN.....	59
TABELLE 8: ERGEBNISSE DER MIKROSATELLITENANALYSE	64
TABELLE 9: ERGEBNISSE DER MIKROSATELLITENANALYSE.	67
TABELLE 10: MUTATIONEN MIT ZUGEHÖRIGEN AMINOSÄURENAUSTAUSCH.....	69
TABELLE 11: SEQUENZVARIATIONEN OHNE EINFLUSS AUF DIE AMINOSÄURENFOLGE (NON-CODING-MUTATIONS)	70
TABELLE 12: FALLBEZOGENE DARSTELLUNG VON MUTATIONEN UND SEQUENZVARIATIONEN IN TUMOR- UND NORMALGEWEBE.....	71
TABELLE 13: GEWEBEBEZOGENE DARSTELLUNG VON MUTATIONEN UND SEQUENZVARIATIONEN.	72
TABELLE 14: SIGNIFIKANZNIVEAU UND ANSPRECHRATEN BEIM VORLIEGEN VON LOH BZW. MUTATIONEN.	77
TABELLE 15: STATISTISCHE SIGNIFIKANZ DER SUMMENMERKMALE.	78

Literaturverzeichnis

- Advanced bladder cancer (ABC) meta-analysis collaboration (2005). "Adjuvant chemotherapy in invasive bladder cancer: a systematic review and meta-analysis of individual patient data Advanced Bladder Cancer (ABC) Meta-analysis Collaboration." Eur Urol **48**(2): 189-199; discussion 199-201.
- Advanced bladder cancer (ABC) meta-analysis collaboration (2005). "Neoadjuvant chemotherapy in invasive bladder cancer: update of a systematic review and meta-analysis of individual patient data advanced bladder cancer (ABC) meta-analysis collaboration." Eur Urol **48**(2): 202-205; discussion 205-206.
- Aghajanian, C., D. S. Dizon, P. Sabbatini, J. J. Raizer, J. Dupont and D. R. Spriggs (2005). "Phase I trial of bortezomib and carboplatin in recurrent ovarian or primary peritoneal cancer." J Clin Oncol **23**(25): 5943-5949.
- Aller, S. G. and V. M. Unger (2006). "Projection structure of the human copper transporter CTR1 at 6-A resolution reveals a compact trimer with a novel channel-like architecture." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(10): 3627-3632.
- Allikmets, R., B. Gerrard, A. Hutchinson and M. Dean (1996). "Characterization of the human ABC superfamily: isolation and mapping of 21 new genes using the expressed sequence tags database." Hum Mol Genet **5**(10): 1649-1655.
- Bachmann, H., J. Lössner, H. Kühn and R. Siegemund (1991). Occurrence, genetics and epidemiology of Wilson's disease in east Germany. Proceedings of the 5th international symposium on Wilson's disease. v. d. H. C. Czlonkowska A, Technical University Delft: 121-128.
- Bajorin, D. (2008). Chemotherapy for advanced bladder cancer UpToDate. B. Rose. Waltham, MA, Uptodate.
- Beckmann, M. W., F. Picard, H. X. An, C. R. van Roeyen, S. I. Dominik, D. S. Mosny, H. G. Schnurch, H. G. Bender and D. Niederacher (1996). "Clinical impact of detection of loss of heterozygosity of BRCA1 and BRCA2 markers in sporadic breast cancer." Br J Cancer **73**(10): 1220-1226.
- Birkhahn, M., A. P. Mitra, A. J. Williams, G. Lam, W. Ye, R. H. Datar, M. Balic, S. Groshen, K. E. Steven and R. J. Cote (2010). "Predicting recurrence and progression of noninvasive papillary bladder cancer at initial presentation based on quantitative gene expression profiles." Eur Urol **57**(1): 12-20.
- Bochner, B. and N. Karanikolas (2008). Epidemiology and etiology of bladder cancer. Waltham, MA, Uptodate.
- Borst, P., R. Evers, M. Kool and J. Wijnholds (2000). "A family of drug transporters: the multidrug resistance-associated proteins." J Natl Cancer Inst **92**(16): 1295-1302.

