



TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Urologische Klinik und Poliklinik des Klinikums rechts der Isar der

Technischen Universität München

(Direktor: Univ. Prof. Dr. J. E. Gschwend)

**Detektion disseminierter Tumorzellen in Lymphknoten von Patienten mit
invasivem Harnblasenkarzinom im Rahmen der operativen Therapie mittels
radikaler Zystektomie und Lymphadenektomie durch quantitative Reverse
Transkriptase Polymerase-Kettenreaktion**

Kathrin J. Rathgeber

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. apl. Prof. Dr. M. Retz

2. Univ. Prof. Dr. J. E. Gschwend

Die Dissertation wurde am 18.08.2015 bei der Technischen Universität München eingereicht
und durch die Fakultät für Medizin am 06.04.2016 angenommen.

1	Abkürzungsverzeichnis	5
2	Einleitung.....	7
2.1	Das Harnblasenkarzinom	7
2.1.1	Epidemiologie	7
2.1.2	Ätiologie des Harnblasenkarzinoms	8
2.1.3	Pathogenese des Harnblasenkarzinoms.....	8
2.1.4	Stadieneinteilung des Harnblasenkarzinoms	9
2.1.5	Klinik und Diagnostik des Harnblasenkarzinoms.....	10
2.1.6	Stagingmethoden	12
2.1.7	Therapie und Nachsorge des Harnblasenkarzinoms	12
2.1.8	Prognose des Harnblasenkarzinoms	14
2.2	Molekulare Prognosemarker für das Harnblasenkarzinom	16
2.3	Molekulare Methoden zum Nachweis von disseminierten Tumorzellen.....	17
2.3.1	Definition „disseminierte Tumorzellen“	17
2.3.2	Tumor Dormancy und Metastasierung	17
2.3.3	Prognostischer Wert disseminierter Tumorzellen	18
2.3.4	Methoden zum Nachweis disseminierter Tumorzellen	19
2.4	Neue diagnostische und prognostische Marker für das Harnblasenkarzinom.....	19
2.4.1	Cytokeratin 20	20
2.4.2	Cytokeratin 17	21
2.4.3	FXD3.....	21
2.4.4	SPINK1	22
2.4.5	MUC5B.....	23
2.4.6	Uroplakin II	24
3	Fragestellung.....	26
4	Material und Methoden	27
4.1	Zellkultur.....	27
4.1.1	Material und Reagenzien für Zellkultur.....	27
4.1.2	Kultivierung von permanenten Blasenkarzinomzelllinien.....	28

4.1.3	Erstellen einer neuen Zellpassage	29
4.1.4	Herstellung von Zelllysaten für die RNA-Extraktion der Blasen-tumorzelllinien.....	29
4.2	Gewebe.....	30
4.2.1	Peripher venöses Blut von freiwilligen gesunden Spendern.....	30
4.2.2	Lymphknotengewebe	33
4.3	RNA Extraktion aus Lysaten der Lymphknoten, 17 Blasen-tumor-zelllinien, PBMCs und Zell-Verdünnungsreihe	38
4.3.1	Material und Reagenzien für die RNA Extraktion.....	38
4.3.2	Ablauf der RNA-Extraktion	38
4.3.3	Photometrische Bestimmung der RNA-Konzentration	40
4.4	Reverse Transkriptase Reaktion.....	40
4.4.1	Material und Reagenzien für die Reverse Transkriptase Reaktion	40
4.4.2	Prinzip der reverse Transkriptase Reaktion.....	41
4.4.3	Durchführung der reverse Transkriptase Reaktion	41
4.5	Quantitative Reverse Transkriptase Polymerase-Kettenreaktion (qRT-PCR).....	42
4.5.1	Material und Reagenzien für die qRT-PCR	42
4.5.2	Prinzip der Polymerase-Kettenreaktion	43
4.5.3	Durchführung der qRT-Polymerase-Kettenreaktion	46
4.5.4	Überprüfung der Sensitivität der Polymerasekettenreaktion.....	47
4.5.5	Auswertung der qRT-PCR	48
4.5.6	Überprüfung der Spezifität der qRT-PCR.....	50
4.6	Molekularbiologie – Klonierung der Sequenzen der Marker	50
4.6.1	Material und Reagenzien für die Klonierung.....	51
4.6.2	Prinzip des Klonierens	53
4.6.3	Durchführung der Klonierung.....	55
5	Ergebnisse.....	60
5.1	Klonierung der Gensequenzen von FXYD3, KRT17, KRT20, SPINK1 und UPKII.....	60
5.2	Sensitivität der qRT-PCR.....	60
5.3	Spezifität der qRT-PCR.....	61

5.4	Expression der Marker in Blasentumorzelllinien	62
5.5	Untersuchung der pelvinen Lymphknoten der Kontrollgruppe mittels qRT-PCR für FXYD3, KRT17, KRT20, MUC5B, SPINK1 und UPKII.....	66
5.6	Untersuchung der pelvinen Lymphknoten von Blasentumorpatienten mittels qRT-PCR für FXYD3, KRT17, KRT20, MUC5B, SPINK1 und UPKII	67
5.6.1	Beschreibung des Patientenkollektivs.....	67
5.6.2	Histopathologische und molekularbiologische Ergebnisse der Lymphknoten der Blasentumorpatienten	68
5.6.3	Topographie der Lymphknotenmetastasen im ausgedehnten Lymphadenektomiekollektiv	79
6	Diskussion.....	90
6.1	Neue prognostische Marker zum Nachweis disseminierter Tumorzellen in Lymphknoten von Harnblasenkarzinompatienten.....	90
6.2	Genexpression der Marker in Blasenkarzinomzelllinien.....	90
6.3	Bestimmung der Sensitivität der qRT-PCR.....	91
6.4	Methodische Probleme.....	92
6.4.1	Entnahme- und Aufarbeitungstechniken der pelvinen Lymphknoten.....	92
6.4.2	Methodische Probleme der qRT-PCR	93
6.5	Detektionsmethoden zum Nachweis disseminierter Tumorzellen in pelvinen Lymphknoten.....	94
6.6	Genexpression in der Kontrollgruppe und Festlegung der Grenzwerte.....	97
6.7	Genexpression der Marker in histopathologisch positiven (pN1/pN2) Lymphknoten	99
6.8	Genexpression der Marker in histopathologisch tumorfreien (pN0) Lymphknoten ...	101
6.9	Topographie der positiven Lymphknoten (pN1 und molN1)	104
7	Zusammenfassung.....	107
8	Literaturverzeichnis	110
	Danksagung.....	117

1 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

A.	Arteria
Aqua bidest.	Aqua bidestillata
ATCC	American Type Culture Collection
AUG	Ausscheidungsurogramm
bp	Basenpaar
Ca ²⁺	Calciumionen
cDNA	Copy-Desoxyribonukleinsäure
CIS	Carcinoma in situ
CK	Cytokeratin
CLS	Cell Line Service
Ct	Cycle threshold, Schwellenwert in der qRT-PCR
CT	Computertomographie
CTC	zirkulierende Tumorzellen
DMEM	Dulbecco's Mod Eagle Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
dNTP	2'-Desoxyribonukleoisid-5'-Triphosphat
DTC	Disseminierte Tumorzellen
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ePLND	Extendierte pelvine Lymphadenektomie
EAU	Europäische Assoziation für Urologie
FAM	Reporter-Farbstoff
FKS	Fetales Kälberserum
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
G1-G4	Histopathologische Dysplasiegrade in steigender Sortierung
HPA	Health protection agency
HPRT1	Hypoxanthinphosphoribosyltransferase 1
kB	Kilobase
KRT	Keratin
KRT17	Keratin 17
KRT20	Keratin 20
IHC	Immunhistochemie
LAE	Lymphadenektomie
L.B.-Platten	Luria-Bertani-Medium-Platten
Ln	Lymphknoten
MgCl ₂	Magnesiumdichlorid
M	molar
M0	kein Nachweis von Fernmetastasen

mm	Millimeter
moIN0	kein molekularer Nachweis einer (Mikro-)metastasierung
moIN1	molekularer Nachweis einer (Mikro-)metastasierung
M-Stadium	Vorhandensein von Metastasen
mRNA	Messenger Ribonukleinsäure
MRT	Magnetresonanztomographie
MUC5B	Muzin 5B
NTC	Non template Controle
N.	Nervus
N-Stadium	Vorhandensein regionärer Lymphknotenmetastasen
OD	optische Dichte
PBMC	periphere mononukleäre Zellen
PBS	phosphate buffered saline
PCR	Polymerasekettenreaktion
pN0	Keine Nachweis regionärer Lymphknotenmetastasen durch die Histopathologie
pN1	Nachweis einer regionären Lymphknotenmetastase
pN2	Nachweis mehrerer regionären Lymphknotenmetastasen
PLND	pelvine Lymphadenektomie
PSA	Prostata-spezifisches Antigen
pT	Ausdehnung des Primärtumors
qRT-PCR	quantitative oder realtime Polymerasekettenreaktion
RC	Radikale Cystektomie
RPMI	Zellkulturmedium, am Roswell Park Memorial Institute entwickelt
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Reverse Transkriptase
S.O.C.	<u>S</u> alzo <u>o</u> ptimiertes Medium mit Glucose + <u>C</u> arbon
Tris	Tri-(hydroxymethyl)-aminomethan
T-Stadium	Ausdehnung des Primärtumors
TUR-B	Transurethrale Resektion der Blase
U	Unit
UBC	Ubiquitin C
UICC	Union Internationale Contre le Cancer
UPKII	Uroplakin II
UV	Ultra Violett
V.	Vena
VIC	Quencher-Farbstoff
YWHAZ	Tyrosin-3-Monooxygenase
%	Prozent

2 EINLEITUNG

Ein positiver Lymphknotenstatus stellt den wichtigsten unabhängigen prognostischen Faktor für Tumorrezidiv und Mortalität nach Zystektomie bei Patienten mit Urothelkarzinom der Harnblase dar. Dennoch zeigt ein nicht geringer Teil der Patienten, deren Lymphknoten histopathologisch als tumorfrei beurteilt wurden, ein Tumorrezidiv innerhalb weniger Jahre. Der Nachweis disseminierter Tumorzellen in Lymphknoten von Blasenkarzinompatienten mittels molekularbiologischer Methoden ist ein vielversprechender Ansatz für eine sensitivere Diagnostik und eventuell auch eine bessere Risikostratifizierung jener Patienten, die einen histopathologisch negativen Lymphknotenstatus aufweisen. In unserer Studie werden Lymphknoten von Blasenkarzinompatienten auf das Vorhandensein disseminierter Tumorzellen mittels quantitativer Reverse Transkriptase Polymerasekettenreaktion untersucht.

2.1 Das Harnblasenkarzinom

2.1.1 Epidemiologie

Das Harnblasenkarzinom ist bei Frauen der häufigste, bei Männern nach dem Prostatakarzinom der zweithäufigste bösartige Tumor des Urogenitalsystems, wobei Männer im Schnitt drei Mal häufiger als Frauen erkranken. Mit einem Anteil von 4,6 % bei den Männern liegt das Harnblasenkarzinom in Deutschland hinter den malignen Neubildungen der Prostata, des Darmes und der Lunge auf Platz vier der häufigsten Tumorentitäten (Robert Koch Institut, 2012). Beim weiblichen Geschlecht liegt das Harnblasenkarzinom mit 2,0 % auf dem 13. Rang. Im Jahre 2008 traten deutschlandweit 11.460 Neuerkrankungsfälle beim männlichen und 4510 Neuerkrankungsfälle beim weiblichen Geschlecht auf. Das durchschnittliche Erkrankungsalter liegt beim Mann mit 73 Jahren etwas vor dem der Frau mit 77 Jahren. Das Risiko an einem Harnblasenkarzinom zu erkranken, steigt drastisch mit dem Alter an, so treten weniger als ein Prozent der Blasenkarzinomfälle vor dem 45. Lebensjahr auf (Lehmann, 2005). 2008 verstarben in Deutschland 3611 Männer und 1921 Frauen am Blasenkarzinom (Robert Koch Institut, 2012). Insgesamt ist eine steigende Neuerkrankungszahl zu verzeichnen, was an einer Zunahme des Anteils der älteren Menschen und dem damit verbundenen höheren Risiko des Auftretens eines Harnblasenkarzinoms liegt. In Entwicklungsländern tritt der Tumor rund sechs Mal seltener als in Industrieländern auf (Eble, 2004). Neben der nicht unerheblichen epidemiologischen Relevanz, ist auch der ökonomische Aspekt der Blasenmalignome zu bedenken. So konnte 2003 der Blasenkrebs als der Krebs mit den höchsten Ausgaben für die Behandlung vom Diagnosezeitpunkt bis hin zum Tod des Patienten identifiziert werden (Botteman, Pashos, Redaelli, Laskin, & Hauser, 2003).

2.1.2 Ätiologie des Harnblasenkarzinoms

Wichtigster Risikofaktor für die Entwicklung eines Urothelkarzinoms scheint der Zigarettenkonsum zu sein (Kuper, Boffetta, & Adami, 2002; Zeegers, Kellen, Buntinx, & van den Brandt, 2004). Etwa die Hälfte aller Urothelkarzinome beim Mann und rund ein Viertel aller Fälle beim weiblichen Geschlecht sind dadurch bedingt (Freedman, Silverman, Hollenbeck, Schatzkin, & Abnet, 2011; Volanis et al., 2010; Zeegers et al., 2004). Das relative Risiko für das Auftreten eines Harnblasenkarzinoms bei Rauchern ist um das zwei- bis sechsfache höher als bei Nichtrauchern und steigt linear mit der Dauer gegenüber Tabakexposition (Brennan et al., 2000; Zeegers et al., 2004). Hierfür werden die im Tabakrauch enthaltenen β -Naphthylamine und polyzyklischen Kohlenwasserstoffe verantwortlich gemacht. Auch der Kontakt zu industriellen biogenen aromatischen Aminen, wie sie in der Farbstoff-, Textil, Gummi- und Aluminiumherstellung verwendet werden, konnte als Risikofaktor aufgezeigt werden (Colt et al., 2011). Die Latenzzeit zwischen dem Einwirken der Noxe und Auftreten der Krankheit beträgt im Durchschnitt 24 Jahre.

Es konnten auch iatrogene Risikofaktoren identifiziert werden. Der Einsatz von einigen Medikamenten steht im Zusammenhang mit der Ausbildung eines Harnblasenkarzinoms. Zu erwähnen sind das Chemotherapeutikum Cyclophosphamid, das Polyzythämietherapeutikum Chlornaphazin und das Analgetikum Phenacetin (Fairchild, Spence, Solomon, & Gangai, 1979; McCredie, Stewart, Ford, & MacLennan, 1983). Ebenso zeigten Patienten mit Bestrahlung im Beckenbereich ein erhöhtes Risiko für das Auftreten eines Blasenmalignoms (Huland, 2006).

Nitrosaminen, welche unter anderem im Rahmen infektiöser Prozesse entstehen können, wurden ebenfalls als Kanzerogene beschrieben. So zeigte sich eine Assoziation zwischen chronisch entzündlichen Prozessen der Blase (chronisches Blasensteineiden und rezidivierende Harnwegsinfekte) und der Blasentumorentwicklung (Calmels, Ohshima, Vincent, Gounot, & Bartsch, 1985).

2.1.3 Pathogenese des Harnblasenkarzinoms

Mit einer Häufigkeit von circa 95 % bildet das Urothelkarzinom den größten Teil der Harnblasentumore (Rübben H., 2009). Bei den restlichen fünf Prozent handelt es sich um Plattenepithel- und Adenokarzinome oder noch seltenere Tumorentitäten wie Sarkome, Karzinoide oder Melanome.

Zwei Hauptwachstumsformen können beim Urothelkarzinom unterschieden werden. Etwa 80 % der Patienten haben zum Zeitpunkt der Erstdiagnose einen primär oberflächlich wachsenden Tumor mit rein papillärem Wachstumsmuster (Tumorstadium pTa, pT1) (Dorp, 2007), bei circa 20 % der Patienten ist zum Diagnosezeitpunkt bereits ein muskelinvasives

Wachstum feststellbar (pT2, pT3, pT4). In etwa 10-15 % der Fälle mit zunächst oberflächlichem Tumorwachstum kommt es im Verlauf zu einer Infiltration tieferer Schichten mit muskelinvasivem Wachstum.

Molekulargenetisch gilt es zwei Entwicklungswege bei der Tumor-Genese zu differenzieren (Castillo-Martin, Domingo-Domenech, Karni-Schmidt, Matos, & Cordon-Cardo, 2010): einerseits sind „gain of function“ Mutationen der Onkogene RAS, Fibroblasten-Wachstumsfaktor-Rezeptor-3 und Phosphatidyinositol-3-Kinase aber auch Deletionen am langen Arm des Chromosoms 9 an der Entstehung von Blasenkarzinomen beteiligt. Andererseits können auch „loss of function“ Mutationen der Tumorsuppressorgene p53, Retinoblastom und PTEN zur Entstehung eines Urothelkarzinoms beitragen.

2.1.4 Stadieneinteilung des Harnblasenkarzinoms

Die Einteilung der Tumorstadien des Harnblasenkarzinoms wird anhand der TNM-Klassifikation der Union international contre le cancer (UICC) (Staging) (Sobin & Wittekind, 2010) und des Differenzierungsgrades der Tumorzellen (Grading) vorgenommen (Tab. 1).

Tabelle 1: TNM-Klassifikation des Harnblasenkarzinoms

TNM Klassifikation	
<u>T</u> Ausdehnung des Primärbefundes	
Tx	Primärtumor kann nicht beurteilt werden
T0	Kein Anhalt für einen Primärtumor
Ta	Nicht-invasives papilläres Karzinom, auf die Mukosa beschränkt
Tis	Carcinoma in situ, kein Überschreiten der Basalmembran
T1	Tumor infiltriert subepitheliales Bindegewebe, auf die Lamina propria beschränkt
T2	Tumorinfiltration in die Muskulatur
T2a	Tumorinfiltration in die oberflächliche Muskulatur (innere Hälfte der lamina muscularis)
T2b	Tumorinfiltration in die tiefe Muskulatur (äußere Hälfte der lamina muscularis)
T3	Tumorinfiltration in das perivesikale Gewebe
T3a	Mikroskopische Gewebeinfiltration
T3b	Makroskopische Gewebeinfiltration
T4	Tumorinfiltration in angrenzende Strukturen:
T4a	Tumorinfiltration in Prostata, Uterus oder Vagina

T4b	Tumorinfiltration in Becken- oder Bauchwand
<u>N</u> Regionale Lymphknoten	
NX	Regionäre Lymphknoten können nicht beurteilt werden
N0	Kein Hinweis auf regionären Lymphknotenmetastasen
N1	Metastase eines solitären Lymphknoten: hypogastrisch, obturatorisch, extern iliakal, präsakral
N2	multiple Lymphknotenmetastasen : hypogastrisch, obturatorisch, extern iliakal, präsakral
N3	Lymphknotenmetastasen entlang der Aa. Iliacae communes
<u>M</u> Fernmetastasen	
MX	Fernmetastasen können nicht beurteilt werden
M0	Kein Hinweis auf Fernmetastasen
M1	Fernmetastasen
<u>G</u> Differenzierungsgrad der Tumorzellen (Grading)	
G1	gut differenziert
G2	mäßig differenziert
G3	schlecht differenziert
<u>R</u> Residualtumors nach operative Intervention	
R1	mikroskopisch erkennbare Tumorreste nach Operation
R2	makroskopisch erkennbare Tumorreste nach Operation

2.1.5 Klinik und Diagnostik des Harnblasenkarzinoms

Häufigstes Symptom des Harnblasenkarzinoms ist die schmerzlose Makrohämaturie. Zeitlich etwas früher, für den Patienten jedoch nicht bemerkbar, tritt in den meisten Fällen eine Mikrohämaturie auf. Hierbei handelt es sich um den Nachweis von mindestens drei Erythrozyten im Hauptgesichtsfeld des Mikroskops in zwei von drei Urinsedimenten (Grossfeld et al., 2001). Andere, jedoch weitaus seltenere Beschwerden können Dysurie, Pollakisurie und Drangsymptomatik sein. Ein Wachstum im Bereich der Ureterostien kann über eine Harnstauungsniere eventuell zu Schmerzen im Bereich der Flanken führen. Dieses Symptom kann Ausdruck einer bereits fortgeschrittenen Tumorerkrankung sein. Knochenschmerzen können auf ein bereits metastasiertes Tumorleiden hinweisen. Da es kein pathognomonisches Symptom für das Harnblasenkarzinom gibt und alle Symptome relativ uncharakteristisch sind,

resultiert häufig eine verzögerte Diagnosestellung und damit verbundene schlechtere Prognose für den Patienten (Rübben H., 2009).