- Botteman, M. F., C. L. Pashos, A. Redaelli, B. Laskin and R. Hauser (2003). "The health economics of bladder cancer: a comprehensive review of the published literature." Pharmacoeconomics **21**(18): 1315-1330.
- Brennan, P., O. Bogillot, S. Cordier, E. Greiser, W. Schill, P. Vineis, G. Lopez-Abente, A. Tzonou, J. Chang-Claude, U. Bolm-Audorff, K. H. Jockel, F. Donato, C. Serra, J. Wahrendorf, M. Hours, A. T'Mannetje, M. Kogevinas and P. Boffetta (2000). "Cigarette smoking and bladder cancer in men: a pooled analysis of 11 case-control studies." Int J Cancer **86**(2): 289-294.
- Brennan, P., O. Bogillot, E. Greiser, J. Chang-Claude, J. Wahrendorf, S. Cordier, K. H. Jockel, G. Lopez-Abente, A. Tzonou, P. Vineis, F. Donato, M. Hours, C. Serra, U. Bolm-Audorff, W. Schill, M. Kogevinas and P. Boffetta (2001). "The contribution of cigarette smoking to bladder cancer in women (pooled European data)." Cancer Causes Control **12**(5): 411-417.
- Burger, H., A. Zoumaro-Djayoon, A. W. Boersma, J. Helleman, E. M. Berns, R. H. Mathijssen, W. J. Loos and E. A. Wiemer (2010). "Differential transport of platinum compounds by the human organic cation transporter hOCT2 (hSLC22A2)." Br J Pharmacol **159**(4): 898-908.
- Byun, S. S., S. W. Kim, H. Choi, C. Lee and E. Lee (2005). "Augmentation of cisplatin sensitivity in cisplatin-resistant human bladder cancer cells by modulating glutathione concentrations and glutathione-related enzyme activities." BJU Int **95**(7): 1086-1090.
- Caca, K., P. Ferenci, H. J. Kuhn, C. Polli, H. Willgerodt, B. Kunath, W. Hermann, J. Mossner and F. Berr (2001). "High prevalence of the H1069Q mutation in East German patients with Wilson disease: rapid detection of mutations by limited sequencing and phenotype-genotype analysis." J Hepatol **35**(5): 575-581.
- Cairns, P., A. J. Proctor and M. A. Knowles (1991). "Loss of heterozygosity at the RB locus is frequent and correlates with muscle invasion in bladder carcinoma." Oncogene **6**(12): 2305-2309.
- Chatterjee, S. J., B. George, P. J. Goebell, M. Alavi-Tafreshi, S. R. Shi, Y. K. Fung, P. A. Jones, C. Cordon-Cardo, R. H. Datar and R. J. Cote (2004). "Hyperphosphorylation of pRb: a mechanism for RB tumour suppressor pathway inactivation in bladder cancer." J Pathol **203**(3): 762-770.
- Chen, C. J., Y. C. Chuang, S. L. You, T. M. Lin and H. Y. Wu (1986). "A retrospective study on malignant neoplasms of bladder, lung and liver in blackfoot disease endemic area in Taiwan." Br J Cancer **53**(3): 399-405.
- Chen, H. H., J. J. Yan, W. C. Chen, M. T. Kuo, Y. H. Lai, W. W. Lai, H. S. Liu and W. C. Su (2011). "Predictive and prognostic value of human copper transporter 1 (hCtr1) in patients with stage III non-small-cell lung cancer receiving first-line platinum-based doublet chemotherapy." Lung Cancer.
- Chiang, H. S., H. R. Guo, C. L. Hong, S. M. Lin and E. F. Lee (1993). "The incidence of bladder cancer in the black foot disease endemic area in Taiwan." Br J Urol **71**(3): 274-278.

- Chiou, H. Y., S. T. Chiou, Y. H. Hsu, Y. L. Chou, C. H. Tseng, M. L. Wei and C. J. Chen (2001). "Incidence of transitional cell carcinoma and arsenic in drinking water: a follow-up study of 8,102 residents in an arseniasis-endemic area in northeastern Taiwan." Am J Epidemiol **153**(5): 411-418.
- Cox, D. K., S (2007). Wilson Disease Mutation Database, Department of Medical Genetics, University of Alberta, Canada.
- Cui, Y., J. Konig, J. K. Buchholz, H. Spring, I. Leier and D. Keppler (1999). "Drug resistance and ATP-dependent conjugate transport mediated by the apical multidrug resistance protein, MRP2, permanently expressed in human and canine cells." Mol Pharmacol **55**(5): 929-937.
- Cukuranovic, R., M. Ignjatovic and V. Stefanovic (1991). "Urinary tract tumors and Balkan nephropathy in the South Morava River basin." Kidney Int Suppl **34**: S80-84.
- Curtis, D., M. Durkie, P. Balac, D. Sheard, A. Goodeve, I. Peake, O. Quarrell and S. Tanner (1999). "A study of Wilson disease mutations in Britain." Hum Mutat **14**(4): 304-311.
- Dalbagni, G. and H. Herr (2008). The role of cystectomy and bladder sparing surgery in bladder cancer Waltham, MA, Uptodate.
- Di Pasqua, A. J., J. Goodisman, D. J. Kerwood, B. B. Toms, R. L. Dubowy and J. C. Dabrowiak (2006). "Activation of carboplatin by carbonate." Chem Res Toxicol **19**(1): 139-149.
- Donat, S., G. Dalbagni and H. Herr (2008). Clinical presentation, diagnosis, and staging of bladder cancer. Waltham, MA, Uptodate.
- Durkin, M. E., B. Z. Yuan, X. Zhou, D. B. Zimonjic, D. R. Lowy, S. S. Thorgeirsson and N. C. Popescu (2007). "DLC-1: a Rho GTPase-activating protein and tumour suppressor." J Cell Mol Med **11**(5): 1185-1207.
- Esrig, D., D. Elmajian, S. Groshen, J. A. Freeman, J. P. Stein, S. C. Chen, P. W. Nichols, D. G. Skinner, P. A. Jones and R. J. Cote (1994). "Accumulation of nuclear p53 and tumor progression in bladder cancer." N Engl J Med **331**(19): 1259-1264.
- Ferenci, P. (2006). "Regional distribution of mutations of the ATP7B gene in patients with Wilson disease: impact on genetic testing." Hum Genet **120**(2): 151-159.
- Firneisz, G., P. L. Lakatos, F. Szalay, C. Polli, T. T. Glant and P. Ferenci (2002). "Common mutations of ATP7B in Wilson disease patients from Hungary." Am J Med Genet **108**(1): 23-28.
- Fitzgerald, J. M., N. Ramchurren, K. Rieger, P. Levesque, M. Silverman, J. A. Libertino and I. C. Summerhayes (1995). "Identification of H-ras mutations in urine sediments complements cytology in the detection of bladder tumors." J Natl Cancer Inst **87**(2): 129-133.
- GDB. (2007). "GDB Human Genome Database." 2007, from www.gdb.org.