Standard-Diagnostik bei Verdacht auf ein Harnblasenkarzinom sind Urin-Stix, Sonografie, Zystoskopie, intravenöses Ausscheidungsurogramm (AUG) oder CT-AUG. Erhärtet sich der Verdacht einer Raumforderung in der Zystoskopie, erfolgt eine transurethrale Resektion des auffälligen Areals, um eine Aussage über die histologische Artung treffen zu können.

Daher ist bei Patienten mit Hämaturie und Verdacht auf einen Blasentumor die transurethrale Resektion der Blase (TUR-B) nach wie vor Mittel der Wahl (Gorin, Ayyathurai, & Soloway, 2012). Die Sensitivität der konventionellen Weißlich-Zystoskopie, welche bei 70 – 80 % liegt (Jocham, Stepp, & Waidelich, 2008), ist dabei stark von der Art des Tumors abhängig: exophytisch wachsende Tumore sind in der Blasenspiegelung in den meisten Fällen gut darstellbar, aber gerade Tumoren, die im Niveau des Urothels wachsen, sogenannte Carcinoma in situ (CIS), bleiben dem Untersucher häufig während der initialen Spiegelung verborgen. Die damit verbundene spätere Therapieeinleitung ist dafür verantwortlich, dass gerade Patienten mit einem CIS eine schlechtere Prognose aufweisen (Müller, 1999). Eine Steigerung der Sensitivität auf 89 – 98 % konnte durch die Einführung der Fluoreszenz-Zystoskopie erzielt werden (Jocham et al., 2008). Bei dieser Methode wird dem Patienten zwei Stunden vor der eigentlichen Blasenspiegelung über einen Katheter ein Photosensitizer (Delta-Aminolävulinsäure oder Hexylester) in die Blase instilliert. Insbesondere Patienten mit einem CIS profitieren von dieser Methode. Neben der Biopsieentnahme auffälliger Areale wird im Rahmen der Zystoskopie im Anschluss eine transurethrale Resektion durchgeführt.

Während die Zystoskopie eine recht invasive Methode in der Blasen Tumordiagnostik darstellt, ist Urinzytologie eine nichtinvasive Methode zur Diagnostik des Harnblasenkarzinoms. Die Spezifität liegt bei über 90 %, die Sensitivität abhängig von der Art des Tumors allerdings nur bei 20 – 80 % (Konety & Getzenberg, 2001), wobei höhere Werte in der Sensitivität bei Tumoren mit stärkerer Entdifferenzierung resultieren. Zur Steigerung der diagnostischen Genauigkeit, wurden zahlreiche sogenannte uringebundene Markersysteme entwickelt und bezüglich ihrer Wertigkeit in der Primärdiagnostik und Tumornachsorge getestet (BTA-TRAK, BTA-stat-Test, NMP-22-Test, UBC-Test und CYFRA-Test).

Gerade bei Patienten mit nicht-malignen urologischen Erkrankungen wie Blasensteinleiden oder Harnwegsinfektionen zeigten sich falsch positive Werte. Zudem ist auch die Aussagekraft über das Vorliegen eines Urothelkarzinoms stark abhängig von der Tumorentdifferenzierung. Erst mit steigender Entdifferenzierung und zunehmender Invasionstiefe konnten akzeptable Sensitivitätswerte erzielt werden. Da aber ein Großteil der Tumorpatienten zum Diagnosezeitpunkt eine geringere Entdifferenzierung aufweist, würde dieses Kollektiv nicht suffizient abgedeckt werden. Die hier erwähnten uringebundenen Markersysteme sind aufgrund ihrer Unzuverlässigkeit nach wie vor kein Bestandteil der Routinediagnostik.

2.1.6 Stagingmethoden

Liegt ein bereits fortgeschrittenes Tumorleiden vor, werden zusätzliche bildgebende Verfahren zum Staging wie CT- oder Kernspintomographie (MRT)- Aufnahmen vom Abdomen, Skelettszintigraphie oder Röntgen-Thorax in zwei Ebenen notwendig. Eine Beurteilung des Lymphknotenstatus des Patienten durch die aktuellen bildgebenden Verfahren ist nur eingeschränkt möglich. Lymphknoten im kleinen Becken mit einer Größe von über acht Millimeter und im Abdominalbereich von über zehn Millimeter gelten im CT als suspekt (Dorfman, Alpern, Gross, & Sandler, 1991). Die Sensitivitätswerte für das CT und MRT sind annähernd ähnlich und liegen zwischen 48 % und 87 % (Jager, Barentsz, Oosterhof, Witjes, & Ruijs, 1996; Kim, Park, Ahn, Kim, & Cho, 2004). Ähnlich niedrig sind die Spezifitätswerte, da auch nichtmaligne Erkrankungen ebenfalls zu einer Vergrößerung von Lymphknoten führen können. Daher eignen sich diese Verfahren allenfalls zur groben Orientierung über den aktuellen Lymphknotenstatus des Patienten. Eine definitive Aussage kann durch sie nicht getroffen werden.

Im Falle des Verdachts einer Fernmetastasierung wird routinemäßig ein CT des Patienten angefertigt, um Information über etwaige Organmetastasen in Leber und Lunge zu erhalten. Eine Knochenszintigraphie sowie eine Bildgebung vom Kopf finden nur bei entsprechender Klinik des Patienten und konkretem Verdacht statt (Carmack & Soloway, 2006).

Die aktuellen bildgebenden Verfahren sind in ihrer Aussagekraft bezüglich einer Metastasierung insbesondere in Lymphknoten relativ limitiert. Zum einen sind sie nicht ausreichend in der Lage, zwischen nicht-maligner entzündlich bedingter Lymphknotenvergrößerung und tumorbedingter Vergrößerung zu differenzieren. Zum anderen ist gerade ein Nachweis von kleineren Verbänden von disseminierten Tumorzellen oder gar der Nachweis einer einzelnen Tumorzelle durch diese Methoden nicht möglich.

2.1.7 Therapie und Nachsorge des Harnblasenkarzinoms

2.1.7.1 Radikale Zystektomie

Goldstandard in der Therapie des lokal fortgeschrittenen Harnblasenkarzinoms (T2a - T4a), Nx, M0 stellt die radikale Zystektomie mit bilateraler Entnahme der pelvinen Lymphknoten dar (Frohneber, 2007). Weitere Indikation zur radikalen Zystektomie stellen Tumorrezidive oberflächlicher Tumoren sowie high risk Tumoren beim oberflächlichen Harnblasenkarzinom dar. Die radikale Zystektomie umfasst neben der vollständigen Entfernung der Harnblase sowie des perivesikalen Fettgewebes inklusive aller pelvinen Lymphknoten beim Mann zusätzlich die Resektion von Prostata, Samenblase und proximalen Samenleitern. Bei der Frau werden zusätzlich der Uterus, die Adnexe sowie das proximale ventrale Scheidendrittel

reseziert. In den meisten Fällen erfolgt ein Harnblasenersatz mittels orthotoper Neonblase als kontinente Harnableitung oder ein Ileum-Conduit als inkontinente Form der Harnableitung (Hautmann et al., 2007).

2.1.7.2 Eingeschränkte versus ausgedehnte Lymphadenektomie

Bezüglich der Größe des Lymphadenektomiefelds herrscht nach wie vor Uneinigkeit. Prinzipiell werden zwei Arten der Lymphadenektomie unterschieden: die Lymphadenektomie im eingeschränkten Feld und die Lymphadenektomie im ausgedehnten Feld. Dabei umfasst erstere die Lymphknoten im kleinen Becken entlang der Gefäße kranial bis zur Bifurkation der Aa. Iliacae communes in die Aa. Iliacae externae und Aa. Iliacae internae, sowie präsakrale und obturatorische Lymphknoten. Das ausgedehnte Feld beinhaltet neben den Lymphknoten des eingeschränkten Feldes zusätzlich die Lymphknoten bis hin zur Bifurkation der Aorta in die beiden Aa. Iliacae communes (Babjuk, 2012).

Zahlreiche Studien berichten von einem Upstaging-Effekt durch eine ausgedehnte Lymphadenektomie (Jensen, Ulhoi, & Jensen, 2010; Leissner et al., 2004; Poulsen, Horn, & Steven, 1998; Vazina et al., 2004). Leissner et al. konnten zeigen, dass 55 % der Lymphknotenmetastasen im eingeschränkten Lymphadenektomiefeld und 45 % außerhalb dieses Feldes liegen (Leissner et al., 2004). So steigt mit Anzahl und Ausmaß der entfernten Lymphknoten die Anzahl an pN1 oder pN2 befundenen Patienten. Andere Studien hingegen konnten keine Korrelation zwischen der Zahl von entfernten Lymphknoten und der Zahl von pNx beurteilten Patienten feststellen (Bochner et al., 2004). Zum aktuellen Zeitpunkt existieren Hinweise auf einen therapeutischen Effekt der ausgedehnten Lymphadenektomie. Dhar et al. konnten ein statistisch signifikant besseres Überleben der Patienten mit ausgedehnter gegenüber der Patienten mit eingeschränkter Lymphadenektomie feststellen (Dhar et al., 2008). Jedoch sind auch die Nachteile einer ausgedehnten Lymphadenektomie zu bedenken. Ein vermehrtes Auftreten postoperativer Komplikationen wie Lymphozelen, Lymphödeme oder Harninkontinenz durch Beschädigung von Nerven sind möglich (Thurairaja, Studer, & Burkhard, 2009). Dennoch konnten zahlreiche Studien eine vergleichbare Komplikationsrate in ausgedehnter und eingeschränkter Lymphadenektomie aufzeigen (Leissner et al., 2004; Leissner, Hohenfellner, Thuroff, & Wolf, 2000; Steven & Poulsen, 2007).

2.1.7.3 Chemotherapie

Trotz lokaler Tumorkontrolle durch die radikale Entfernung tumorinfiltrierter Strukturen, weisen Patienten mit muskelinvasivem Harnblasenkarzinom ein erhöhtes Risiko für ein systemisches Fortschreiten der Krankheit auf. Etwa 50 % aller Patienten erliegen innerhalb der folgenden

fünf Jahre dem Krebsleiden (Stein & Skinner, 2006). Es wird geschätzt, dass etwa die Hälfte der Patienten bereits zum Operationszeitpunkt okkulte Metastasen besitzt (Huland, 2006). Daher erhalten jene Patienten eine systemische Polychemotherapie. Goldstandard stellt hierbei die neoadjuvante Chemotherapie dar. Aufgrund der unklaren Studienlage bezüglich einer adjuvanten Chemotherapie rät die „European Association for Urology“ (EAU) derzeit von einer adjuvanten Therapie außerhalb von Studien ab. Das in den 90er Jahren verwendete MVAC-Schema (Kombination aus Methotrexat, Vinblastin, Adriamycin = Doxorubicin, Cisplatin) wurde weitestgehend von einer Gemcitabin/ Cisplatin-Kombination verdrängt, da diese bei vergleichbarer Wirksamkeit ein geringeres Nebenwirkungsprofil aufweist (von der Maase et al., 2005). Durch eine solche Therapie kann das Überleben der Patienten mit metastasiertem Karzinom von drei bis sechs Monaten ohne Therapie auf bis zu 14 Monate mit Chemotherapie gesteigert werden (Sternberg & Vogelzang, 2003).

Abhängig vom Tumorstadium zeigen sieben bis 12 % der Patienten ein lokales Tumorrezidiv (Hautmann, Gschwend, de Petriconi, Kron, & Volkmer, 2006). Dieses tritt hauptsächlich während der folgenden zwei Jahre nach operativer Intervention auf. Ungefähr 30 % der Patienten bilden im Laufe Fernmetastasen in Lunge, Leber und Knochen aus (Ghoneim et al., 2008; Madersbacher et al., 2003). Um die Entwicklung eines Rezidivs möglichst frühzeitig zu detektieren, schlagen die allgemeinen Nachsorgeempfehlungen die regelmäßige Durchführung von Urinzytologie, Laborkontrollen, CT- und Röntgen-Thoraxaufnahmen innerhalb der ersten fünf Jahre vor. Da ein Rezidiv jenseits der 5-Jahres-Grenze recht unwahrscheinlich ist, kann danach von einer strikten regelmäßigen ärztlichen Tumornachsorge abgesehen werden (Babjuk, 2012).

2.1.8 Prognose des Harnblasenkarzinoms

Die 5-Jahres-Überlebensrate beim Harnblasenkarzinom liegt bei rund 50 % (Robert Koch Institut, 2012).

Wichtigster Prognosefaktor für das Überleben von Blasentumorpatienten ist der Lymphknotenstatus. Patienten mit nachgewiesenen Lymphknotenmetastasen haben ein signifikant schlechteres Überleben als Patienten ohne Lymphknotenmetastasen (Stein et al., 2001). Nicht nur der Lymphknotenstatus selbst, sondern auch die Anzahl betroffener Lymphknoten scheint einen Einfluss auf das Überleben der Patienten zu haben. Patienten mit mindestens fünf positiven Lymphknoten haben ein signifikant schlechteres Überleben als Patienten mit weniger als fünf positiven Lymphknoten (Stein et al., 2001). Hier ist auch der Begriff der Lymphknoten-Dichte zu erwähnen. Dabei handelt es sich um den Quotienten aus der Anzahl positiver Lymphknoten und der Gesamtzahl entnommener Lymphknoten. Eine

Dichte von weniger als 20 % ist mit einer besseren Prognose assoziiert (May et al., 2011; Steven & Poulsen, 2007).

Auch die Anzahl an entfernten Lymphknoten im Rahmen der Lymphadenektomie ist ein Prognosefaktor für die Blasentumorpatienten. Patienten, denen mehr als 15 Lymphknoten entfernt wurden, wiesen einen signifikant erhöhten Überlebensvorteil gegenüber denen mit weniger als 14 entfernten Lymphknoten unabhängig vom Lymphknotenbefall auf (Leissner et al., 2000). Diese Ergebnisse konnten teilweise durch Resultate einer Studie um Honma bestätigt werden. Jedoch zeigte sich dort dieser Effekt nur bei lymphknotenpositiven Patienten (Honma et al., 2006). Auch die Größe des Lymphadenektomiefelds besitzt prognostischen Wert (Dhar et al., 2008). Das rezidivfreie 5-Jahres-Überleben für Patienten mit lymphknotenpositivem Befund betrug im Kollektiv der eingeschränkten Lymphadenektomie sieben Prozent, für Patienten mit ausgedehnter Lymphknotenresektion 35 %. Auch bei lymphknotennegativen Patienten mit T2- und T3-Tumoren zeigten sich niedrigere Rezidivraten für die Patienten mit ausgedehnter Lymphadenektomie. Die Frage warum in retrospektiven Studien Patienten mit ausgedehnter Lymphadenektomie einen Überlebensvorteil aufweisen, konnte bis zum jetzigen Punkt noch nicht ausreichend geklärt werden. Autenrieth et al. ziehen zwei Gründe dafür in Erwägung (Autenrieth, Nawroth, Semmlack, Gschwend, & Retz, 2008): Eventuell liegt der Überlebensvorteil in der Entfernung bis dato noch nicht entdeckter Lymphknotenmikrometastasen. Oder aber durch eine steigende Zahl an entfernten Lymphknoten steigt auch die Wahrscheinlichkeit der Lymphknotenmetastasendetektion. Dies bedeutet, dass die Patienten dadurch einem höheren Tumorstadium zugeordnet werden (Stadienmigration) und eine dem Tumorstadium adäquate Therapie erhalten.

Die Beobachtung, dass Patienten mit ausgedehnter Lymphadenektomie eine geringere Rezidivrate aufweisen, lässt sich mit den Ergebnissen zahlreicher Studien zum Mapping der Sentinellymphknoten vereinbaren, wo gezeigt werden konnte, dass ein Großteil der Sentinellymphknoten außerhalb des eingeschränkten Lymphadenektomiegebietes liegt (Liedberg, Chebil, Davidsson, Gudjonsson, & Mansson, 2006; Sherif, De La Torre, Malmstrom, & Thorn, 2001; Stein & Skinner, 2005).

Bis zum jetzigen Zeitpunkt gibt es aufgrund mangelnder Datenlage mit ausschließlich retrospektiven Studien allerdings noch keine Standardisierung bezüglich der Ausdehnung der pelvinen Lymphadenektomie bei der operativen Therapie des muskel-invasiven, organbegrenzten Harnblasenkarzinoms. Prospektive Studien sind daher zwingend notwendig. Im Rahmen der LEA-Studie der Arbeitsgemeinschaft der urologischen Onkologie (AUO) der Deutschen Krebsgesellschaft soll erstmals in einer prospektiv, randomisierten Studie das progressionsfreie Überleben der Harnblasenkarzinompatienten abhängig von der Größe des Lymphadenektomiefelds untersucht werden. Die Patientenrekrutierung ist inzwischen abgeschlossen und die Patienten befinden sich aktuell in der Nachsorge (Autenrieth, Retz, &

Gschwend, 2011). Unsere Studie stellt ein wissenschaftliches Begleitprogramm zu jener Studie dar.

Als weiterer Prognoseparameter für verringertes Überleben der Tumorpatienten gilt die Infiltrationstiefe (T-Stadium) (Takahashi et al., 2004). So sinkt das 5-Jahres-Überleben bei lymphknotennegativen T2-Patienten von 67 % auf 38 % bei T4-Patienten. Unabhängig vom Tumorstadium besitzen Patienten mit Lymphknotenmetastasen das geringste 5-Jahresüberleben mit 30 %.

Zudem ist die Prognose des Harnblasenkarzinoms vom Zeitpunkt der radikalen Zystektomie abhängig. Bereits eine um 12 Wochen verzögerte radikale Zystektomie nach Diagnosestellung zeigte einen statistischen Zusammenhang für eine erhöhte krebsspezifische und Gesamt-Mortalität (Gore et al., 2009).

Es zeichnet sich ab, dass der Lymphknotenstatus der Patienten einer der wichtigsten Prognosefaktoren für das Überleben der Blasentumorpatienten ist. Einige Patienten mit lokal begrenztem Tumorwachstum und keinem histopathologischen Nachweis von Lymphknotenmetastasen entwickeln dennoch nach radikaler Zystektomie eine systemische Tumorprogression (Stein et al., 2001). Eine mögliche Erklärung hierfür ist das Vorhandensein von zum Zeitpunkt der Operation bereits vorhandenen, durch histopathologische Methoden aber nicht detektierten Lymphknotenmikrometastasen.

Eine Detektion disseminierter Tumorzellen in verschiedenen Geweben wie Knochenmark, Blut und Lymphknoten stellt einen wichtigen Ansatzpunkt zur weiteren Risikostratifizierung von histopathologisch N0 beurteilten Tumorpatienten dar. Ein mögliches Verfahren hierzu ist reverse-Transkriptase Polymerase-Kettenreaktion, mit welcher Gewebe auf der genetischen Ebene auf die Expression verschiedener tumorspezifischer Gene mittels molekularer Marker untersucht werden kann. Diese Art der Untersuchung ist Gegenstand vorliegender Arbeit.

2.2 Molekulare Prognosemarker für das Harnblasenkarzinom

Informationen über die klassischen histopathologischen Kriterien wie Grading, Infiltrationstiefe und Metastasennachweis in Lymphknoten sind nach wie vor Mittel der Wahl zur Risikoabschätzung von Tumorpatienten bezüglich des Rezidivverhaltens und des Prognoseverlaufs. Im Laufe der letzten Jahre wurde eine Vielzahl an molekularen Prognosemarkern auf ihre Wertigkeit bezüglich ihrer Aussagekraft zur Risikoabschätzung getestet. Der Nachweis solcher molekularer Prognosemarker kann in verschiedenen Materialien und Geweben erfolgen: direkt im Tumorgewebe, in Lymphknoten, im Knochenmark, in peripherem Blut aber auch im Urin. Am wenigsten invasiv ist die Verwendung von Urin als Untersuchungsmaterial.

2.3 Molekulare Methoden zum Nachweis von disseminierten Tumorzellen

2.3.1 Definition „disseminierte Tumorzellen“

Da ein Teil der histopathologisch lymphknotennegativen Blasen tumorpatienten ein Rezidiv innerhalb weniger Jahre erleidet, geht man von bereits zum Zeitpunkt der Operation vorhandenen okkulten Mikrometastasen oder disseminierten Tumorzellen aus. In der sechsten Version des AJCC/UICC Krebsstaging Manuals werden Mikrometastasen wie folgt definiert: Es handelt sich um 0,2 bis zwei Millimeter große Absiedlungen von Tumorzellen in andere Organe mit fakultativem Nachweis maligner Aktivität wie Stromareaktion oder Proliferation (Greene, 2002). Da sie der klassischen Bildgebung nicht zugänglich sind, spricht man hier auch von okkulten Metastasen (Hermanek, 1999). Noch kleineren Absiedlungen (< 0,2 mm) werden als isolierte Tumorzellen bezeichnet (Singletary, Greene, & Sobin, 2003). Es handelt sich um Tumorzellen, deren Aufenthaltsort auf das Blutgefäß- und Lymphsystem beschränkt ist. Solche Zellen zeigen gewöhnlicher Weise keine Proliferations- oder Stromareaktion; eine Penetration von Blut- oder Lymphgefäßen hat noch nicht stattgefunden. Sobald ein Nachweis solcher Zellen mittels Immunhistochemie oder anderer molekularbiologischer Methoden erfolgt ist, spricht man abhängig vom untersuchten Material beim Knochenmark und Lymphknoten von disseminierten Tumorzellen (DTC, engl. disseminated tumor cells), bei freier Zirkulation im Blut von zirkulierenden Tumorzellen (CTC, engl. circulating tumor cells).

2.3.2 Tumor Dormancy und Metastasierung

Haupttodesursache von Krebspatienten ist die Ausbildung von Metastasen. Ein Teil der Patienten entwickelt diese bereits kurz nach Diagnosestellung und eingeleiteter Therapie. Dies lässt vermuten, dass diese Läsionen bereits zum Diagnosezeitpunkt vorhanden waren und kurz danach ein exponentielles Wachstum initiierten. Bei einem anderen Teil der Patienten tritt erst Jahre nach einer krankheitsfreien Phase ein Tumorrezidiv auf. Man geht davon aus, dass dieses Phänomen durch die sogenannte „Tumor dormancy“ verursacht wird (Patel & Chen, 2012). Hierbei handelt es sich um Tumorzellen, die sich bereits vom Primärtumor gelöst haben und dann in einer Art Ruhezustand im Körper verweilen (Sosa, Bragado, Debnath, & Aguirre-Ghiso, 2013). Dadurch dass sich diese Zellen in einem Ruhezustand befinden, sind sie allerdings weder für die Chemo- noch für Strahlentherapie sensibel. Es zeichnet sich ab, dass Metastasierung als ein mehrstufiger Prozess gesehen werden muss: zunächst gibt es Tumorzellen, die in der Lage sind, sich aus dem eigentlichen Zellverbund des Primärtumors zu lösen. Nach vollzogener Dissemination vom Primärtumor gelangt ein Teil dieser Zellen in das Gefäßsystem. Ein kleiner Teil davon wiederum ist in der Lage dort zu überleben, eine Extravasation in tumorursprungsfremdes Gewebe und eine Anpassung an die neue

Umgebung zu vollziehen. Dieser bildet dann Makrometastasen (Suzuki, Mose, Montel, & Tarin, 2006). Ein kleiner prozentualer Teil der disseminierten Zellen (2 %) kann ein mikrometastatisches Wachstum initiieren. 0,02 % der Zellen sind wiederum in der Lage zu persistieren und später Makrometastasen auszubilden (Chambers et al., 2001; Suzuki et al., 2006). Hauptlokalisationsorte der disseminierten Tumorzellen sind das Knochenmark und Lymphknoten (Balic, Williams, Dandachi, & Cote, 2010).

Aktuell gibt es zwei fundamentale Modelle zur Metastasierung: das „lineare Progressions-Modell“ und das „parallele Progressions-Modell“ (C. A. Klein, 2009). Das lineare Progressions-Modell geht davon aus, dass die metastasierten Zellen ein ähnlich hohes malignes Potenzial wie die Zellen des Primarius aufweisen. Daher ist ihr Auftreten mit einem bereits fortgeschrittenen Krebsleiden assoziiert. Die metastasierten Tumorzellen sind wiederum in der Lage, weitere Metastasierung zu induzieren (C. A. Klein, 2009). Das parallele Progressions-Modell basiert auf einer anderen Hypothese. Es geht davon aus, dass eine parallele und unabhängige Akkumulation genetischer und epigenetischer Alterationen im Primärtumor und den Metastasen stattfindet. Eine Aussaat von Tumorzellen findet unabhängig vom Tumorstadium schon zu einem Zeitpunkt statt, zu welchem der Primärtumor höchstwahrscheinlich noch nicht detektiert wurde.

2.3.3 Prognostischer Wert disseminierter Tumorzellen

Die Hypothese des parallelen Progressions-Modell ließe sich gut mit der Tatsache vereinbaren, dass die Ausbildung von Metastasen bereits in früheren Tumorstadien (T1-T2) auftreten kann. Dementsprechend könnte der Nachweis disseminierter Tumorzellen einen weiteren, neben dem Tumorstadium unabhängigen prognostischen Faktor darstellen. Bezüglich des Nachweises disseminierter Tumorzellen in Lymphknoten wurden zahlreiche Studien bei den verschiedensten Tumorentitäten durchgeführt (Dhayat et al., 2012; Ge, Wu, Wang, Zhang, & Li, 2005). Es konnte gezeigt werden, dass der Nachweis von DTCs mit einer höheren Progressionsrate und einem schlechteren Überleben beim Mamma-Karzinom, Brust- und Lungenkrebs sowie dem Melanom assoziiert ist (C. A. Klein, 2009). Auch der Nachweis disseminierter Tumorzellen im Knochenmark von Blasentumorpatienten scheint mit einer schlechteren Prognose der Patienten einherzugehen (DeGraff & Clark, 2011; Retz et al., 2011). Zum prognostischen Wert des Nachweises disseminierter Tumorzellen in Lymphknoten von Blasentumorzellen ist die Datenlage recht begrenzt. Aber auch dort zeichnet sich ein Trend Richtung schlechterer Prognose ab (Gazquez et al., 2012b).

2.3.4 Methoden zum Nachweis disseminierter Tumorzellen

Nach aktuellem Stand gilt es zwei Methoden zum Nachweis disseminierter Tumorzellen zu unterscheiden: die Immunhistochemie sowie die Polymerasekettenreaktion. Beiden Methoden gemeinsam ist die Detektion einzelner Tumorzellen anhand der Expression tumorspezifischer Proteine beziehungsweise Gene, die die gesunden umgebenden Zellen nicht exprimieren. Das Problem bei allen derzeitigen molekularen Markern ist, dass eine absolute Tumorspezifität unmöglich ist, da es sich meist um einen Nachweis von Molekülen handelt, die auch physiologischer Weise im Körper vorkommen, wenn auch in anderer Lokalisation oder in geringerer Menge. Daher ist weder absolute Spezifität noch Sensitivität gegeben. Darin besteht auch der große Nachteil beider Verfahren: im Rahmen der Karzinogenese und Mutagenese der Tumorzellen kann das Vorhandensein und die Expression solcher Marker eventuell gänzlich verloren gehen. Die Tumorzelle als solches würde dann mittels dieser Methoden nicht detektiert werden (Ghossein & Bhattacharya, 2000).

In zahlreichen Studien konnte gezeigt werden, dass die Sensitivität im Nachweis molekularer Marker in Lymphknoten von Blasen tumorpatienten höher als die der klassischen Histopathologie ist (Gazquez et al., 2012b; Ribal et al., 2006). Dies liegt an der Methodik der pathologischen Begutachtung des Gewebes. Aus Kosten- und Zeitgründen wird das zu untersuchende Gewebe normalerweise nur in einzelnen histologischen Gewebeschnitten begutachtet. So ist es möglich, dass eine Metastase zwar im Gewebe vorhanden ist, aber genau jener Schnitt, in dem sie sich befindet, mikroskopisch nicht analysiert wurde.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die quantitative reverse Transkriptase Polymerasekettenreaktion (qRT-PCR) als molekulartechnische Methode zum Nachweis von Metastasen in Lymphknoten von Blasen tumorpatienten angewendet. Entscheidender Vorteil gegenüber der klassischen histopathologischen Untersuchung des Lymphknotens ist, dass das gesamte Lymphknotengewebe und nicht nur einzelne Abschnitte eines Lymphknotens untersucht werden. Das Gewebe wurde dabei auf die Genexpression von verschiedenen epithelialen Markern untersucht. Verglichen wurden die qRT-PCR-Resultate mit den Resultaten der klassischen Histopathologie, die die Lymphknoten in einzelnen Schnitten auf das Vorhandensein von Mikrometastasen untersuchte.

2.4 Neue diagnostische und prognostische Marker für das Harnblasenkarzinom

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein Panel an Markern zur Detektion disseminierter Tumorzellen in Lymphknoten von Harnblasenkarzinompatienten getestet und etabliert. Es handelt sich dabei um die Epithelmarker Cytokeratin 17 (KRT17/ CK17), Cytokeratin 20 (KRT20/ CK20), FXYD3, MUC5B, SPINK1 sowie Uroplakin II (UPKII).

Im Folgenden wird genauer auf die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Marker eingegangen.

2.4.1 Cytokeratin 20

Cytokeratin 20 ist ebenso wie die anderen bis dato bekannten 19 Zytokeratine ein Intermediärfilament eukaryoter Zellen und dient der mechanischen Stabilität der Zelle. Das CK-20-Gen liegt auf dem langen Arm von Chromosom 17 an der Stelle 17q21.1 und kodiert für ein Protein bestehend aus 242 Aminosäuren und einem Molekulargewicht von 48.553 kDa. Mittels klassischer immunhistochemischer Untersuchungsmethoden konnte eine starke CK-20-Protein-Expression und mittels PCR eine CK-20-Genexpression in Epithelien des Intestinums, in kanzerogen veränderten Darmgewebe, in den Merkelzellen der Haut, in den Transitionalzellen des Urogenitaltraktes sowie primärem Blasenmorgewebe und diversen Blasenmorzelllinien gezeigt werden (A. Klein, Zemer, Buchumensky, Klaper, & Nissenkorn, 1998; Moll, Lowe, Laufer, & Franke, 1992; Retz et al., 2001). Weitere, wenn auch sehr viel schwächere Expression zeigten Zellen im Thymusgewebe, in den Bronchien, in der Gallenblase und Prostata (Moll, Schiller, & Franke, 1990). In nicht-epitheliale Gewebe wie Lymphknoten, glatten Muskelzellen und Endothelzellen der Gefäße wird CK-20 nicht exprimiert (Moll et al., 1992).

Zahlreiche Studien untersuchten die Wertigkeit der Cytokeratin-20-Genexpression im peripheren Blut von Blasenmorpatienten (Flaig et al., 2011; Fujii, Kageyama, Kawakami, Kihara, & Oshima, 1999; Gazzaniga et al., 2001; Gudemann et al., 2000; Marin-Aguilera et al., 2012; Okegawa, Kinjo, Nutahara, & Higashihara, 2004; Retz et al., 2001; Ribal et al., 2006). Es konnte gezeigt werden, dass die Expression von Cytokeratin 20 im Zusammenhang mit dem Tumorstadium steht (Fujii et al., 1999; Gudemann et al., 2000). Je höher dieses ist, desto wahrscheinlicher ist der Nachweis von zirkulierenden Tumorzellen im Blut. Auch in Bezug auf das Überleben zeigte sich ein signifikanter Unterschied bei CK-20 positiven und CK-20 negativen Patienten.

Ähnliche Ergebnisse zeigten sich in der Untersuchung des Knochenmarkes von Blasenmorpatienten auf die Expression von Cytokeratin 20 (Retz et al., 2011). Die Gruppe mit positivem Cytokeratinnachweis besaß im Gegensatz zur CK-20-negativen Gruppe ein signifikant schlechteres 7-Jahres-progressionsfreies Überleben. Auch bezüglich des tumorspezifischen Überlebens bildeten sich statistisch signifikante Unterschiede in beiden Kollektiven ab.

Zu ähnlichen Ergebnissen kamen auch Studien, die Lymphknoten auf das Vorhandensein von Mikrometastasen mittels Cytokeratin-20-Genexpressionsnachweis durch RT-PCR untersuchten. In allen Studien konnten prozentual mehr Lymphknotenmetastasen durch

Cytokeratinexpressionsnachweis detektiert werden als durch die pathologische Begutachtung des Lymphknotens (Autenrieth et al., 2008; Gazquez et al., 2012a; Marin-Aguilera et al., 2008; Ribal et al., 2006). Etwa 20 % der Patienten wurden mittels dieser Methode zusätzlich als lymphknotenmetastasenpositiv beurteilt. Bezüglich des prognostischen Wertes der Detektion disseminierter Tumorzellen in Lymphknoten können bis zum jetzigen Zeitpunkt keine wirklichen Aussagen aufgrund der beschränkten Datenlage gemacht werden, dennoch konnte in einer Studie ein Trend Richtung schlechteres krebs- und rezidivfreies Überleben bei CK20-Nachweis in Lymphknoten gezeigt werden (Gazquez et al., 2012b).

Cytokeratin 20 scheint daher nicht nur ein vielversprechender Marker zur Detektion von DTCs in Knochenmark und CTCs in Blut sondern auch von DTCs in Lymphknoten zu sein.

2.4.2 Cytokeratin 17

Auch Cytokeratin 17 gehört ebenso wie Cytokeratin 20 zur Familie der Zytokeratine. Das Cytokeratin-17-Gen, welches auf dem langen Arm des Chromosoms 17 auf der Region 17q21.2 lokalisiert ist, kodiert für ein Protein aus 432 Aminosäuren. Es verfügt über 8 Exons und 7 Introns. Es wird vor allem von den Hautanhangsgebilden und Basalzellen komplexer Epithelien exprimiert (Trojanovsky, Leube, & Franke, 1992) und ist so eventuell Marker für basale Zelldifferenzierung.

Bisher liegen nur wenige Daten zu Cytokeratin 17 als geeigneter Tumormarker für das Harnblasenkarzinom vor.

Die Arbeitsgemeinschaft um He untersuchte die Proteinexpression von Cytokeratin 17 mittels immunchemischer Färbung anhand von Tumormaterial von High-Grade muskelinvasiven Urotheltumoren. Die Gruppe stellte die Hypothese auf, dass Urothel-Krebszellen einige biologische Eigenschaften mit den Basalzellen von normalem Urothel teilen. 64 % der Proben zeigten eine intensive Färbung davon 2/3 hauptsächlich an der Grenze zwischen Tumor und Stroma. Die Patienten mit positivem Cytokeratin-17-Protein-Nachweis wiesen dennoch keinen statistisch signifikanten Unterschied in ihrer Prognose gegenüber dem CK-17-negativen Kollektiv auf (He et al., 2009).

Bisher liegen keine Daten zum Intermediärfilament Cytokeratin 17 als Epithelmarker zur Detektion von Mikrometastasen in pelvinen Lymphknoten von Blasenkarzinompatienten mittels qRT-PCR Technik vor.

2.4.3 FXYD3

FXYD3, auch unter dem Namen Mat-8 (engl. mammary tumormarker 8) bekannt, gehört zu einer Gruppe transmembranöser Proteine und kann zur Na-K-ATPase und H-K-ATPase im

Magen und Darm assoziieren (Geering, 2006). Eine vermehrte Expression konnte in zahlreichen Tumorentitäten wie Brusttumoren, Prostatatumoren, kolorektalen Karzinomen und Pankreaskarzinomen nachgewiesen werden (Morrison et al., 1995; Sweadner & Rael, 2000). Auch in Zelllinien von kolorektalem Karzinom, Pankreaskarzinom und Prostatakarzinom wird es exprimiert. In gesundem Gewebe konnte eine Expression von den Zellen des Uterus, Magens, Kolons und der Haut gezeigt werden (Geering, 2006). Das Gen befindet sich auf dem langen Arm von Chromosom 19 auf der Region 19q13.12.

Bei immunhistochemischen Färbungen von primären Harnblasenkarzinomen mit Antikörpern gegen FXYD3 konnte ein Zusammenhang zwischen Intensivität der Färbung und histologischem Grad des Tumors gezeigt werden. Je höher der Grad, desto stärker färbte sich der Tumor an (Z. Zhang et al., 2011). Außerdem schien der Marker absolut spezifisch für das Urothelkarzinom zu sein, Blasentumore anderer histologischer Art konnten durch den Marker nicht detektiert werden. Eine Follow-up-Studie zur Detektion der FXYD3-Expression mittels qRT-PCR im peripheren Blut von Blasentumorpatienten nach radikaler Zystektomie konnten einen signifikanten Unterschied in der FXYD3-Genexpression bei High-Risk-nicht-muskelinvasiven Blasentumorpatienten und muskelinvasiven Blasentumorpatienten zeigen (Marin-Aguilera et al., 2012). Zwei Studien zur FXYD3-Expression in Lymphknoten von Blasentumorpatienten sind bis zum aktuellen Zeitpunkt veröffentlicht worden (Gazquez et al., 2012a; Marin-Aguilera et al., 2008). Dabei zeigten alle pathologisch als metastasenpositiv beurteilten Lymphknoten ebenfalls eine positive FXYD3-Expressions mittels PCR. Während durch die pathologische Untersuchung etwa 18 % der Patienten Lymphknotenmetastasen zeigten, konnten durch die FXYD3-qRT-PCR bei mehr als doppelt so vielen Patienten disseminierte Tumorzellen in den Lymphknoten festgestellt werden. Ob der Nachweis von disseminierten Tumorzellen mit Hilfe dieses Markers allerdings prognostischen Wert hat, ist zum jetzigen Stand der Wissenschaft unklar. Während Gazquez et al. einen Trend hinsichtlich eines schlechteren Überlebens von molekularpositiven Patienten aufzeigen konnten (Gazquez et al., 2012b), bildete sich in der Studie um Marin-Aguilera et al. kein statistisch signifikanter Unterschied bezüglich des Überlebens von FXYD3-positiven und FXYD3-negativen Patienten ab (Marin-Aguilera et al., 2008).