- GEKID (2008). Krebs in Deutschland 2003 – 2004 Häufigkeiten und Trends. Berlin, Robert Koch-Institut (Hrsg) und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e. V. (Hrsg).
- George, B., R. H. Datar, L. Wu, J. Cai, N. Patten, S. J. Beil, S. Groshen, J. Stein, D. Skinner, P. A. Jones and R. J. Cote (2007). "p53 gene and protein status: the role of p53 alterations in predicting outcome in patients with bladder cancer." J Clin Oncol **25**(34): 5352-5358.
- Gibas, Z. and L. Gibas (1997). "Cytogenetics of bladder cancer." Cancer Genet Cytogenet **95**(1): 108-115.
- Grossfeld, G. D., D. A. Ginsberg, J. P. Stein, B. H. Bochner, D. Esrig, S. Groshen, M. Dunn, P. W. Nichols, C. R. Taylor, D. G. Skinner and R. J. Cote (1997). "Thrombospondin-1 expression in bladder cancer: association with p53 alterations, tumor angiogenesis, and tumor progression." J Natl Cancer Inst **89**(3): 219-227.
- Gupta, A. and S. Lutsenko (2009). "Human copper transporters: mechanism, role in human diseases and therapeutic potential." Future Med Chem **1**(6): 1125-1142.
- Hall, M. D., M. Okabe, D. W. Shen, X. J. Liang and M. M. Gottesman (2008). "The role of cellular accumulation in determining sensitivity to platinum-based chemotherapy." Annu Rev Pharmacol Toxicol **48**: 495-535.
- Hamosh, A., A. F. Scott, J. S. Amberger, C. A. Bocchini and V. A. McKusick (2005). "Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM), a knowledgebase of human genes and genetic disorders." Nucleic Acids Res **33**(Database issue): D514-517.
- Hockenbery, D. M., Z. N. Oltvai, X. M. Yin, C. L. Millman and S. J. Korsmeyer (1993). "Bcl-2 functions in an antioxidant pathway to prevent apoptosis." Cell **75**(2): 241-251.
- Holzer, A. K. and S. B. Howell (2006). "The internalization and degradation of human copper transporter 1 following cisplatin exposure." Cancer Res **66**(22): 10944-10952.
- Holzer, A. K., G. Samimi, K. Katano, W. Naerdemann, X. Lin, R. Safaei and S. B. Howell (2004). "The copper influx transporter human copper transport protein 1 regulates the uptake of cisplatin in human ovarian carcinoma cells." Mol Pharmacol **66**(4): 817-823.
- Hurst, C. D., H. Fiegler, P. Carr, S. Williams, N. P. Carter and M. A. Knowles (2004). "High-resolution analysis of genomic copy number alterations in bladder cancer by microarray-based comparative genomic hybridization." Oncogene **23**(12): 2250-2263.
- Ishida, S., J. Lee, D. J. Thiele and I. Herskowitz (2002). "Uptake of the anticancer drug cisplatin mediated by the copper transporter Ctr1 in yeast and mammals." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(22): 14298-14302.
- Ishikawa, T. and F. Ali-Osman (1993). "Glutathione-associated cis-diamminedichloroplatinum(II) metabolism and ATP-dependent efflux from leukemia cells. Molecular characterization of glutathione-platinum complex and its biological significance." J Biol Chem **268**(27): 20116-20125.

- Ivanova-Smolenskaya, I. A., I. V. Ovchinnikov, A. V. Karabanov, N. L. Deineko, V. V. Poleshchuk, E. D. Markova and S. N. Illarioshkin (1999). "The His1069Gln mutation in the ATP7B gene in Russian patients with Wilson disease." J Med Genet **36**(2): 174.
- Jandial, D. D., S. Farshchi-Heydari, C. A. Larson, G. I. Elliott, W. J. Wrasidlo and S. B. Howell (2009). "Enhanced delivery of cisplatin to intraperitoneal ovarian carcinomas mediated by the effects of bortezomib on the human copper transporter 1." Clin Cancer Res **15**(2): 553-560.
- Jung, I. and E. Messing (2000). "Molecular mechanisms and pathways in bladder cancer development and progression." Cancer Control **7**(4): 325-334.
- Kaplan, M. (2008). Diagnosis of Wilson's disease. Waltham, MA, Uptodate.
- Karakiewicz, P. I., S. F. Shariat, G. S. Palapattu, P. Perrotte, Y. Lotan, C. G. Rogers, G. E. Amiel, A. Vazina, A. Gupta, P. J. Bastian, A. I. Sagalowsky, M. Schoenberg and S. P. Lerner (2006). "Precystectomy nomogram for prediction of advanced bladder cancer stage." Eur Urol **50**(6): 1254-1260; discussion 1261-1252.
- Karnovsky, D. B., J. (1949). The Clinical Evaluation of Chemotherapeutic Agents in Cancer. Evaluation of Chemotherapeutic Agents. C. MacLeod, Columbia Univ Press. **196**.
- Kester, H. A., C. Blanchetot, J. den Hertog, P. T. van der Saag and B. van der Burg (1999). "Transforming growth factor-beta-stimulated clone-22 is a member of a family of leucine zipper proteins that can homo- and heterodimerize and has transcriptional repressor activity." J Biol Chem **274**(39): 27439-27447.
- Koed, K., C. Wiuf, L. L. Christensen, F. P. Wikman, K. Zieger, K. Moller, H. von der Maase and T. F. Orntoft (2005). "High-density single nucleotide polymorphism array defines novel stage and location-dependent allelic imbalances in human bladder tumors." Cancer Res **65**(1): 34-45.
- Kuo, Y. M., B. Zhou, D. Cosco and J. Gitschier (2001). "The copper transporter CTR1 provides an essential function in mammalian embryonic development." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(12): 6836-6841.
- Larson, C. A., B. G. Blair, R. Safaei and S. B. Howell (2009). "The role of the mammalian copper transporter 1 in the cellular accumulation of platinum-based drugs." Mol Pharmacol **75**(2): 324-330.
- Lee, J., J. R. Prohaska, S. L. Dagenais, T. W. Glover and D. J. Thiele (2000). "Isolation of a murine copper transporter gene, tissue specific expression and functional complementation of a yeast copper transport mutant." Gene **254**(1-2): 87-96.
- Lin, T. H., Y. L. Huang and M. Y. Wang (1998). "Arsenic species in drinking water, hair, fingernails, and urine of patients with blackfoot disease." J Toxicol Environ Health A **53**(2): 85-93.

- Lin, X., T. Okuda, A. Holzer and S. B. Howell (2002). "The copper transporter CTR1 regulates cisplatin uptake in *Saccharomyces cerevisiae*." Mol Pharmacol **62**(5): 1154-1159.
- Liu, Z., A. Li, V. Schulz, M. Chen and D. Tuck (2010). "MixHMM: inferring copy number variation and allelic imbalance using SNP arrays and tumor samples mixed with stromal cells." PLoS One **5**(6): e10909.
- Loudianos, G., V. Dessi, A. Angius, M. Lovicu, A. Loi, M. Deiana, N. Akar, P. Vajro, A. Figus, A. Cao and M. Pirastu (1996). "Wilson disease mutations associated with uncommon haplotypes in Mediterranean patients." Hum Genet **98**(6): 640-642.
- Loudianos, G., V. Dessi, M. Lovicu, A. Angius, B. Altuntas, R. Giacchino, M. Marazzi, M. Marcellini, M. R. Sartorelli, G. C. Sturniolo, N. Kocak, A. Yuce, N. Akar, M. Pirastu and A. Cao (1999). "Mutation analysis in patients of Mediterranean descent with Wilson disease: identification of 19 novel mutations." J Med Genet **36**(11): 833-836.
- Loudianos, G., V. Dessi, M. Lovicu, A. Angius, A. Figus, F. Lilliu, S. De Virgiliis, A. M. Nurchi, A. Deplano, P. Moi, M. Pirastu and A. Cao (1999). "Molecular characterization of wilson disease in the Sardinian population--evidence of a founder effect." Hum Mutat **14**(4): 294-303.
- Loudianos, G., V. Dessi, M. Lovicu, A. Angius, E. Kanavakis, M. Tzetis, C. Kattamis, N. Manolaki, G. Vassiliki, T. Karpathios, A. Cao and M. Pirastu (1998). "Haplotype and mutation analysis in Greek patients with Wilson disease." Eur J Hum Genet **6**(5): 487-491.
- Loudianos, G., V. Dessi, M. Lovicu, A. Angius, A. Nurchi, G. C. Sturniolo, M. Marcellini, L. Zancan, P. Bragetti, N. Akar, R. Yagci, A. Vegnente, A. Cao and M. Pirastu (1998). "Further delineation of the molecular pathology of Wilson disease in the Mediterranean population." Hum Mutat **12**(2): 89-94.
- Loudianos, G., V. Kostic, P. Solinas, M. Lovicu, V. Dessi, M. Svetel, T. Major and A. Cao (2003). "Characterization of the molecular defect in the ATP7B gene in Wilson disease patients from Yugoslavia." Genet Test **7**(2): 107-112.
- Loudianos, G., M. Lovicu, P. Solinas, E. Kanavakis, M. Tzetis, N. Manolaki, E. Panagiotakaki, T. Karpathios and A. Cao (2000). "Delineation of the spectrum of Wilson disease mutations in the Greek population and the identification of six novel mutations." Genet Test **4**(4): 399-402.
- Lutsenko, S., N. L. Barnes, M. Y. Bartee and O. Y. Dmitriev (2007). "Function and regulation of human copper-transporting ATPases." Physiol Rev **87**(3): 1011-1046.
- Ma, C., S. J. Mandrekar, S. R. Alberts, G. A. Croghan, A. Jatoi, J. M. Reid, L. J. Hanson, L. Bruzek, A. D. Tan, H. C. Pitot, C. Erlichman, J. J. Wright and A. A. Adjei (2007). "A phase I and pharmacologic study of sequences of the proteasome inhibitor, bortezomib (PS-341, Velcade), in combination with paclitaxel and carboplatin in patients with advanced malignancies." Cancer Chemother Pharmacol **59**(2): 207-215.