Aufgrund der eingeschränkten Datenlage zu FXYD3 ist es durchaus sinnvoll, den Marker erneut an Lymphknoten von Blasenkarzinompatienten auf seinen diagnostischen und prognostischen Wert zu untersuchen.

2.4.4 SPINK1

Das SPINK1-Gen, welches auf dem langen Arm von Chromosom 5 auf der Region 5q32 lokalisiert ist, kodiert für einen Trypsininhibitor, der im Pankreas, Magen, Duodenum,

Gallenblase, Appendix, Kolon und Urogenitaltrakt exprimiert wird (Fukayama, Hayashi, Koike, Ogawa, & Kosaki, 1986). Es konnte eine einheitliche Expression von SPINK1 in den urothelialen Superficialzellen festgestellt werden (Diggle et al., 2003), die Intermediärzellschicht und Basalzellschicht des Urothels scheinen frei von SPINK1 zu sein. Bei maligne verändertem Urothel zeigte sich eine diffuse SPINK1-Expression innerhalb aller Schichten des Urothels.

Aufgrund der Tatsache, dass SPINK1 nur von den Superficialzellen im Urothel exprimiert wird und maligne Transformation von Urothel mit einer erhöhten bzw. veränderten Expression von SPINK1 einhergeht, legten zahlreiche Studien ihr Hauptaugenmerk auf den Nachweis von SPINK1 im Urin und Serum von Blasen-tumorpatienten (Diggle et al., 2003; Kelloniemi, Rintala, Finne, Stenman, & Finnbladder, 2003; Pectasides et al., 1996). Es konnten ein Zusammenhang zwischen der Konzentration von SPINK1 im Serum und der Ansprechrate auf eine Chemotherapie festgestellt werden, dabei wies die Gruppe der Non-Responder erhöhte Serum-SPINK1-Werte auf (Pectasides et al., 1996). Die Arbeitsgemeinschaft um Diggle wiederum konnte einen signifikanten Unterschied bezüglich des Protein-Kreatinin-Index im Urin und Tumorgrade bzw. –stage feststellen (Diggle et al., 2003). Patienten mit einer erhöhten SPINK1-Serumkonzentration, wiesen ein statistisch signifikant kürzeres Überleben auf. Während somit der Nachweis von erhöhten SPINK1-Werten ein unabhängiger prognostischer Faktor zu sein scheint, konnte keine Korrelation bezüglich des Überlebens der Patienten und der Höhe von SPINK1 im Urin nachgewiesen werden (Kelloniemi et al., 2003). Ein immunhistochemisch nachweisbarer Verlust an SPINK1-Genexpression im Material von Urothelkarzinomen scheint mit einem höherem Tumorstadium und einem höheren Risiko von Lymphknotenmetastasen assoziiert zu sein (Rink et al., 2012). Außerdem geht der Verlust der Genexpression mit einer höheren krebsspezifischen Mortalität und einem höheren Risiko für ein Tumorrezidiv einher. Nach eingehender Literaturrecherche scheinen noch keine Daten über den Nachweis von SPINK1 in Lymphknoten von Blasen-tumorpatienten vorzuliegen.

2.4.5 MUC5B

Das MUC5B-Gen auf der Region 11p15.5 des Chromosoms 15 kodiert für das Glykoprotein MUC5B, welches zur Gruppe der Muzine gehört. Muzine sind Hauptbestandteil des viskösen Schleims und dienen dem Schutz und der Abwehr der Epithelien von Gastrointestinal-, respiratorischem und Urogenitaltrakt. Im Urogenitaltrakt bilden sie einen Film zwischen Urothel und Urin, sodass die Epithelzellen nicht direkt den Schwankungen in Osmolarität und pH-Wert des Urin ausgesetzt sind (Vinall et al., 1998).

Es liegen nur wenige Daten zu MUC5B als molekularer Tumormarker vor. In lediglich einer Studie zum Prostatakarzinom wurde MUC5B in seiner Wertigkeit als molekularer

Tumormarker evaluiert (S. Zhang et al., 1998). Es wurden immunhistochemische Untersuchungen mittels monoklonaler Antikörper gegen MUC5B an Proben von gesundem Prostatagewebe und von primärem und metastatischem Prostatakrebs unternommen. Normales Drüsengewebe zeigte keine immunhistochemische Färbung. Sowohl in metastatischem als auch primären Prostatakrebs färbte sich jeweils nur eine von neun Proben an (mehr als 20 % der Zellen immunhistochemisch positiv) (S. Zhang et al., 1998).

Die Datenlage zu Muzinen ist relativ begrenzt, insbesondere zu MUC5B liegen so keine Daten zur Eignung als eventueller Biomarker für die Detektion von Mikrometastasen in Lymphknoten von Blasentumorpatienten vor.

2.4.6 Uroplakin II

Uroplakine stellen eine Gruppe von vier hochkonservierten integralen Membranproteinen dar. Sie waren die ersten gewebespezifischen und differenzierungsabhängigen Marker für Urothel. Ihre biologische Funktion ist bis heute nicht hinreichend geklärt, vermutlich sind sie aber an der Stabilisierung der apikalen Membran der urothelialen Deckzellen beteiligt und schützen diese so vor Rupturierung während des Füllungsvorganges der Harnblase (X. R. Wu et al., 1994). Das Uroplakin II-Gen ist auf dem Chromosom 11 in der Region 11q23 lokalisiert (NCBI). Uroplakin II wird ausschließlich von den Superfizialzellen des Urothels exprimiert (Lobban et al., 1998). Es konnte gezeigt werden, dass ein direkter Zusammenhang zwischen dem Differenzierungsgrad von Blasenkarzinomzelllinien und der Anzahl an exprimierten Uroplakinen besteht (Lobban et al., 1998).

Ob sich UPKII als molekularer Marker zum Nachweis zirkulierender Tumorzellen in peripherem Blut von Blasenkarzinompatienten eignet, wurde in zahlreichen Studien evaluiert (Gazzaniga et al., 2001; Li et al., 1999; Lu et al., 2000; Marin-Aguilera et al., 2012; Okegawa et al., 2004; Osman et al., 2004; Yuasa et al., 1999): Yuasa et al. zeigten, dass 100 % der Patienten mit generalisierter Tumorerkrankung eine UPKII-Genexpression im Blut zeigten, während weder im Blut von Tumorpatienten mit lokal begrenzter Krankheit noch von freiwilligen gesunden Probanden eine UPKII-Expression festgestellt werden konnte (Yuasa et al., 1999). Lu et al. konnten sowohl bei Patienten mit oberflächlichem Tumor als auch bei Patienten mit höherem histopathologischen Tumorstadium eine UPKII-Genexpression im peripheren Blut nachweisen. Im Rahmen der Studie wurde zusätzlich noch von 3 Patienten Blut im Verlauf einer systemischen Chemotherapie abgenommen und auf die UPKII-Expression untersucht. Interessanterweise konnte bei den zwei Patienten, die gut auf die Chemotherapie anzusprechen schienen, im Verlauf kein erneuter Nachweis einer UPKII-Genexpression im Blut erfolgen. Der dritte Patient, welcher schlecht auf die Chemotherapie ansprach, zeigte

weiterhin eine Expression von UPKII als Ausdruck disseminierter Tumorzellen und somit eine inkomplette Eradikation der Tumorzellen durch die Chemotherapie (Lu et al., 2000).

Die Arbeitsgruppe um Kurahashi untersuchte 760 Lymphknoten von 40 Patienten mit Real-Time-PCR ebenfalls auf UPKII-Genexpression. 50 % der Patienten, die sowohl histopathologisch als auch PCR positiv waren, zeigten mit einer medianen Zeit von sechs Monaten ein Rezidiv, die histopathologisch unauffälligen, aber PCR-positiven Patienten zeigten in 33 % der Fälle ein Rezidiv nach einer medianen Zeit von sieben Monaten. In der N0-qRT-PCR(-) Gruppe kam es in 4,5 % der Fälle zu einem Wiederauftreten der Krankheit (Kurahashi et al., 2005). Zu ähnlichen Ergebnissen kam auch die Gruppe um Copp. Sie konnte zeigen, dass die Expression von UPKII in Lymphknoten von Blasentumorpatienten einen signifikanten Prädiktor für das Wiederauftreten eines Urothelkarzinoms darstellt. (Copp, Chin, Conaway, & Theodorescu, 2006).

UPKII scheint ein geeigneter molekularer Marker zur Detektion disseminierter Tumorzellen in Lymphknoten von Patienten mit einem Harnblasenkarzinom zu sein.

3 FRAGESTELLUNG

Ziel dieser Arbeit ist die Etablierung eines Panels von bereits beschriebenen und neuen molekularen Markern zur Detektion disseminierter Tumorzellen in Lymphknoten von Patienten mit lokal fortgeschrittenem Urothelkarzinom der Harnblase und Indikation zur radikalen Zystektomie. Zudem soll eine Analyse der Topographie der molekularen Lymphknotenmetastasen bei Patienten mit ausgedehnter Lymphadenektomie erfolgen und mit den Ergebnissen der histopathologischen Untersuchung verglichen werden.

Als Epithelmarker wurden KRT17, KRT20, FXYD3, MUC5B, SPINK1 und UPKII ausgewählt. Mittels quantitativer Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion wurde deren Genexpression in pelvinen Lymphknoten von Blasen tumorpatienten analysiert. Die Ergebnisse der qRT-PCR in pelvinen Lymphknoten wurden mit der histopathologischen Untersuchung der korrespondierenden Lymphknotenhälfte verglichen. Zusätzlich erfolgt eine topographische Kategorisierung der molekular nachgewiesenen Lymphknotenmetastasen im Kollektiv der Patienten mit ausgedehnter Lymphadenektomie.

Folgende Untersuchungen wurden in vorliegender Arbeit durchgeführt:

1. Determinierung der Sensitivität und Spezifität der qRT-PCR für die sechs Marker
2. Untersuchung der Genexpression der sechs Marker mittels qRT-PCR-Technik
 - In Urothelkarzinomzelllinien unterschiedlichen Differenzierungsgrades
 - In Verdünnungsserien von Plasmiden in einer definierten Zahl mononukleärer Zellen von gesunden Spendern zur Determinierung der Sensitivität
 - In Verdünnungsserien von Blasenkarzinomzelllinien in einer definierten Zahl mononukleärer Zellen von gesunden Spendern als weiterer Methode zur Determinierung der Sensitivität
 - In pelvinen Lymphknoten von Kontrollpatienten zur Ermittlung entsprechender Grenzwerte für die jeweiligen Marker
3. Untersuchung der Genexpression der sechs Marker in pelvinen Lymphknoten von Urothelkarzinompatienten auf disseminierte Tumorzellen nach radikaler Zystektomie
4. Vergleich der Ergebnisse der molekularen Lymphknotenanalyse der Blasen tumorpatienten mit den histopathologischen Untersuchungsbefunden der korrespondierenden Lymphknotenhälfte
5. Topographie der molekularpositiven Lymphknoten bei den Patienten mit ausgedehnter Lymphadenektomie und Kombination der Marker zur Steigerung der Sensitivität in der Detektion

4 MATERIAL UND METHODEN

4.1 Zellkultur

4.1.1 Material und Reagenzien für Zellkultur

4.1.1.1 Reagenzien

Dulbecco's Mod Eagle Medium (DMEM)	Biochrom Ag™
Fötale Kälberserum	Biochrom AG™
RPMI 1640 Medium mit Phenolrot	Biochrom AG™
Antibiotika-Gemisch: 10000 U Penicillin + 10mg Streptomycin pro ml	
PBS Dulbecco	Biochrom AG™
Trypsin/EDTA-Lösung: 0,5 g/l Trypsin und 2 g/l EDTA in PBS ohne Ca ²⁺ und Mg ²⁺	
Lysepuffer	Ambion®

4.1.1.2 Verbrauchsmaterialien

Handschuhe Senso Skin	Medika Medizintechnik GmbH
Pipettenspitzen 1250 µl	Biozym
Sterile Einwegpipetten 1 ml, 5 ml, 10 ml	Greiner bio-one
Zellkulturschalen 100 x 200 mm	BD Falcon
Zentrifugenröhrchen 15 ml Cellstar®	Greiner bio-one
Zellschaber costar®	Corning Incorporated
Reaktionsgefäß (Reaktionsgefäß), 1,5 ml	Eppendorf AG

4.1.1.3 Laborgeräte

Bench HERA safe	Thermo electron cooperation
Wasserbad	Memmert
Zentrifuge Rotina 35 R	Thermo electron Corporation
Inkubator HERA cell 240	Hettich Lab Technology
Absauger	Schütt Labortechnik
Mikroskop Axiovert 135	Zeiss

4.1.2 Kultivierung von permanenten Blasenkarzinomzelllinien

In der vorliegenden Arbeit wurden 17 Blasenkarzinomzelllinien unterschiedlicher Differenzierungsgrade für die Zellkultur verwendet und diese auf die Genexpression der sechs Marker FXYD3, KRT17, KRT20, MUC5B, SPINK1 und UPKII untersucht.

Hierzu wurden die Zellen zunächst als Monolayer abhängig von der Zelllinie entweder im RPMI 1640- oder DMEM-Medium unter Zugabe von 10%igem hitzeinaktivierten fötalen Kälberserum sowie in den meisten Fällen nicht-essenziellen Aminosäuren, kultiviert (Tabelle 2) Um eine bakterielle Kontamination zu vermeiden, wurde ein Antibiotikagemisch aus Penicillin und Streptomycin hinzugefügt. Die Kultivierung aller Zelllinien fand bei 37 °C und je nach Zelllinie bei 5 % oder 10 % CO₂ statt.

Tabelle 2: Verwendete Blasenkarzinomzelllinien mit Dysplasiegrad, Kultivierungsbedingung und Bezugsort.

Zelllinien	Spezies	Tumor-gewebe	ATCC/ DSMZ	Herkunft	Kultivierung bei 37°
S.D.	human	Urothelkarzinom Primärtumor		Prof. W. Schulz, Urologe, Düsseldorf	DMEM mit stab. Glutamin 10%FCS, 1%Pen/Strep 10%CO ₂
VmCub-1	human	Urothelkarzinom Primärtumor	ACC- 400		DMEM mit stab. Glutamin 10%FCS, 1%Pen/Strep 10%CO ₂
MCHU-4	human	Urothelkarzinom Primärtumor		Prof. W. Schulz, Urologe, Düsseldorf	DMEM mit stab. Glutamin 10%FCS, 1%Pen/Strep 10%CO ₂
639-V	human	Urothelkarzinom Primärtumor		Prof. W. Schulz, Urologe, Düsseldorf	DMEM mit stab. Glutamin 10%FCS, 1%Pen/Strep 10%CO ₂
UMUC-3	human	Urothelkarzinom Primärtumor	CRL 1749		DMEM mit stab. Glutamin 10 % FCS, 1 % Pen/ Strep 10 % CO ₂
BFTC- 905	human	Urothelkarzinom Primärtumor	ACC- 361		DMEM mit stab. Glutamin 10 % FCS, 1 % Pen/ Strep 10 % CO ₂
UMUC-6	human	Urothelkarzinom Primärtumor		HPA Catalogue-No. 08090503	DMEM mit stab. Glutamin 10 % FCS, 1% Pen/ Strep 10 % CO ₂
SW-1710	human	Urothelkarzinom Primärtumor	ACC- 426		DMEM mit stab. Glutamin 10 % FCS, 1 % Pen/ Strep 10 % CO ₂
EJ-28	human	Urothelkarzinom Primärtumor		CLS	RPMI 1640 mit stab. Glutamin 10 % FCS, 1 % NEA, 1 % Pen/ Strep 5 % CO ₂ .
486-P	human	Urothelkarzinom Lymphknoten- Metastase		Prof. G. Unteregger Urologe, Homburg	RPMI 1640 mit stab. Glutamin 10 % FCS, 1 % NEA, 1 % Pen/Strep 5 % CO ₂
253-J	human	Urothelkarzinom Metastase		Prof. G. Unteregger	DMEM mit stab. Glutamin 10 % FCS, 1 % NEA, 1 % Pen/ Strep

			Urologe, Homburg	10 % CO ₂
J-82	human	Urothelkarzinom Primärtumor	HTB-1	RPMI 1640 mit stab. Glutamin 10 % FCS, 1 % NEA, 1 % Pen/ Strep 5 % CO ₂
RT-4	human	Urothelpapillom Primärtumor	HTB-2 ACC- 412	RPMI 1640 mit stab. Glutamin 10 % FCS, 1 % NEA, 1 % Pen/ Strep 5 % CO ₂
RT-112	human	Urothelkarzinom Primärtumor	ACC- 418	RPMI 1640 mit stab. Glutamin 10 % FCS, 1 % NEA, 1 % Pen/Strep 5 % CO ₂
T-24	human	Urothelkarzinom Primärtumor	HTB-4 ACC- 376	CLS RPMI 1640 mit stab. Glutamin 10 % FCS, 1 % NEA, 1 % Pen/ Strep 5 % CO ₂
H-1376	human	Urothelkarzinom Primärtumor	CRL- 1472 ACC- 397	DMEM mit stab. Glutamin 10 % FCS, 1 % NEA, 1 % Pen/ Strep 10% CO ₂
647-V	human	Urothelkarzinom Primärtumor	ACC- 414	RPMI 1640 mit stab. Glutamin 10 % FCS, 1 % NEA, 1 % Pen/ Strep 5-10 % CO ₂

4.1.3 Erstellen einer neuen Zellpassage

Nach mikroskopischer Kontrolle einer ausreichenden Konfluenz konnte das Nährmedium verworfen werden. Zum Entfernen von FKS wurden die Zellen anschließend mit zehn Milliliter PBS gewaschen. Es erfolgte nach Zugabe von 2,5 ml Trypsinlösung eine von der Zelllinie abhängige zwischen fünf und 15 Minuten dauernde Inkubation im Brutschrank bei 37 °C und fünf bzw. zehn Prozent CO₂ statt. Nach mikroskopischer Kontrolle der Ablösung der Zellen vom Boden der Petrischale, wurden die Zellen in 7,5 ml Nährmedium in einem zehn Milliliter Zentrifugenröhrchen resuspendiert und anschließend bei 250 g für fünf Minuten zentrifugiert. Das entstandene Zellpellet wurde in zehn Milliliter Nährmedium resuspendiert und die Suspension in eine neue Petrischale gegeben.

4.1.4 Herstellung von Zelllysaten für die RNA-Extraktion der Blasen tumorzelllinien

Zur Herstellung von Zelllysaten der verschiedenen Blasen tumorzelllinien wurde das Nährmedium der circa 75 % konfluent bewachsenen Petrischalen verworfen und die Zellen anschließend mit zehn Milliliter PBS/ EDTA-Lösung gewaschen. Die Platten wurden auf Eis

gelagert. Nach Zugabe von 600 µl Lysepuffer wurden die Zellen vorsichtig mit dem Zellschaber vom Boden der Platten gelöst und die Suspension in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt. Bis zur Weiterverarbeitung erfolgte eine Zwischenlagerung der Lysate bei -20 °C.