- Maluf, F. C., C. Cordon-Cardo, D. A. Verbel, J. M. Satagopan, M. G. Boyle, H. Herr and D. F. Bajorin (2006). "Assessing interactions between mdm-2, p53, and bcl-2 as prognostic variables in muscle-invasive bladder cancer treated with neo-adjuvant chemotherapy followed by locoregional surgical treatment." Ann Oncol **17**(11): 1677-1686.
- Margarit, E., V. Bach, D. Gomez, M. Bruguera, P. Jara, R. Queralt and F. Ballesta (2005). "Mutation analysis of Wilson disease in the Spanish population -- identification of a prevalent substitution and eight novel mutations in the ATP7B gene." Clin Genet **68**(1): 61-68.
- Masutani, C., K. Sugasawa, J. Yanagisawa, T. Sonoyama, M. Ui, T. Enomoto, K. Takio, K. Tanaka, P. J. van der Spek, D. Bootsma and et al. (1994). "Purification and cloning of a nucleotide excision repair complex involving the xeroderma pigmentosum group C protein and a human homologue of yeast RAD23." EMBO J **13**(8): 1831-1843.
- Mitra, A. P., A. A. Almal, B. George, D. W. Fry, P. F. Lenehan, V. Pagliarulo, R. J. Cote, R. H. Datar and W. P. Worzel (2006). "The use of genetic programming in the analysis of quantitative gene expression profiles for identification of nodal status in bladder cancer." BMC Cancer **6**: 159.
- Mitra, A. P., C. C. Bartsch and R. J. Cote (2009). "Strategies for molecular expression profiling in bladder cancer." Cancer Metastasis Rev **28**(3-4): 317-326.
- Mitra, A. P., M. Birkhahn and R. J. Cote (2007). "p53 and retinoblastoma pathways in bladder cancer." World J Urol **25**(6): 563-571.
- Mitra, A. P., R. H. Datar and R. J. Cote (2006). "Molecular pathways in invasive bladder cancer: new insights into mechanisms, progression, and target identification." J Clin Oncol **24**(35): 5552-5564.
- Miyamoto, H., T. Shuin, S. Torigoe, Y. Iwasaki and Y. Kubota (1995). "Retinoblastoma gene mutations in primary human bladder cancer." Br J Cancer **71**(4): 831-835.
- NCBI. (2008). "UniSTS." Retrieved 11/28/2008, 2008, from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=unists>.
- NCBI. (2009). "Nucleotide BLAST." Retrieved 16.06.2009, 2009, from http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE=Nucleotides&PROGRAM=blastn&MEGABLAST=on&BLAST_PROGRAMS=megaBlast&PAGE_TYPE=BlastSearch&SHOW_DEFAULTS=on&LINK_LOC=blasthome.
- Newkirk, K., J. Heffern, E. Sloman-Moll, R. B. Sessions, A. A. Rasmussen, P. A. Andrews and K. J. Cullen (1997). "Glutathione content but not gamma glutamyl cysteine synthetase mRNA expression predicts cisplatin resistance in head and neck cancer cell lines." Cancer Chemother Pharmacol **40**(1): 75-80.
- Oder, W., L. Prayer, G. Grimm, J. Spatt, P. Ferenci, H. Kollegger, B. Schneider, A. Gangl and L. Deecke (1993). "Wilson's disease: evidence of subgroups derived from clinical findings and brain lesions." Neurology **43**(1): 120-124.

- Ohga, T., K. Koike, M. Ono, Y. Makino, Y. Itagaki, M. Tanimoto, M. Kuwano and K. Kohno (1996). "Role of the human Y box-binding protein YB-1 in cellular sensitivity to the DNA-damaging agents cisplatin, mitomycin C, and ultraviolet light." Cancer Res **56**(18): 4224-4228.
- Olivarez, L., M. Caggana, K. A. Pass, P. Ferguson and G. J. Brewer (2001). "Estimate of the frequency of Wilson's disease in the US Caucasian population: a mutation analysis approach." Ann Hum Genet **65**(Pt 5): 459-463.
- Pasin, E., D. Y. Josephson, A. P. Mitra, R. J. Cote and J. P. Stein (2008). "Superficial bladder cancer: an update on etiology, molecular development, classification, and natural history." Rev Urol **10**(1): 31-43.
- Petronic, V. J., N. S. Bukurov, M. R. Djokic, D. Z. Milenkovic, A. M. Vuksanovic, A. D. Avramovic and D. P. Nale (1991). "Balkan endemic nephropathy and papillary transitional cell tumors of the renal pelvis and ureters." Kidney Int Suppl **34**: S77-79.
- Petrukhin, K., S. G. Fischer, M. Pirastu, R. E. Tanzi, I. Chernov, M. Devoto, L. M. Brzustowicz, E. Cayanis, E. Vitale, J. J. Russo and et al. (1993). "Mapping, cloning and genetic characterization of the region containing the Wilson disease gene." Nat Genet **5**(4): 338-343.
- Petrukhin, K., S. Lutsenko, I. Chernov, B. M. Ross, J. H. Kaplan and T. C. Gilliam (1994). "Characterization of the Wilson disease gene encoding a P-type copper transporting ATPase: genomic organization, alternative splicing, and structure/function predictions." Hum Mol Genet **3**(9): 1647-1656.
- Peyrone, M. (1844). "„Ueber die Einwirkung des Ammoniak auf Platinchlorür“." Justus Liebigs Annalen der Chemie **51**(1): 1-29.
- Reilly, M., L. Daly and M. Hutchinson (1993). "An epidemiological study of Wilson's disease in the Republic of Ireland." J Neurol Neurosurg Psychiatry **56**(3): 298-300.
- Rose, B. and R. Fletcher (2008). Evaluation of hematuria in adults. Waltham, MA, Uptodate.
- Rosenberg, B., L. Vancamp and T. Krigas (1965). "Inhibition of Cell Division in Escherichia Coli by Electrolysis Products from a Platinum Electrode." Nature **205**: 698-699.
- Rosin, M. P., P. Cairns, J. I. Epstein, M. P. Schoenberg and D. Sidransky (1995). "Partial allelotype of carcinoma in situ of the human bladder." Cancer Res **55**(22): 5213-5216.
- Rudin, C. M., Z. Yang, L. M. Schumaker, D. J. VanderWeele, K. Newkirk, M. J. Egorin, E. G. Zuhowski and K. J. Cullen (2003). "Inhibition of glutathione synthesis reverses Bcl-2-mediated cisplatin resistance." Cancer Res **63**(2): 312-318.
- Safaei, R. and S. B. Howell (2005). "Copper transporters regulate the cellular pharmacology and sensitivity to Pt drugs." Crit Rev Oncol Hematol **53**(1): 13-23.
- Sanchez-Carbayo, M., N. D. Socci, T. Kirchoff, N. Erill, K. Offit, B. H. Bochner and C. Cordon-Cardo (2007). "A polymorphism in HDM2 (SNP309) associates with early

- onset in superficial tumors, TP53 mutations, and poor outcome in invasive bladder cancer." Clin Cancer Res **13**(11): 3215-3220.
- Saridaki, Z., V. Georgoulas and J. Souglakos (2010). "Mechanisms of resistance to anti-EGFR monoclonal antibody treatment in metastatic colorectal cancer." World J Gastroenterol **16**(10): 1177-1187.
- Sarkis, A. S., G. Dalbagni, C. Cordon-Cardo, Z. F. Zhang, J. Sheinfeld, W. R. Fair, H. W. Herr and V. E. Reuter (1993). "Nuclear overexpression of p53 protein in transitional cell bladder carcinoma: a marker for disease progression." J Natl Cancer Inst **85**(1): 53-59.
- Sattler, T., T. Dimitrov and P. Hall (1977). "Relation between endemic (Balkan) nephropathy and urinary-tract tumours." Lancet **1(8006)**(Feb 5): 278-280.
- Sengelov, L., M. Christensen, H. D. von der Maase, T. Horn, N. Marcussen, C. Kamby and T. Orntoft (2000). "Loss of heterozygosity at 1p, 8p, 10p, 13q, and 17p in advanced urothelial cancer and lack of relation to chemotherapy response and outcome." Cancer Genet Cytogenet **123**(2): 109-113.
- Shah, A. B., I. Chernov, H. T. Zhang, B. M. Ross, K. Das, S. Lutsenko, E. Parano, L. Pavone, O. Evgrafov, I. A. Ivanova-Smolenskaya, G. Anneren, K. Westermarck, F. H. Urrutia, G. K. Penchaszadeh, I. Sternlieb, I. H. Scheinberg, T. C. Gilliam and K. Petrukhin (1997). "Identification and analysis of mutations in the Wilson disease gene (ATP7B): population frequencies, genotype-phenotype correlation, and functional analyses." Am J Hum Genet **61**(2): 317-328.
- Siemiatycki, J., L. Richardson, K. Straif, B. Latreille, R. Lakhani, S. Campbell, M. C. Rousseau and P. Boffetta (2004). "Listing occupational carcinogens." Environ Health Perspect **112**(15): 1447-1459.
- Sievert, K. D., B. Amend, U. Nagele, D. Schilling, J. Bedke, M. Horstmann, J. Hennenlotter, S. Kruck and A. Stenzl (2009). "Economic aspects of bladder cancer: what are the benefits and costs?" World J Urol **27**(3): 295-300.
- Simon, R., K. Struckmann, P. Schraml, U. Wagner, T. Forster, H. Moch, A. Fijan, J. Bruderer, K. Wilber, M. J. Mihatsch, T. Gasser and G. Sauter (2002). "Amplification pattern of 12q13-q15 genes (MDM2, CDK4, GLI) in urinary bladder cancer." Oncogene **21**(16): 2476-2483.
- Sinani, D., D. J. Adle, H. Kim and J. Lee (2007). "Distinct mechanisms for Ctrl1-mediated copper and cisplatin transport." J Biol Chem **282**(37): 26775-26785.
- Singh, A. K., T. L. Mashtare, S. A. McCloskey, S. A. Seixas-Mikelus, H. L. Kim and K. S. May (2010). "Increasing age and treatment modality are predictors for subsequent diagnosis of bladder cancer following prostate cancer diagnosis." Int J Radiat Oncol Biol Phys **78**(4): 1086-1094.
- Sobin, L. H., M. K. Gospodarowicz and C. Wittekind (2010). TNM classification of malignant tumours. Oxford, Wiley-Blackwell.