Außerdem erfolgte die Lyse einer definierten Menge an Tumorzellen (10⁴ Tumorzellen der Zelllinie 647V) zur späteren Determinierung der Sensitivität der Marker FXYD3, KRT17, KRT20, SPINK1 und UPKII. Dazu wurden die zuvor trypsinisierten, in zehn Milliliter Medium gelösten Zellen einer konfluent bewachsenen Petrischale unter dem Mikroskop ausgezählt. Das Volumen, welches 10⁴ Tumorzellen beinhaltet, wurde in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß pipettiert und bei vier Grad Celsius und 500 g für zehn Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgesaugt, das Pellet in 1000 µl Lysepuffer lysiert. Somit enthielt das Reaktionsgefäß 10⁴ Tumorzellen in 1000 µl Volumen. Es erfolgte eine Zell-Verdünnungsreihe der Zellen in Lysaten von mononukleären Zellen aus peripherem Blut (PBMCs).

4.2 Gewebe

4.2.1 Peripher venöses Blut von freiwilligen gesunden Spendern

Zur Bestimmung der Sensitivität der verschiedenen Marker in der qRT-PCR (s.u.) wurde eine Verdünnungsreihe von Blasentumorzellen sowie von Kopien der klonierten Marker in peripheren mononukleären Zellen (PBMC, engl. peripher blood mononuclear cells) des Blutes von gesunden Spendern angefertigt. Die Isolierung der PBMCs der freiwilligen, gesunden Spender erfolgte nach dem Prinzip der Dichtezentrifugation über einem kolloidalen Gradienten.

4.2.1.1 Material und Reagenzien für die Isolierung von PBMC

Reagenzien

Biocoll separating solution (Ficoll)	Biochrom AG
PBS	Biochrom AG
Türksche Lösung	Fluka Analytical
Lysepuffer	Ambion®

Verbrauchsmaterialien

Einmalpipetten ml	10 Greiner bio-one
Pipettenspitzen 1000, 100, 10 µl	Biozym

Sterile Reaktionsgefäße 1,5 ml	Eppendorf AG
Falconröhrchen 50 ml	Greiner bio-one
Neubauer Zählkammer Tiefe 0,1 mm, Volumen 0,0025 mm ²	Superior Marienfeld
Deckgläser	

Laborgeräte

Mikroskop Axiovert 135	Zeiss
Zentrifuge Eppendorf 5810 R	Eppendorf AG
Zentrifuge Eppendorf 5415 R	Eppendorf AG

4.2.1.2 Isolation von PBMCs

Sämtlicher Reagenzien und Materialien wurden auf Raumtemperatur gebracht, da der Ficoll-Dichtegradient temperaturabhängig ist. Der Inhalt einer neun Milliliter umfassenden Blutmonovette wurde in ein 50 ml Falconröhrchen überführt und anschließend im Verhältnis 1:1,5 mit PBS auf ein Volumen von 25 ml verdünnt. In einem weiteren 50 ml Falcon-Röhrchen wurden 20 ml Ficolllösung vorgelegt. Diese wurde vorsichtig von der PBS-Blutmischung überschichtet. Es erfolgte ein 20-minütiger Zentrifugationsschritt bei 25 °C und 800g. Der Inhalt des Falconröhrchens zeigte nun eine Dreischichtung: eine oberer klare Phase bestehend aus Plasma, die trübe mittlere Interphase, welche die kernhaltigen mononukleären Zellen beinhaltet sowie die aus Ficolllösung und Erythrozyten bestehend unterste Phase. Die entstandene Interphase wurde in ein Falconröhrchen, in welchem bereits mit 45 ml PBS vorgelegt wurden, überführt und bei 500 g für 10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgeschüttet und das Zellpellet in einem Milliliter PBS in einem sterilen 1,5 ml Reaktionsgefäß resuspendiert. Zur Ermittlung der Zellzahl erfolgte eine Zählung mittels einer Neubauer-Zählkammer: Hierzu wurden 10 µl der Probe mit 90 µl Türk'scher Lösung gemischt, auf die Zählkammer aufgetragen und unter dem Mikroskop mit einer 100-fachen Vergrößerung betrachtet und ausgezählt. Eine Verwendung der Türk'schen Lösung diente der Lyse eventuell verbliebener Erythrozyten. Die Gesamtzellzahl der peripher mononukleären Zellen ließ sich dann wie folgt, errechnen:

$$\text{Gesamtzahl (peripher mononukleäre Zellen)} = \frac{\text{Verdünnungsfaktor} \times \text{Mittelwert (mononukleäre Zellen pro Eckquadrat)}}{\text{Volumen (Zählkammer)}}$$

- Verdünnungsfaktor: 10
- Mittelwert mononukleärer Zellen: Summe aller mononukleären Zellen über den 4 Eckquadraten der Neubauer Zählkammer
- Volumen der Zählkammer: 0,1 μl (Fläche eines Eckquadrates (1mm²) X Kammerhöhe (0,1mm))

Das jeweilige Volumen der PBS-Zellsuspension, welches die gewünschte Zahl von 10^7 PBMCs enthielt, wurde erneut bei 500 g und vier Grad Celsius für zehn Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das entstandene Pellet in 600 μl Lysepuffer durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren in Lösung gebracht.

Ein Teil Lysate der PBMCs wurde zur Erstellung einer Zell-Verdünnungsreihe mit 10^4 Zellen der Zelllinie 647V verwendet. Hierzu wurde das in Abb. 1 dargestellte Schema angewendet. Somit erhielt man eine Verdünnungsreihe von 1000, 100, 10 und 1 Zelle in 10^7 PBMCs in Form von 700 μl umfassenden Lysaten. Die Aufbewahrung der Lysate bis zur weiteren Verarbeitung erfolgte bei -20 °C.

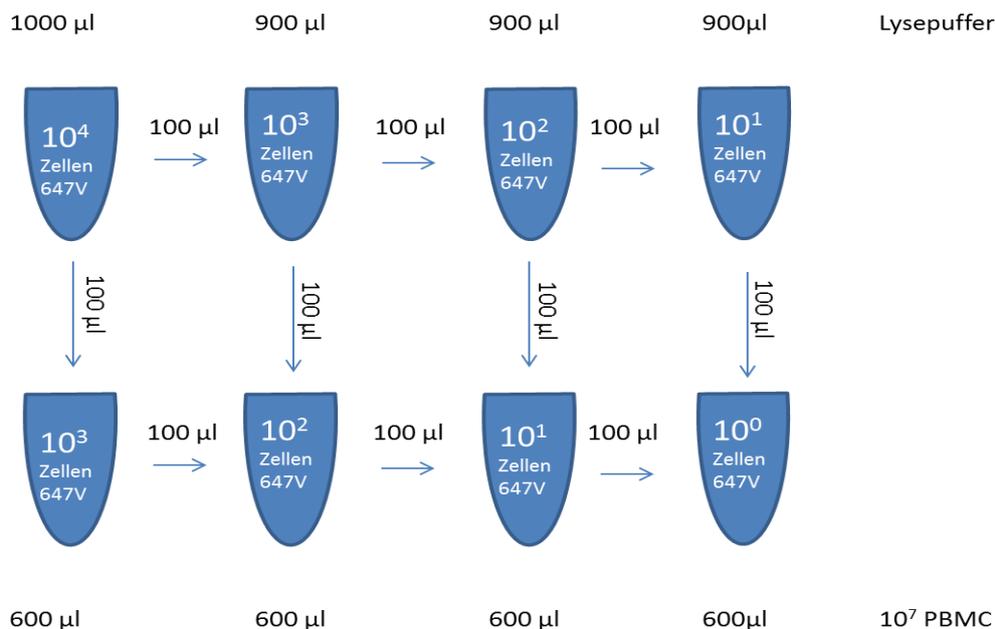


Abbildung 1: Pipettierschema der Zellverdünnungsreihe.

4.2.2 Lymphknotengewebe

Im Rahmen der multizentrischen, prospektiven und randomisierten LEA-Studie der AUO der Deutschen Krebsgesellschaft soll das progressionsfreie Überleben der Blasen tumorpatienten abhängig von der Größe des Lymphadenektomiefeldes untersucht werden. Hierzu wurden Lymphknoten von Blasen tumorpatienten aus einem eingeschränkten sowie einem ausgedehnten Lymphadenektomiefeld entnommen und histopathologisch untersucht. Ein Großteil des Lymphknotenmaterials der Patienten aus dem Universitätsklinikum Rechts der Isar der Technischen Universität München wurden im Rahmen dieser Studie ebenfalls molekularbiologisch untersucht. Einschlusskriterium war das Vorliegen eines histologisch gesicherten komplett resektablen Harnblasenkarzinoms. Ob eine komplette Resektion des Tumors möglich war, wurde präoperativ durch eine bimanuelle Untersuchung und den Befund der Computertomographie abgeklärt. Als Kontrolle dienten 136 histopathologisch tumorfreie Lymphknoten von 45 Patienten mit lokal beschränktem Prostatakarzinom. Gemäß den Richtlinien der Ethikkommission wurden alle Patienten aufgeklärt und willigten zur Entnahme und anschließenden Untersuchung der Lymphknoten ein.

Eine Hälfte der Blasen tumorkollektivs erhielt im Rahmen der radikalen Cystektomie eine eingeschränkte Lymphadenektomie, die andere Hälfte eine ausgedehnte Lymphadenektomie. Die Grenzen der eingeschränkten Lymphadenektomie waren kranial die Bifurkation der Iliakalgefäße, lateral der Nervus genitofemoralis, kaudal der Beckenboden und dorsal der Nervus obturatorius. Bei der ausgedehnten Lymphadenektomie erstreckte sich das Operationsgebiet kranial bis zum Abgang der Arteria mesenterica inferior aus der Aorta und dorsal bis zur dorsalen Beckenwand. Die laterale und kaudale Grenze entsprach der des eingeschränkten Feldes (Abb. 2)

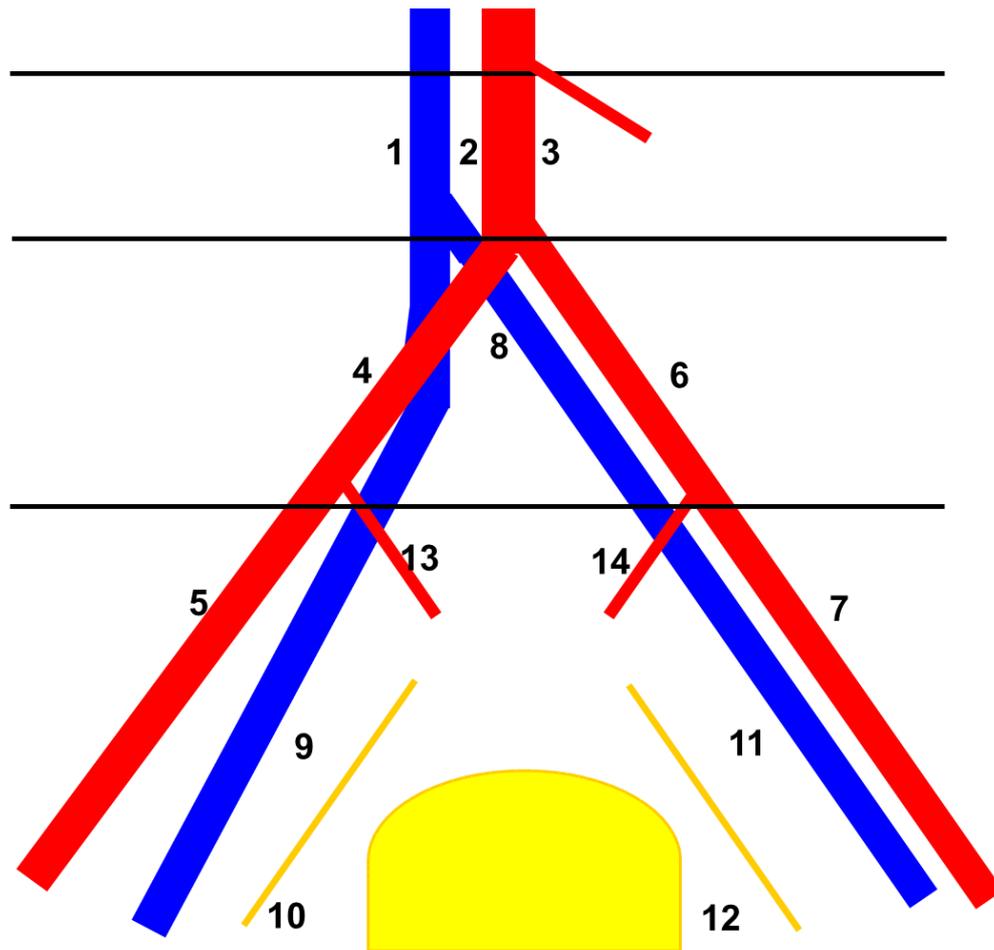


Abbildung 2: Topographie der Lymphknotenfelder der eingeschränkten und ausgedehnten Lymphadenektomie.

Erklärung zu Abbildung 2: Nr. 1 u. 2: parakaval, Nr. 3: paraaortal, Nr. 4 u. 6: lateral A. iliaca communis, Nr. 8: präsakral, Nr. 5 u. 7: A. iliaca externa, Nr. 9 u. 11: obturatorische Gruppe, Nr. 13 u. 14: A. iliaca interna, Nr. 10 u. 12: tiefe obturatorische Gruppe; eingeschränktes Lymphadenektomiefeld: Nr. 5, 9, 7, 10, 11; 12, 13, 14
ausgedehntes Lymphadenektomiefeld: Nr. 1–14

Es wurden insgesamt 2906 Lymphknoten von 86 Blasen tumorpatienten entnommen und histopathologisch untersucht. Lymphknoten, die eine Größe von weniger als drei Millimeter aufwiesen wurden nicht für eine molekulare Analyse verwendet und waren damit einer alleinigen histopathologischen Untersuchung bestimmt. 1453 Lymphknoten mit einer Größe von mehr als drei Millimeter konnten so mittels qRT-PCR und Histopathologie untersucht

werden. Zur Festlegung der Grenzwerte der sechs Marker dienten 136 histopathologisch negative Lymphknoten von 45 Patienten mit lokal beschränktem Prostatakarzinom. Bei den verwendeten Lymphknoten wurde molekularbiologisch mittels qRT-PCR zusätzlich eine Mikrometastasierung des Prostatakarzinoms durch fehlende PSA-Expression ausgeschlossen.

Lymphknotenpräparation

Im Operationssaal wurde die Lymphknoten von überschüssigem Fett- und Bindegewebe befreit und diese anschließend unter sterilen Bedingungen mit Hilfe eines sterilen Skalpells in zwei Hälften geteilt. Eine Lymphknotenhälfte wurde in Formalin fixiert und umgehend zur pathologischen Untersuchung an das Institut für allgemeine Pathologie der Technischen Universität München übersandt. Die andere Hälfte des Lymphknotens wurde in sterilisierter Aluminiumfolie verpackt und zunächst in flüssigem Stickstoff aufbewahrt. Bis zum Prozess der RNA-Extraktion wurden die Lymphknotenhälften bei -80 °C zwischengelagert. Von der Lymphknotenhälfte, welche für die molekularbiologische Untersuchung bestimmt war, wurde zusätzlich ein Teil mittels Schnellschnitt durch den Pathologen untersucht. Dadurch sollte ausgeschlossen werden, dass sich genau in der Hälfte, welche nicht durch den Histopathologen untersucht wurde, eine Metastase befunden hat (Abb. 3)

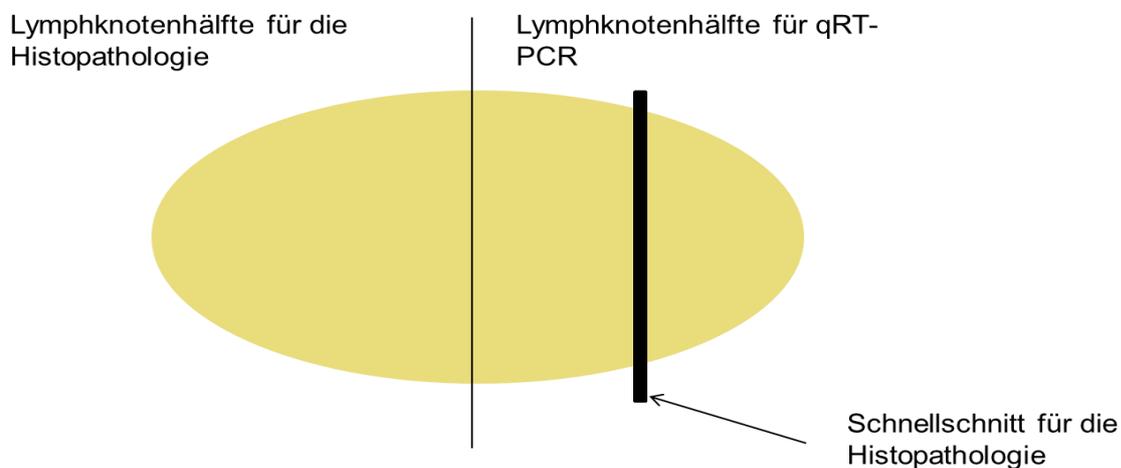


Abbildung 3: Schematische Darstellung der Lymphknotenpräparation.

Zeigte sich ein histopathologischer Nachweis einer Metastasierung in einem der Lymphknoten der Blasen tumorpatienten, so wird dieser Lymphknoten im Folgenden als pN1 bezeichnet, für histopathologisch tumorfreie Lymphknoten wird die Abkürzung pN0 verwendet. Besaß eine Patient einen einzigen histopathologisch positiven Lymphknoten, so wurde der Patient als pN1 klassifiziert, waren mehr als ein Lymphknoten bei einem Patienten histopathologisch positiv, so wurde der Patient als pN2 klassifiziert

Insgesamt hatten 1453 von 2906 (50 %) Lymphknoten eine Größe von kleiner drei Millimeter und wurden nur histopathologisch untersucht.

4.2.2.1 Material und Reagenzien für die mechanische Lyse der Lymphknoten

Reagenzien

Eis	Laboreigene Eismaschine
Flüssigstickstoff	Hausinterne Apotheke
Trockeneis	Hausinterne Apotheke
RNA Later®	Ambion®
Lysepuffer	Ambion®

Verbrauchsmaterialien

Einwegpinzetten	Servoprax® GmbH
Pipettenspitzen 1250 µl	Biozym
Pipettenspitzen 5 ml für Pipettierhilfe	Ritter GmbH
Einwegskalpelle No. 21	Feather®
Mundschutz Sentinex® Lite EL	Lohmann Rauscher International GmbH & Co KG
OP-Haube Sentinex® Trend	Lohmann Rauscher International GmbH & Co KG
2 ml FastPrep® Tubes	MP Biomedicals
Reaktionsgefäß 1,5 ml, 2 ml	Süd-Laborbedarf GmbH
Tubes 0,5 ml	VWR
Kugeln Ceramic Sphere 1/4“	MP Biomedicals
Sand Garnet Matrix A Bulk	MP Biomedicals
Wägeschalen Rotilabo®	Carl Roth GmbH + Co KG

Laborgeräte

FastPrep-24 Tissue and Cell Homogenizer	MP Biomedicals
Waage AT 250	Mettler
Zentrifuge 5415R Eppendorf	Eppendorf

34 X 2ml Cool Prep TM Sample Holder	MP Biomedicals
Pipettierhilfe	Eppendorf
Flüssigstickstoffbehälter Dewar	KGW-Isotherm

4.2.2.2 Ablauf der mechanischen Lyse der Lymphknotenproben

Sämtliche Mehrweggebrauchsmaterialien für die Lymphknotenaufbereitung wurden vor ihrer Verwendung dampfsterilisiert. Die Arbeit mit dem Gewebe fand auf Trockeneis statt. Abhängig von der Größe der Lymphknoten (Mindestgröße drei Millimeter) wurden die kleineren Lymphknotenhälften in 500 µl, die größeren Lymphknotenhälften in 1000 µl RNA-Later aufgetaut in jeweils zwei bzw. fünf Milliliterl Röhren überführt. Über die Differenz der mit RNA-Later befüllten Röhren ohne und mit Lymphknotengewebe, konnte das alleinige Gewicht der Lymphknoten errechnet werden. Wies eine Lymphknotenhälfte eine Masse von mehr als 100 mg auf, so wurde diese nochmals geteilt. Zur Gewebefragmentierung wurde jeder Lymphknotenanteil in jeweils ein FastPrep-Tube, welches zuvor mit 1000 µl Lysepuffer und einer Ceramic Sphere Kugel befüllt wurde, überführt. Es erfolgte eine mechanische Homogenisierung des Lymphknotengewebes in den Tubes durch den mit Trockeneis befüllten Cryo-Prep Adapter (40 sec, 6,5 m/s). Den FastPrep-Tubes wurde zur noch feineren Gewebefragmentierung jeweils 200 mg Sand Garnet Matrix zugefügt und bei selber Einstellung des Gerätes die mechanische Homogenisierung fortgesetzt. Der Inhalt der FastPrep Tubes wurde in sterile zwei Milliliter Tubes überführt, welche bei 1000 g für 60 Sekunden zentrifugiert wurden. Der Überstand wurde anschließend auf 1,5 ml Röhren verteilt, der Rest verworfen. Sollte eine Lymphknotenprobe aufgrund ihres Gewichtes zuvor auf mehrere Gefäße verteilt worden sein, wurden nun alle Überstände der ursprünglichen Lymphknotenhälfte zusammengeführt, sorgfältig gemischt und anschließend wieder gleichmäßig auf die gleiche Anzahl an Röhren verteilt.