- Staaf, J., D. Lindgren, J. Vallon-Christersson, A. Isaksson, H. Goransson, G. Juliusson, R. Rosenquist, M. Hoglund, A. Borg and M. Ringner (2008). "Segmentation-based detection of allelic imbalance and loss-of-heterozygosity in cancer cells using whole genome SNP arrays." Genome Biol **9**(9): R136.
- Stein, J. P., D. A. Ginsberg, G. D. Grossfeld, S. J. Chatterjee, D. Esrig, M. G. Dickinson, S. Groshen, C. R. Taylor, P. A. Jones, D. G. Skinner and R. J. Cote (1998). "Effect of p21WAF1/CIP1 expression on tumor progression in bladder cancer." J Natl Cancer Inst **90**(14): 1072-1079.
- Sternberg, C. N., S. M. Donat, J. Bellmunt, R. E. Millikan, W. Stadler, P. De Mulder, A. Sherif, H. von der Maase, T. Tsukamoto and M. S. Soloway (2007). "Chemotherapy for bladder cancer: treatment guidelines for neoadjuvant chemotherapy, bladder preservation, adjuvant chemotherapy, and metastatic cancer." Urology **69**(1 Suppl): 62-79.
- Tanzi, R. E., K. Petrukhin, I. Chernov, J. L. Pellequer, W. Wasco, B. Ross, D. M. Romano, E. Parano, L. Pavone, L. M. Brzustowicz and et al. (1993). "The Wilson disease gene is a copper transporting ATPase with homology to the Menkes disease gene." Nat Genet **5**(4): 344-350.
- Therasse, P., S. G. Arbuck, E. A. Eisenhauer, J. Wanders, R. S. Kaplan, L. Rubinstein, J. Verweij, M. Van Glabbeke, A. T. van Oosterom, M. C. Christian and S. G. Gwyther (2000). "New guidelines to evaluate the response to treatment in solid tumors. European Organization for Research and Treatment of Cancer, National Cancer Institute of the United States, National Cancer Institute of Canada." J Natl Cancer Inst **92**(3): 205-216.
- Thomas, G. R., P. C. Bull, E. A. Roberts, J. M. Walshe and D. W. Cox (1994). "Haplotype studies in Wilson disease." Am J Hum Genet **54**(1): 71-78.
- Thomas, G. R., E. A. Roberts, J. M. Walshe and D. W. Cox (1995). "Haplotypes and mutations in Wilson disease." Am J Hum Genet **56**(6): 1315-1319.
- Todorov, T., A. Savov, H. Jeleu, E. Panteleeva, D. Konstantinova, Z. Krustev, V. Mihaylova, I. Tournev, L. Tankova, N. Tzolova and I. Kremensky (2005). "Spectrum of mutations in the Wilson disease gene (ATP7B) in the Bulgarian population." Clin Genet **68**(5): 474-476.
- Trzaska, S. (2005). "Cisplatin." C&EN News **83**(25).
- Tsai, S. M., T. N. Wang and Y. C. Ko (1998). "Cancer mortality trends in a blackfoot disease endemic community of Taiwan following water source replacement." J Toxicol Environ Health A **55**(6): 389-404.
- umd.be. (2009). "ATP7B Mutations Database." Retrieved 17.06.2010, 2010, from <http://www.umd.be/ATP7B/>.
- UniProt. (2010). "UniProt Knowledgebase." Retrieved 15.07.2010, 2010, from <http://www.uniprot.org/uniprot/P35670>.