1453 (50 %) Lymphknoten besaßen eine Größe von drei Millimeter und mehr und konnten dadurch sowohl histopathologisch als auch molekularbiologisch untersucht werden

4.3 RNA Extraktion aus Lysaten der Lymphknoten, 17 Blasen-tumorzelllinien, PBMCs und Zell-Verdünnungsreihe

4.3.1 Material und Reagenzien für die RNA Extraktion

4.3.1.1 Reagenzien

Aqua bidest.	GIPCO Invitrogen
Lysepuffer	Ambion®
mirVana Kit miRNA isolation kit	Ambion®
Acid-Phenol-Choloroform	Ambion®
Ethanol absolut	Merck KGaA

4.3.1.2 Verbrauchsmaterialien

Filtertips 1250 µl, 200 µl, 10 µl	Biozym
Reaktionsgefäß 1,5 ml	Süd-LaborBedarf GmbH
Filter für 1,5 ml Reaktionsgefäße aus mirVana Kit	Ambion®

Anmerkung: alle Materialien die zur RNA-Synthese verwendet wurden, waren RNase-frei

4.3.1.3 Laborgeräte

Zentrifuge 4515R Eppendorf	Eppendorf
Blockthermostat BT 100	Kleinfeld
Absauger Atmolit 16 N	ATMOS MedizinTechnik GmbH & Co.
Tischzentrifuge QikSpin	Süd-LaborBedarf GmbH
Vortexer MS1 Minishaker	IKA®

4.3.2 Ablauf der RNA-Extraktion

Zur RNA-Extraktion wurde das mirVana Kit verwendet, welches auf der Acid-Phenol-Chloroform-Methode der RNA-Extraktion nach Chomczynski basiert (Chomczynski & Sacchi, 1987). Prinzipiell gliedert sich der Prozess der RNA-Extraktion in folgende Schritte: Zellyse, Phasentrennung, RNA-Präzipitation, Waschvorgänge, Lösen der RNA und finale RNA-Konzentrationsbestimmung.

Zu den zuvor hergestellten Lysaten wurden 10 % der Lysatmenge „Homogenate Additive“ hinzu pipettiert. Die Suspension wurde nach gründlichem Mischen für zehn Minuten auf Eis inkubiert, bevor die gleiche Menge an Acid-Phenol-Chloroform wie zuvor Lysepuffer (1000 µl bei den Lymphknotenlysaten, 600 µl bei den Zelllysaten, 700 µl bei den Lysaten der Zellverdünnungsreihe) hinzugefügt wurde. Nach 60 sekündigem Vortexen wurde die Suspension für fünf Minuten bei Raumtemperatur mit 12.000 g zentrifugiert. Durch die Zentrifugation sollte eine Dreischichtung der Zellsuspension stattgefunden haben: eine untere organische Phase, eine intermediäre Phase, in welcher DNA und Proteine akkumuliert sind sowie eine obere wässrige Phase, welche die RNA beinhaltet. Letztere wurde mit größtmöglicher Sorgfalt und ohne Tangieren der mittleren Phase abgehoben und in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Das Volumen wurde abgelesen und ein Drittel des Volumens Ethanol absolut hinzugefügt. Dieser Prozess der Alkoholfällung wurde durch Vortexen der Reaktionsgefäße begünstigt. Die Alkoholfällung wurde auf ein im Kit enthaltenes Säulchen pipettiert und bei 10.000 g und Raumtemperatur für 15 Sekunden zentrifugiert. Im Filtrat sollte nun die gesamte small RNA gelöst sein, die large RNA verließ auf dem Filter, welcher nun 3 Waschschritten unterzogen wurde. Der Filter wurde auf ein frisches 1,5 ml Reaktionsgefäß gesetzt. 700 µl der miRNA Waschlösung wurden auf ihn pipettiert und anschließend bei 10.000 g für 15 Sekunden bei Raumtemperatur zentrifugiert. Das Eluat wurde verworfen. 500 µl der Waschlösung 2/3 wurden anschließend auf den Filter pipettiert und das Reaktionsgefäß mit selber Zentrifugeneinstellung wie im vorherigen Schritt des Waschvorgangs behandelt. Der Filter wurde mit Waschlösung 2/3 unter selben Bedingung ein zweites Mal behandelt. Die Eluate wurden erneut verworfen. Um den Filter von übrigen Flüssigkeitsrückständen zu befreien, erfolgte ein erneuter Zentrifugationsschritt des Reaktionsgefäßes mit Filter ohne Zufügen jeglicher Reagenzien. Resultat war ein gereinigter Filter, welcher nur noch large RNA tragen sollte. Zur Reelution der RNA wurden 100 µl nukleasefreies Wasser auf die Mitte des Filters pipettiert. Die hohe Temperatur des Wassers von 95 °C sollte die Ausbildung komplexer Sekundärstrukturen der RNA verhindern bzw. vorhandene Sekundärstrukturen lösen. Nach Ablauf einer fünf minütigen Inkubationszeit erfolgte ein Zentrifugationsschritt mit 12.000 g bei Raumtemperatur für 30 Sekunden. Um die Ausbeute der RNA-Menge zu erhöhen, wurde das Filtrat erneut auf den Filter pipettiert und bei selbiger Einstellung zentrifugiert. Die RNA war nun reeluiert, der Filter konnten verworfen werden. Direkt im Anschluss folgte die Konzentrationsmessung der auf Eis gelagerten RNA.

4.3.3 Photometrische Bestimmung der RNA-Konzentration

Mithilfe von spektralphotometrischen Messungen kann nicht nur die Konzentration, sondern auch die Qualität der RNA bestimmt werden. Mittels Biophotometer (Nanodrop 2000c Spectrophotometer, Peqlab, Erlangen) erfolgte eine Messung der jeweiligen Probe im ultravioletten Licht bei einer Wellenlänge von 260 nm sowie 280 nm. Über die optische Dichte bei 260 nm (OD_{260}) kann auf die Konzentration an Nukleotiden rückgeschlossen werden. Die optische Dichte bei 280 nm (OD_{280}) stellt ein Maß für die Verunreinigung der Probe mit Proteinen und Chemikalien dar. Der Reinheitsgrad der Probe ergibt sich dann letztendlich aus dem Quotienten der OD_{260}/OD_{280} . Proben, die einen Wert von kleiner 1,8 aufwiesen, wurden nicht verwendet. Jeweils 1 μ l der Proben wurde zur Konzentrationsmessung auf den Sensor des Nanodrops gegeben und gegen einen Leerwert (H_2O) gemessen. Die Ergebnisse wurden anschließend durch das Programm mitgeteilt.

Bis zur weiteren Verwendung der RNA wurde diese bei $-80\text{ }^\circ\text{C}$ im Kühlschrank zwischengelagert.

4.4 Reverse Transkriptase Reaktion

4.4.1 Material und Reagenzien für die Reverse Transkriptase Reaktion

4.4.1.1 Reagenzien

RNase-freies Aqua bidest.	GIBCO Invitrogen
High-Reaktionsgefäßacity cDNA reverse transcription Kit, Invitrogen™	Applied biosystems
Eis	Laboreigene Eismaschine

4.4.1.2 Verbrauchsmaterialien

Pipettenspitzen 200 μ l, 20 μ l, 10 μ l	Corning
Reaktionsgefäß 0,2 ml	Biozym®
Reaktionsgefäß 1,5 ml	Süd-LaborBedarf GmbH

4.4.1.3 Laborgeräte

Tischzentrifuge QikSpin	Süd-LaborBedarf GmbH
Vortexer MS1 Minishaker	IKA®
Thermocycler MJ-Research PTC-200	Bio-Rad

4.4.2 Prinzip der reverse Transkriptase Reaktion

Im Gegensatz zur doppelsträngigen DNA (Desoxyribonukleinsäure) liegt die RNA (Ribonukleinsäure) in einzelsträngiger Form vor und ist bedingt durch den möglichen Abbau durch ubiquitär vorkommenden RNasen relativ instabil. Das Enzym Reverse Transkriptase ist in der Lage RNA in doppelsträngige cDNA (copy DNA) zu transkribieren, welche wesentlich stabiler gegenüber äußeren Einflüssen ist. Eine längerfristige Lagerung im Kühlschrank bei – 80 °C ist dadurch wesentlich besser möglich. Die umgeschriebene cDNA dient als Ausgangsmaterial für die sich anschließende Polymerase-Kettenreaktion (s.u.).

4.4.3 Durchführung der reverse Transkriptase Reaktion

Die Zielkonzentration der cDNA lag bei 100 ng/µl in einem Gesamtvolumen von 20 µl. Dazu wurde zunächst folgender Reaktionsansatz auf Eis in ein 0,2 ml Reaktionsgefäß pipettiert:

Tabelle 3: Reaktionsansatz zur Durchführung der reverse Transkriptase Reaktion.

Reagenz	Volumen in µl
10 X Puffer	2
10 X RT Random Primers	2
25 X dNTP Mix	0,8
Multiscribe Reverse Transkriptase	1
RNase Inhibitor	1
Gesamtvolumen	6,8

Damit die cDNA die gewünschte Endkonzentration von 100 ng/µl aufwies, musste zum Reaktionsansatz das Volumen an RNA hinzu pipettiert werden, welches 2000 ng RNA enthielt. Das Volumen der RNA und des Reaktionsansatzes zusammen wurde durch nukleasefreies Aqua bidest. auf ein Volumen von 20 µl vervollständigt.

Der Prozess der Transkription der mRNA in cDNA fand mit folgenden Einstellungen im Thermocycler statt:

Tabelle 4: Einstellungen des Thermocyclers für die cDNA Synthese (nach Herstellerangaben).

	Temperatur (°C)	Dauer
Stufe 1	25	10 min
Stufe 2	37	120 min
Stufe 3	85	5 sec

Nach vollendeter cDNA-Synthese wurde die cDNA bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C zwischengelagert.

4.5 Quantitative Reverse Transkriptase Polymerase-Kettenreaktion (qRT-PCR)

4.5.1 Material und Reagenzien für die qRT-PCR

4.5.1.1 Reagenzien

RNase-freies Aqua bidest.	GIBCO Invitrogen
TaqMan® Gene expression master mix	Applied biosystems
Primer für qRT-PCR	Siehe Tabelle 13

Tabelle 5: Gensequenzen der Marker und Referenzgene.

Referenzgen	Bestellnummer	Amplicon	Markierung
KRT17	Hs01588578_m1	93 bp	FAM
KRT20	Hs00300643_m1	75 bp	FAM
UPKII	HS00171854_m1	81 bp	FAM
SPINK1	HS00162154_m1	85 bp	FAM
FXD3	HS00254211_m1	94 bp	FAM
MUC5B	Hs00861588_m1	60 bp	FAM
GAPDH	4326317E	122 bp	VIC
HPRT1	Hs01003267_m1	72 bp	VIC
YWHAZ	Hs00237047_m1	70 bp	VIC

4.5.1.2 Verbrauchsmaterialien

Pipettenspitzen 200 µl, 20 µl, 10 µl	Corning
96-Well Hard Shell® Platte	Bio-Rad
Microseal® `B` Film	Bio-Rad
Reaktionsgefäß 0,2 ml	Biozym®
Reaktionsgefäß 1,5 ml	Süd-Laborbedarf GmbH

4.5.1.3 Laborgeräte

Tischzentrifuge QikSpin	Süd-Laborbedarf GmbH
Vortexer MS1 Minishaker	IKA®
RealTime PCR Thermocycler CFX 96	Bio-Rad
Zentrifuge 5810 Eppendorf	Eppendorf

4.5.2 Prinzip der Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion ist eine in vitro-Methode zur Amplifikation von kleinsten Mengen spezifischer DNA-Sequenzen (Rassow, 2006).

Die Nukleotidsequenzen unserer Marker waren so gewählt, dass sie einen Ausschnitt aus der Gensequenz des jeweiligen Genes (FXVD3, KRT17, KRT20, MUC5B, SPINK1, UPKII) darstellten und damit spezifisch für die jeweiligen Gensequenzen waren. Als Ausgangsmaterial wurde die zuvor synthetisierte cDNA der Lymphknoten verwendet.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die quantitative Reverse Transkriptase Polymerasekettenreaktion (qRT-PCR) zum Nachweis der Genexpression der einzelnen Marker verwendet. Grundsätzlich gilt es zwei Arten der Polymerase-Kettenreaktion zu unterscheiden: die qualitative PCR (auch als Endpunkt-PCR bezeichnet), bei der eine Analyse des vervielfältigten Materials erst im Anschluss an die eigentliche Kettenreaktion mittels Gelelektrophorese stattfindet sowie die quantitative Polymerasekettenreaktion, bei der direkt im Anschluss an jeden Zyklus der Kettenreaktion eine Messung der entstandenen PCR-Produkte folgt. Im Folgenden wird zuerst das grundsätzliche Prinzip einer Polymerase-Kettenreaktion erläutert, bevor genauer auf die qRT-PCR eingegangen wird.

Folgende Materialien sind für die Durchführung der PCR notwendig: die DNA-Matrize, welche die Zielsequenz beinhaltet, eine thermostabile Polymerase (z.B. Taq-Polymerase), Primer, dNTPs, Puffer, MgCl₂. Bei den Primern handelt es sich um 15 - 30 Basen lange einzelsträngige

Oligodesoxynukleotide. Die Sequenz der Primer ist dabei so gewählt, dass ein Primer komplementär zur Nukleinsäuresequenz im Sinnstrang, der andere zur Nukleinsäuresequenz im Gegensinnstrang ist. Dadurch wird die Zielsequenz beidseits von den Primern tangiert. Die Amplifikation der Zielsequenz wird durch ein zyklisches Wiederholen folgender Reaktionsschritte erreicht (s. Abb. 4):

1. Denaturierung: Der Ausgangs-cDNA-Doppelstrang wird durch eine Temperaturerhöhung auf 94 °C hitzedenaturiert und in seine beiden komplementären Einzelstränge durch Trennung der Wasserstoffbrückenbindungen aufgespalten.
2. Annealing: Es erfolgt eine Anlagerung der chemisch synthetisierten Primer an den jeweiligen DNA-Abschnitt. Die dabei erforderliche Temperatur ist abhängig von der Länge und der Sequenz der verwendeten Primer (37 – 65 °C). Dabei sollte die Temperatur etwa 5 °C unter der Schmelztemperatur der Primer liegen.
3. Elongation: Die hitzestabile DNA-Polymerase kann an den 3'-OH-Enden der zuvor angelagerten Primer die im Überschuss zugefügten dNTPs komplementär zur Sequenz der Matrize anlagern. Dadurch wird die beidseits durch die Primer begrenzte DNA-Sequenz kopiert. Die Synthese erfolgt abhängig vom Temperaturoptimum der eingesetzten Polymerase bei circa 72 °C.

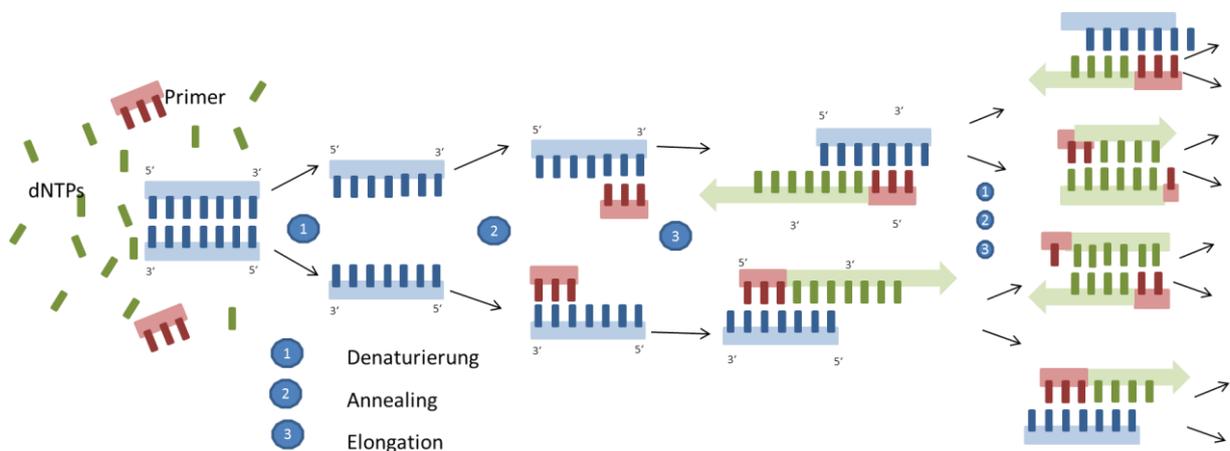


Abbildung 4: Ablauf der Polymerasekettenreaktion (in Anlehnung an Horn,2005).

Nach Ablauf eines Zyklus und Verdopplung des ursprünglichen Ausgangsmaterials folgt ein weiterer Zyklus. Die Anzahl der sich anschließenden Zyklen variiert abhängig von der Menge an Ausgangs-Template. Bei geringerer Ausgangsmenge sollte die Zahl der Zyklen erhöht werden, allerdings sollte eine Zykluszahl von 45 nicht überschritten werden, da sonst die Zahl an unspezifischen Basenpaarungen unter anderem auch Primerdimeren zunimmt und das Ergebnis verfälscht wird (Newton, 1997).

Rein rechnerisch könnte bei einem sich 40 mal wiederholenden Zyklus eine Amplifikation des Ausgangsmaterials um den Faktor 2^{40} erzielt werden (Horn, 2005). Tatsächlich wird die Effizienz der Polymerasekettenreaktion durch verschiedenste Faktoren begrenzt. Zu Beginn

der Reaktion ist die Menge an Template limitiert, eine Paarung zwischen dem Primer, Polymerase und Template ist viel unwahrscheinlicher als zu bereits fortgeschrittener Zykluszahl ist. Während zu Beginn der Amplifikation die geringe Template-Ausgangsmenge den limitierenden Faktor darstellt, führt gegen Ende der Reaktion ein Aufbrauchen der Materialien zu einer Begrenzung der Amplifikation.

In der klassischen Endpunkt-PCR kann anschließend das vervielfältigte DNA-Material in der Gelelektrophorese analysiert werden.

Die qRT-PCR besitzt gegenüber der klassischen Endpunkt-PCR den Vorteil, dass die Detektion der PCR-Produkte bereits während der Amplifikation, direkt nach Abschluss jedes PCR-Zyklus in realer Zeit stattfindet.

Für die qRT-PCR existieren zwei Methoden der Signalmessung, wobei beide Methoden auf der Emittierung eines Fluoreszenzsignales bei Anwesenheit der Zielsequenz beruhen, welches direkt proportional zur Menge der amplifizierten Gensequenz ist: Eine Möglichkeit ist die Verwendung fluoreszierender Farbstoffe, die unspezifisch mit der neu gebildeten doppelsträngigen DNA interkalieren (z.B. SYBR Green). Die andere Art der Detektion besteht in der Verwendung fluorophormarkierter Oligonukleotide (Sonde), die spezifisch an eine Region innerhalb der Zielsequenz binden, wodurch ein falsch positives oder unspezifisches Signal verhindert wird. Letztere Art der Signalmessung wurde in dieser Arbeit angewendet. Dabei wurden TaqMan-Assays, doppelt fluoreszenzmarkierte Sonden verwendet. TaqMan Sonden bestehen aus 3 Bestandteilen: eine von 15-30 Basen umfassende Abfolge von Oligonukleotiden, die komplementär zur Sequenz innerhalb der Zielgensequenz ist, ein fluoreszierender Farbstoff am 5`-Ende des Moleküls (sog. Reporter) und ein Inhibitor am 3`-Ende, der sogenannte Quencher. Durch räumliche Nähe des Reporters zum Quencher wird die Fluoreszenz des Reporters am 5`-Ende im nativen Zustand unterdrückt, sodass kein Licht emittiert werden kann und folglich kein Signal detektierbar ist (Abb. 5). Der Quencher wird im Rahmen der 5`-3`-Exonukleaseaktivität der Taq-Polymerase abgebaut, wodurch die räumliche Nähe zum Reporter abnimmt und dieser in der Lage ist, ein Signal auszusenden. Dieser Abbau kann aber nur dann stattfinden, wenn auch tatsächlich zuvor eine spezifische Bindung zwischen Sonde und Zielsequenz stattgefunden hat. Eine Emittierung von Licht deutet somit auf das Vorhandensein der markerspezifischen Gensequenz hin (Abb. 6).



Abbildung 5: Aufbau der FAM-markierten Sonde. Durch räumliche Nähe zum Quencher wird die Fluoreszenz des Reporters unterdrückt.



Abbildung 6: Durch Hydrolyse der Sonde durch die Polymerase findet eine räumliche Trennung von Quencher und Reporter statt. Der Reporter emittiert ein Fluoreszenzsignal.

Neben den spezifischen Hybridisierungs-Sonden wurde zur relativen Quantifizierung des Genexpressionsverhaltens zusätzlich ein externer Standard benötigt. Hierbei handelte es sich um die endogenen Referenzgene GAPDH, HPRT1 sowie YWHAZ, die ubiquitär von jeder Zelle exprimiert werden.

4.5.3 Durchführung der qRT-Polymerase-Kettenreaktion

Zur Durchführung der qRT-PCR wurden 50 ng cDNA der Patientenprobe in einem 10 µl Reaktions-Ansatz verwendet. Der Reaktionsansatz setzte sich aus folgenden Bestandteilen zusammen:

Tabelle 6: Reaktions-Ansatz zur Durchführung der qRT-Polymerase-Kettenreaktion.

Reagenz	Volumen in µl
TaqMan® Gene Expression Master Mix	5
FAM-markierter Primer und Sonde	0,5
nukleasefreies H ₂ O oder VIC-markierter Primer Sonde	0,5
50 ng cDNA	4
Endvolumen	10

Entsprechend des Plattendesigns wurde der Reaktionsansatz in das vorgesehene Well der 96-Wells Hardshell Platte pipettiert und die Platte mit einem Microseal verschlossen. Bei den Markern KRT17, UPKII und SPINK1 wurde zur Detektion von Target- und Referenzgenen eine Dual-Colour qRT-PCR durchgeführt. Dabei wurde im Reaktionsansatz von KRT17, UPKII und SPINK1 anstelle von Wasser GAPDH, HPRT1 und YWHAZ pipettiert. Zur Detektion der anderen drei Marker wurde eine Mono-Colour qRT-PCR durchgeführt.

Jedes Experiment, welches Lymphknoten-cDNA enthielt, wurde dabei als Duplikat pipettiert, die spätere Analyse der Markerexpression erfolgte basierend auf dem Mittelwert beider Experimente. Sollte nur eines der beiden Experiment ein positives Resultat geliefert haben, so wurde der positive Wert für die weitere Berechnung verwendet, eine Mittelwertberechnung war in diesem Fall nicht möglich.

Pro Marker und Platte wurde zusätzlich als Positivkontrolle ein cDNA Äquivalent von 10 ng RNA der Blasentumorzelllinien 647V für die Marker KRT17, KRT20, UPKII, SPINK1 und FXYD3 sowie BFTC905 für den Marker MUC5B als auch eine sogenannte Non-Template-Controle (NTC) pipettiert. Für diese wurde anstelle von cDNA Wasser zum Reaktionsansatz pipettiert. Ein positives Ergebnis für die NTC-Probe hätte auf eine Kontamination der Materialien hingewiesen.

Unter folgender Einstellung fand die PCR statt:

95 ° C	10 min	
95 ° C	15 sec	} 45 X
60 ° C	1 min	

4.5.4 Überprüfung der Sensitivität der Polymerasekettenreaktion

Um die Sensitivität der qRT-PCR Technik für FXYD3, KRT17, KRT20, SPINK1 und UPKII zu bestimmen, wurden Verdünnungsreihen der Blasenkarzinomzelllinien 647V erstellt. Hierzu wurden 1000 bis 0 Zellen in cDNA äquivalent zu 50 ng RNA von 10⁷ PBMCs verdünnt und als Triplikate pipettiert und anschließend einer molekularbiologischen Untersuchung mittels qRT-PCR unterzogen.

Zusätzlich erfolgte die Bestimmung der Sensitivität durch eine Verdünnung einer definierten Zahl an Kopien (0-10⁶) der Marker in reinem Wasser sowie 50 ng cDNA von PBMCs. Die Standardkurven hierzu wurden ebenfalls als Triplikat angefertigt.

Berechnung der Kopienzahl

Über die Berechnung der Menge an Plasmiden in einem µl konnte eine Verdünnungsreihe der einzelnen Markerfragmente erstellt werden.

$$\text{Plasmidkopienzahl}/\mu\text{l} = \frac{\text{Plasmidkonzentration}(\text{g}/\mu\text{l})}{\text{Plasmidgröße (bp)} \times \text{Molekulargewicht eines Basenpaares (g/mol bp)}} \times \text{Avogadrokonstante (1/mol)}$$

Die Plasmidkonzentration wurde durch das Nanodrop Spectrophotometer ermittelt. Bei der Plasmidgröße handelt es sich um die Summe aus Größe des verwendeten Vektors zur

Klonierung und Größe des klonierten Markerfragmentes. Das mittlere Molekulargewicht eines DNA-Basenpaares beträgt 660 g/mol. Die Avogadrokonstante 1 mol = $6,023 \times 10^{23}$ Teilchen (hier: Genomkopien).

4.5.5 Auswertung der qRT-PCR

Im Anschluss an die PCR wurde durch die Software des Cyclers in einem Amplifikationsplot die Anzahl der PCR-Zyklen auf der X-Achse gegen die Intensität des Fluoreszenzsignals auf der Y-Achse aufgetragen. Aus der Hintergrundfluoreszenz konnte ein Schwellenwert für die Fluoreszenz der Proben ermittelt (Threshold) werden. Der Zyklus, bei welchem das Fluoreszenzsignal erstmals über dem Threshold der jeweiligen Probe liegt, wird als Ct-Wert (cycle threshold) bezeichnet. Dieser ist indirekt proportional zur eingesetzten Menge an DNA. Ein niedriger Ct-Wert bedeutet eine hohe Ausgangsmenge an DNA und umgekehrt (Abb. 7).

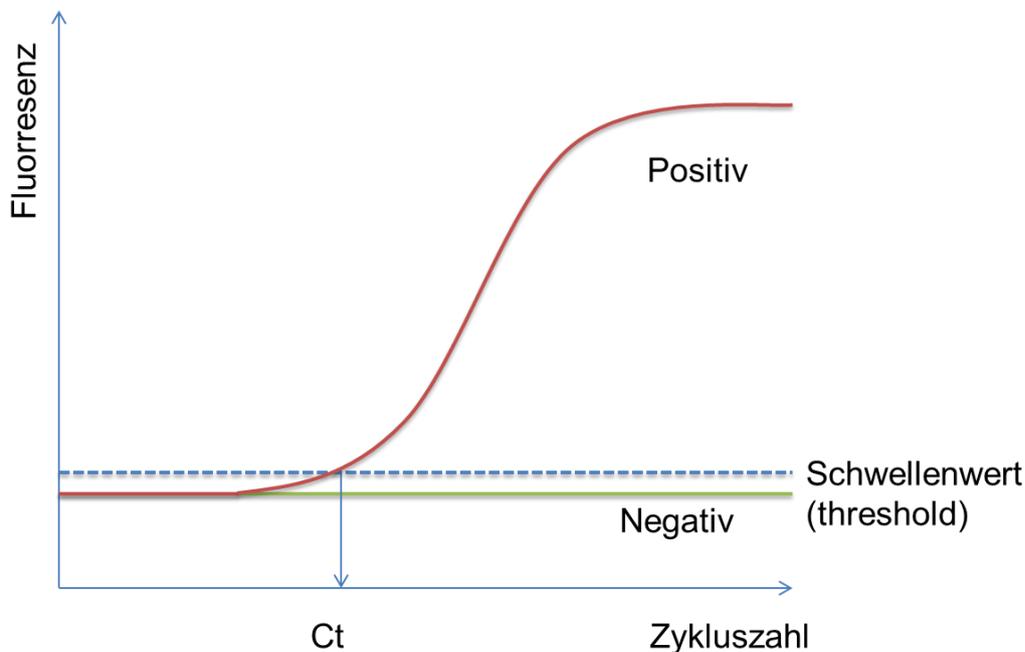


Abbildung 7: Darstellung eines Amplifikationsplottes in der qRT-PCR.

Erklärung zur Abb. 7: Sowohl Negativ als auch Positiv zeigen eine gewisse Grundfluoreszenz, bevor eine Amplifikation stattgefunden hat. Der Schnittpunkt zwischen Amplifikationskurve und Schwellenwert wird als *Cycle-threshold* (Ct) bezeichnet. Dieser weist auf einen Anstieg der Fluoreszenz über den Schwellenwert hin.

Um eine Aussage über das Expressionslevel der einzelnen Marker im untersuchten Material machen zu können, gibt es prinzipiell zwei Strategien (Biosystems): die absolute und die relative Quantifizierung.

Durch die absolute Quantifizierung kann Rückschluss auf die exakte Ausgangsmenge gezogen werden. Dazu ist ein Standard, dessen Konzentration beziehungsweise

Ausgangsmenge exakt bekannt ist, notwendig. In unserem Fall handelte es sich hierbei um die klonierten Sequenzen unserer Marker. Mittels einer Verdünnungsreihe konnte so eine Kalibrierkurve erstellt werden und anhand dieser dann die Quantifizierung vorgenommen werden. (Pfaffl, 2004) (Abb. 8).

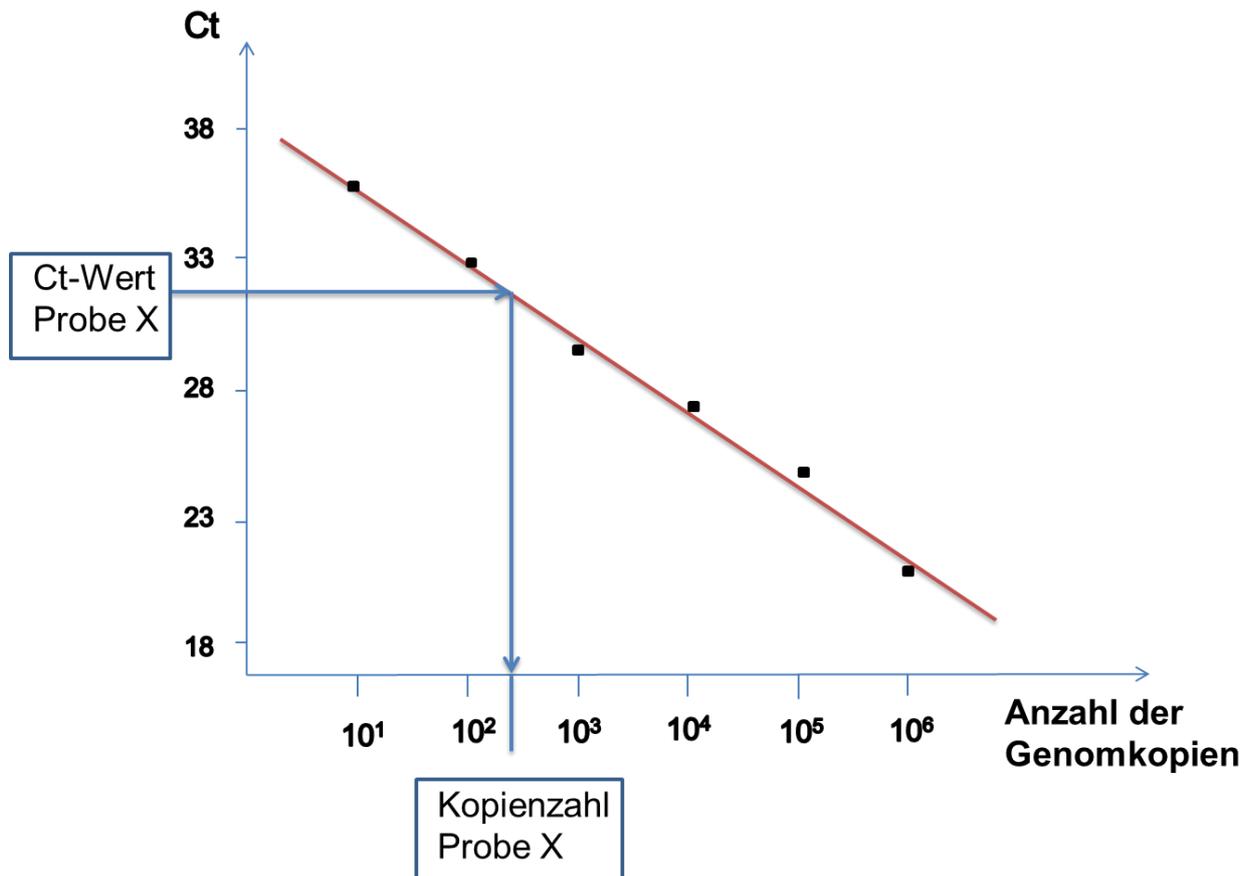


Abbildung 8: Erstellung einer Standardkurve mittels absoluter Quantifizierung.

Erklärung zu Abb. 8: Aus den Ct-Werten und den dazugehörigen Genomkopienzahlen kann eine Standardkurve ermittelt (rote Linie) werden. Über den Ct-Wert der zu quantifizierenden Probe X kann über die Standardkurve Anzahl der Genomkopien (blaue Linien) berechnet werden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die absolute Quantifizierung lediglich zur Determinierung der Sensitivität unserer Methode verwendet.

Bei der relativen Quantifizierung wird die Expression der Zielsequenz, in unserem Fall also die Sequenz der Marker relativ auf eine zweite, dem Marker nicht verwandte, nicht regulierte Sequenz bezogen. Bei der zweiten Sequenz handelt es sich um die Sequenzen der Referenzgene. Dabei kann die Expression entweder auf ein einziges Referenzgen oder auf einen Referenzgen-Index, bestehend aus mehreren Referenzgenen, bezogen werden. Durch

die Verwendung eines Referenzgenindex können eventuelle Schwankungen in der Expression einzelner Referenzgene ausgeglichen werden (Pfaffl, 2004). Bei uns setzte sich der Referenzgenindex aus GAPDH, HPRT1 und YWHAZ zusammen.

Es fand eine Normalisierung der PCR-Ergebnisse gegenüber dem geometrischen Mittel des Referenzgen-Index zum Kalibrator statt. Beim Kalibrator handelt es sich um die Genexpression von 10 Zellen 647V in 10^7 PBMCs aus dem Blut eines gesunden freiwilligen Spenders der Marker FXYD3, KRT17, KRT20, SPINK1 und UPKII. Dem Kalibrator wurde ein relativer Genexpressionswert von 1 zugewiesen. Die Ergebnisse wurden mittels der $\Delta\Delta Cq$ -Methode errechnet:

$$\Delta \Delta Cq = \Delta Cq - \Delta Cq_{cb} \quad 2^{-\Delta\Delta Cq}$$

$\Delta Cq = CtX - CtR$; Normalisierter Ct für die Probe

ΔCq_{cb} = Normalisierter Ct für den Kalibrator

CtX = Ct der Zielsequenz der entsprechenden Probe

CtR = Ct des Referenzgenindex der entsprechenden Probe

Grundlage für die Verwendung der $\Delta\Delta Cq$ -Methode ist eine gleiche Effizienz der Referenzgen-PCR und der Zielsequenz-PCR.

4.5.6 Überprüfung der Spezifität der qRT-PCR

Zur Überprüfung der Spezifität unserer Methode wurde 50 ng cDNA von 17 verschiedenen Blasen-tumorzelllinien sowie 50 ng cDNA von 10^7 PBMCs von 3 freiwilligen gesunden Spendern untersucht auf die Genexpression der verschiedenen Marker untersucht. Außerdem wurden 136 Lymphknoten von 45 Patienten mit lokal beschränktem Prostata-Karzinom auf die Genexpression der verschiedenen Marker untersucht. Die Kontrollgruppe diente der Schwellenwertberechnung. In dieser Arbeit wurde der Maximalwert der Genexpression der unterschiedlichen Marker als Grenzwert für die Beurteilung molekularpositiv/ molekularnegativ verwendet.

4.6 Molekularbiologie – Klonierung der Sequenzen der Marker

Zur Bestimmung der Sensitivität unserer PCR verwendeten wir unter anderem die Methode der absoluten Quantifizierung: Es wurden Verdünnungsreihen der klonierten Sequenzen der Marker erstellt und diese anschließend molekularbiologisch mittels qRT-PCR untersucht. Dazu wurden Ausschnitte der Gene KRT17, KRT20, UPKII,

Spink1, FXYD3 und MUC5B zunächst kloniert und in einem nächsten Schritt durch die Firma GATC sequenziert.

4.6.1 Material und Reagenzien für die Klonierung

4.6.1.1 Reagenzien

Agarose UltraPure™	Invitrogen™
Ethidiumbromid 10 mg/ml	Sigma
TBE-Puffer 10 X	
Reagenzien zur Durchführung einer qPCR	
DNA-Later 100 bench	
Loading Dye	
TOPO TA Cloning® Kit und TA Cloning® Kit	Invitrogen™
One shot® competent cell Kit	Invitrogen™
Ampicillin	
M13 Forward Primer	
M13 Reverse Primer	
ECoR1 Puffer	New England BioLabs®
EcoR1	New England BioLabs®
RNase freies Wasser	GIBCO Invitrogen™
Go Taq Polymerase	
QIAprep® Spin Miniprep Kit (250)	Qiagen

Tabelle 7: Verwendete Materialien aus dem TA-Cloning® Kit.