- Voehringer, D. W. (1999). "BCL-2 and glutathione: alterations in cellular redox state that regulate apoptosis sensitivity." Free Radic Biol Med **27**(9-10): 945-950.
- von der Maase, H., S. W. Hansen, J. T. Roberts, L. Dogliotti, T. Oliver, M. J. Moore, I. Bodrogi, P. Albers, A. Knuth, C. M. Lippert, P. Kerbrat, P. Sanchez Rovira, P. Wersall, S. P. Cleall, D. F. Roychowdhury, I. Tomlin, C. M. Visseren-Grul and P. F. Conte (2000). "Gemcitabine and cisplatin versus methotrexate, vinblastine, doxorubicin, and cisplatin in advanced or metastatic bladder cancer: results of a large, randomized, multinational, multicenter, phase III study." J Clin Oncol **18**(17): 3068-3077.
- Vrabelova, S., O. Letocha, M. Borsky and L. Kozak (2005). "Mutation analysis of the ATP7B gene and genotype/phenotype correlation in 227 patients with Wilson disease." Mol Genet Metab **86**(1-2): 277-285.
- Weirich, G., A. D. Cabras, S. Serra, P. P. Coni, A. M. Nurchi, G. Faa and H. Hofler (2002). "Rapid identification of Wilson's disease carriers by denaturing high-performance liquid chromatography." Prev Med **35**(3): 278-284.
- Wikimedia. (2011, May 8, 2011). "Wikimedia Commons", 2011, from <http://commons.wikimedia.org/wiki/>.
- Williams, C. B. and J. P. Mitchell (1973). "Carcinoma of the renal pelvis: a review of 43 cases." Br J Urol **45**(4): 370-376.
- Williams, C. B. and J. P. Mitchell (1973). "Carcinoma of the ureter--a review of 54 cases." Br J Urol **45**(4): 377-387.
- Wilson, S. (1912). Progressive lenticular degeneration: a familial nervous disease associated with cirrhosis of the liver. Brain: 295-509.
- Wolf, H. K., C. Stober, R. Hohenfellner and J. Leissner (2001). "Prognostic value of p53, p21/WAF1, Bcl-2, Bax, Bak and Ki-67 immunoreactivity in pT1 G3 urothelial bladder carcinomas." Tumour Biol **22**(5): 328-336.
- Wooster, R., S. L. Neuhausen, J. Mangion, Y. Quirk, D. Ford, N. Collins, K. Nguyen, S. Seal, T. Tran, D. Averill and et al. (1994). "Localization of a breast cancer susceptibility gene, BRCA2, to chromosome 13q12-13." Science **265**(5181): 2088-2090.
- Xia, G., S. R. Kumar, D. Hawes, J. Cai, L. Hassanieh, S. Groshen, S. Zhu, R. Masood, D. I. Quinn, D. Broek, J. P. Stein and P. S. Gill (2006). "Expression and significance of vascular endothelial growth factor receptor 2 in bladder cancer." J Urol **175**(4): 1245-1252.
- Yang, X. L., N. Miura, Y. Kawarada, K. Terada, K. Petrukhin, T. Gilliam and T. Sugiyama (1997). "Two forms of Wilson disease protein produced by alternative splicing are localized in distinct cellular compartments." Biochem J **326** (Pt 3): 897-902.
- Zhang, S., K. S. Lovejoy, J. E. Shima, L. L. Lagpacan, Y. Shu, A. Lapuk, Y. Chen, T. Komori, J. W. Gray, X. Chen, S. J. Lippard and K. M. Giacomini (2006). "Organic

cation transporters are determinants of oxaliplatin cytotoxicity." Cancer Res **66**(17): 8847-8857.

Zhou, X. Z. and K. P. Lu (2001). "The Pin2/TRF1-interacting protein PinX1 is a potent telomerase inhibitor." Cell **107**(3): 347-359.

Zieger, K., N. Marcussen, M. Borre, T. F. Orntoft and L. Dyrskjot (2009). "Consistent genomic alterations in carcinoma in situ of the urinary bladder confirm the presence of two major pathways in bladder cancer development." Int J Cancer **125**(9): 2095-2103.

Danksagung

Ich danke zuallererst meinem Doktorvater und Betreuer PD Dr. med. Gregor Weirich, der mich mit viel Geduld, Freundlichkeit und Kompetenz bei meinen ersten wissenschaftlichen Gehversuchen unterstützt und geleitet hat.

Weiterhin danke ich Birgit Geist und Daniela Angermaier, die bei allen Fragen rund um Methoden immer ein freundliches und offenes Ohr für mich hatten. Den biologischen Doktoranden der anderen Arbeitsgruppen danke ich für den freundschaftlichen Umgang und guten Rat. Besonders Susanne Hipp und Kareen Blechschmidt haben mir viel geholfen.

Dr. med. Markus Groffmann und PD Dr. med. Uwe Treiber danke ich für die Erhebung der klinischen Daten sowie Dr. Tibor Schuster für die freundliche Hilfe bei der statistischen Planung und Auswertung.

Zu guter Letzt danke ich dem ganzen pathologischen Institut und dem Direktor, Prof. Dr. med. H. Höfler, dass ich in exzellenter Infrastruktur und Umgebung arbeiten durfte.