Bezeichnung	Zusammensetzung
pCR2.1 Vektor (linearisiert)	25 ng/µl in 10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8
10 X Ligationspuffer	100 mM Tris-HCl, pH 8.3 (bei 42°C) 500 mM KCl 25 mM MgCl ₂

	0.01% Gelatine
T4 DNA-Ligase	4.0 Weiss units/ μ l

Tabelle 8: Verwendete Materialien aus One Shot® Competent cell Kit.

Bezeichnung	Zusammensetzung
S.O.C. Medium	2% Trypton 0.5% Yeast Extract 10 mM NaCl 2.5 mM KCl 10 mM MgCl ₂ 10 mM MgSO ₄ 20 mM Glukose (Dextrose)
TOP10F`-Zellen	---

4.6.1.2 Verbrauchsmaterialien

Filtertips 200 μ l, 20 μ l, 10 μ l	Corning
Reaktionsgefäß 0,2 ml	Biozym®
PCR-Stripes und Deckel	
Wiegepapier	neoLab®
LB-Platten mit 100 μ l/ml Ampicillin	
Eppendorf Gefäße 1,5 ml	Eppendorf
15 ml Anzuchtröhrchen	Greiner bio-one
Platten 100 X 20 mm	Falcon™

4.6.1.3 Laborgeräte

Tischzentrifuge QikSpin	Süd-LaborBedarf GmbH
Vortexer MS1 Minishaker	IKA®
RealTime PCR Thermocycler CFX 96	Bio-Rad
Zentrifuge 5810 Eppendorf	Eppendorf
Magnetrührer IKAMAG® RCT	IKAMAG
Mikrowelle	Panasonic
Gelelektrophoreseapparaturen	Peqlab Biotechnologie GmbH
Elektrophoresenetzgerät EPS 601	Amersham pharmacia biotech
ICycler™ Thermal Cycler	Bio-Rad

Wasserbad

Thermomixer comfort Eppendorf

Eppendorf

Schüttelinkubator

ChemiDoc™ XRS molecular imager

Bio-Rad

Nanodrop 200c spectrophotometer

Peqlab

Inkubator

Heraeus instruments

4.6.2 Prinzip des Klonierens

Wir verwendeten das TA-Cloning® Kit und Topo-TA-Cloning Kit zur Klonierung der gewünschten Gensequenzen. Zunächst wurden die entsprechenden Gensequenzen mittels qRT-PCR amplifiziert. Die dabei zum Zuge kommende Taq Polymerase besitzt neben ihrer Polymerase- sowie 5'-3'-Exonukleaseaktivität zusätzlich die Fähigkeit, matrizenunabhängig am 3'-Ende der PCR-Produkte ein einzelnes Adenin hinzuzufügen. Der pCR®2.1-Vektor, welcher zentraler Bestandteil des Topo® TA-Cloning® Kits ist, sowie der pCR®II-Vektor (TA Cloning® Kit) besitzen an ihrem 3'-Ende ein einzelnes Thymin. Dadurch kann eine effiziente Ligation der PCR-Fragmente in den linearisierten Klonierungsvektor mittels der Topoisomerase I des Vaccinia Virus erfolgen (Abb. 9).

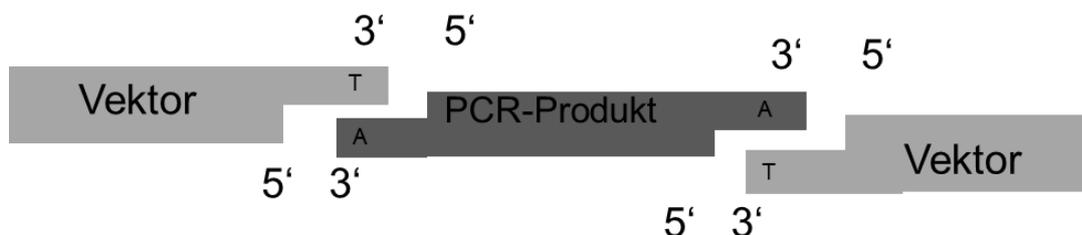


Abbildung 9: Prinzip der TA Cloning® und Topo® TA Cloning® Methode.

4.6.2.1 Aufbau pCR®2.1-Vektor

Neben seinem 3'-Überhang enthält der Vektor eine Multiple-Cloning-Site im lacZα-Gen sowie zusätzlich Resistenzgene für die Antibiotika Ampicillin und Kanamycin für eine Selektion der Transformanden, sowie einen F1 ori für die Replikation von E.coli (Abb. 10).

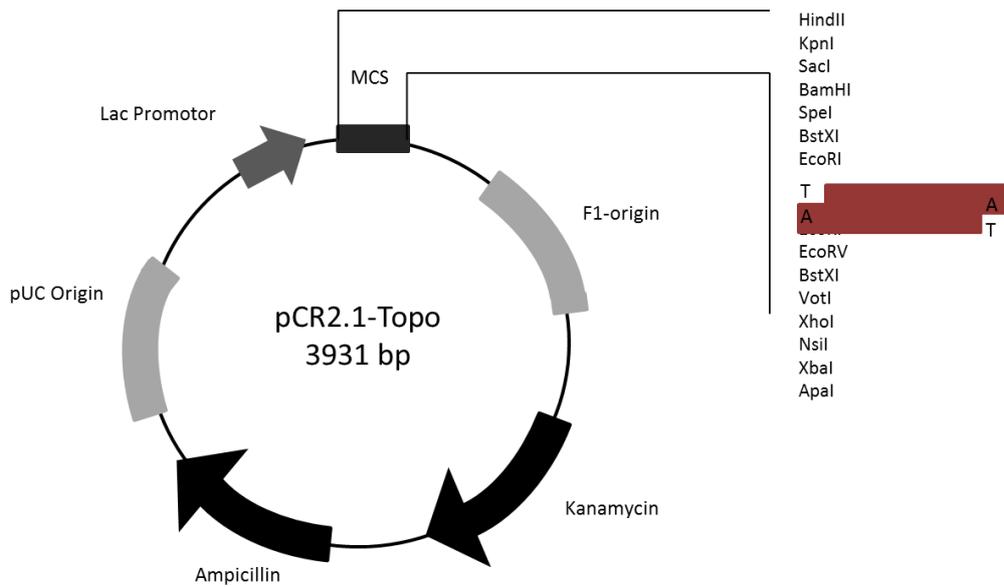


Abbildung 10: Schematische Darstellung des pCR2.1 Vektors.

4.6.2.2 Aufbau pCR®II-Vektor

Der funktionale Aufbau dieses Vektors ähnelt stark dem, des pCR®2.1-Vektors, jedoch ist er mit einer Größe von 3973 bp etwas größer (Abb. 11).

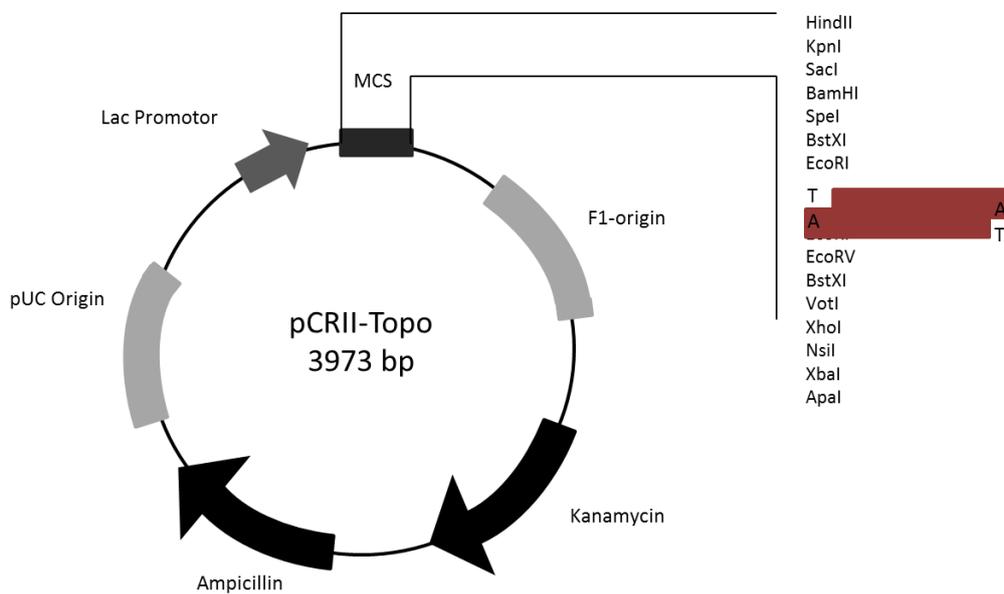


Abbildung 11: Schematische Darstellung des pCRII Vektors

Die Tabelle 9 zeigt die Hauptschritte der Klonierung der Gensequenz in den pCR®2.1- und pCR®II-Vektor:

Tabelle 9: Arbeitsschritte der Klonierung der PCR-Produkte.

Schritt	
1	Amplifikation des PCR-Produktes durch die Verwendung der Taq-Polymerase und der jeweiligen Primer
2	Ligation des PCR-Produktes in den Vektor
3	Transformation der Ligation in kompetente E.coli
4	Selektion der Kolonien und Isolation der Plasmid DNA. Analyse des PCR-Produktes auf Anwesenheit und Orientierung des PCR-Produktes durch Enzymverdau und Sequenzierung

4.6.3 Durchführung der Klonierung

4.6.3.1 Amplifikationen des PCR-Produktes

100 ng cDNA der Blasenkarzinomzelllinien 647V und BFTC905 dienten als Matrize für die Taq-Polymerase in der Polymerasekettenreaktion. Es wurde ein 16 µl Ansatz pipettiert. Es erfolgte die Zugabe von 100 ng cDNA, welche in 4µl Wasser gelöst war.

Tabelle 10: Amplifikationsansatz für PCR-Produkte.

Reagenz	Volumen in µl
TaqMan® Gene Expression Master Mix	10
FAM-markierter Primer und Sonde	1
nukleasefreies H₂O	5
Endvolumen	16

Folgende Einstellungen des CFX Real Time System Cyclers wurden verwendet:

95 ° C	10min	} 45 X
95 °C	15 sec	
60 ° C	1 min	
72 ° C	10 min	

Anschließend wurde das amplifizierte Material zusammen mit einem 100bp Bench top ladder auf ein 1,5% Agarosegel aufgetragen und eine Spannung von 150 Volt für 30 Minuten angelegt. Das Gel wurde anschließend mittels ChemiDoc™ XRS molecular

imager betrachtet. Da sich bei allen amplifizierten Gensequenzen nur eine einzelne Bande zeigte, konnte auf eine zusätzliche Gelaufreinigung verzichtet werden.

4.6.3.2 Ligation des PCR-Produktes in pCR®2.1-Vektor und pCR®II-Vektor

Es erfolgte eine sofortige Verarbeitung des frischen PCR-Produktes, da der 3'-Überhang der PCR-Produkte relativ instabil ist.

Folgender Reaktionsansatz wurde in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß hergestellt:

Tabelle 11: Ligationsansatz für die PCR-Produkte.

Reagenz	Volumen in µl
Frisches PCR-Produkt	5
10 X Ligationspuffer	1
pCR®2.1-Vektor (25 ng/µl) bzw. pCR®II-Vektor	2
steriles Wasser	1
T4 DNA Ligase	1
Gesamtvolumen	10

Die Reaktion wurde bei 14 °C für mindestens 4 Stunden im Wasserbad inkubiert. Resultat der Reaktion ist eine Ligation der PCR-Produkte in den Vektor.

4.6.3.3 Transformation des Plasmids in E.coli

2 µl des Ligationsansatzes wurden nach abgelaufener Inkubationszeit in das Reaktionsgefäß mit den kompetenten E.coli pipettiert, vorsichtig gemischt und für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Es erfolgte ein Hitze-Schock der kompetenten Zellen durch Erhitzen der Reaktionsgefäße auf 42 °C für exakt 30 Sekunden. Durch diesen Vorgang kommt es zu einem Flip-Flop in der Membran der Bakterien, sodass die Plasmide in das Bakterium aufgenommen werden können. Nach einer weiteren Inkubationszeit von 30 Minuten wurden 250 µl des auf 37 °C aufgewärmten S.O.C Mediums zum Reaktionsgefäß hinzugefügt, welches anschließend für eine Stunde bei 37 °C mit 225 rpm geschüttelt wurde. 10 µl sowie 200 µl der Bakteriensuspension

wurden auf den körpertemperaturwarmen Agarkulturplatten gleichmäßig verteilt und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Diese setzten sich aus folgenden Bestandteilen zusammen: 0,5 % NaCl, 0,5 % Hefeextrakt, 1 % Pepton, 1,5 % Agar. Um eine Selektion zu erzielen wurde den Platten 100 µg/ml Ampicillin hinzugefügt.

4.6.3.4 Selektion der Kolonie, Aufreinigung und Kontrollverdau

Am folgenden Tag erfolgte die Analyse der über Nacht gewachsenen Kolonien, mittels Colony Screen. Dazu wurde zunächst folgender PCR-Mix hergestellt und in ein PCR-Stripe pipettiert:

Tabelle 12: Materialien zum Colony Screen.

Reagenz	Volumen in µl
GoTaq Polymerase	12,5
M13 forward Primer	2,5
M13 reverse Primer	2,5
Nukleasefreies Wasser	7,5
Gesamtvolumen	25

Die Sequenzen von M13 reverse und forward Primer sind dabei komplementär zur Sequenz im Vektor und schließen das ligierte PCR-Fragment sicher ein. Die Primer binden spezifisch circa 70 Basenpaare vor und hinter der Ligationstelle an die komplementäre Sequenz des Vektors (Abb. 12).

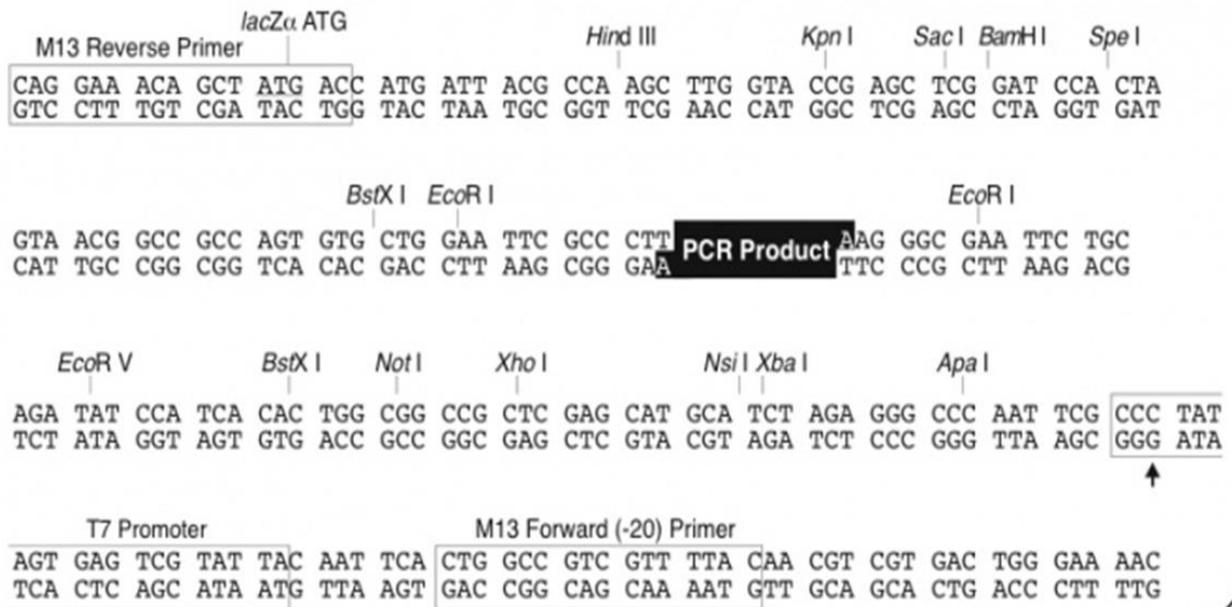


Abbildung 12: Ausschnitt aus der Nukleotidsequenz des pCR2.1®Vektors (Invitrogen, 2004).

Insgesamt 20 Kolonien wurden mit jeweils einer sterilen 10 µl Pipettenspitze gepickt, auf einer LB-Platte an einen definierten Ort getupft und die Spitze anschließend im PCR-Ansatz im Stripe vorsichtig gerührt, sodass sich Teile der Bakterienkolonie im PCR-Mix vermengen konnten. Als Negativkontrolle wurden 10 ng 647V in 1µl nukleasefreiem Wasser gelöst und zum 25 µl Mix pipettiert.

Folgende Einstellungen wurden in den ICycler der Firma Bio-Rad eingegeben:

94 ° C	3 min	
94 ° C	30 sec	} 45 X
55 ° C	30 sec	
72 ° C	1 min	
72 ° C	5 min	

Anschließend erfolgte eine Beurteilung der Kolonien mittels Gelelektrophorese: nach durchlaufenem PCR-Programm wurden die PCR-Mixe in die Taschen eines 1,5 prozentigen Agarosegels gefüllt und bei 150 V Netzspannung für 45 min angeschlossen. Es erfolgte eine Betrachtung des Gels mit dem ChemiDoc™ XRS molecular imager. Diejenigen Kolonien, die die richtige Größe aufwiesen, wurden von der Masterplatte mit einer ungestopften 10 µl Pipettenspitze getupft und in ein

vorbereitetes 10 ml Röhrchen mit 5 ml LB-Medium und 5 µl Ampicillin geworfen. Das Röhrchen wurde in Schräglage bei 37 °C 12-16 Stunden schüttelinkubiert.

Es folgte der Schritt der Plasmidaufreinigung mittels MiniPrep. Die Bakterienröhrchen wurden nach Entfernen der Pipettenspitze 10 Minuten lang bei 4 °C und 4000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt, das Pellet in 250 µl Puffer P1 resuspendiert und die Suspension in ein 1,5 ml Tube überführt. Es erfolgte die Zugabe von 250 µl Puffer P2. SDS, welches Bestandteil dieses Puffers ist, führte dabei zur Lösung der Phospholipide und Proteinbestandteile der bakteriellen Zellwand, eine Denaturierung der Plasmid-DNA und der Proteine erfolgte durch Natriumhydroxid. Nach mehrmaligem Kippen des Tubes sollte eine blaue Färbung der Suspension auftreten, welche nach Zugabe 350 µl Puffer N3 und erneutem Schwenken verschwand. Puffer P3 fungierte dabei als Neutralisationspuffer und sollte eine Renaturierung der Plasmid-DNA, nicht jedoch der Proteine bewirken. Die Gefäße wurden bei 16.100 g für zehn Minuten bei 25 °C zentrifugiert, wodurch eine Trennung von re- und denaturierten Bestandteilen stattfand. Der Überstand, in welchem die DNA nun gelöst war, wurde vorsichtig abgehoben, auf ein Qiaprep Säulchen pipettiert und eine Minute bei 16.100 g und Raumtemperatur zentrifugiert. Das Zentrifugat wurde verworfen. Es folgte ein 2-maliger Waschschrift des Säulchens mit 500 µl Puffer PB und 750 µl Puffer PE und anschließender Zentrifugation bei selber Zentrifugeneinstellung. Zuletzt wurden 50 µl EB Puffer auf die Mitte der Membran getropft und nach 2 minütiger Inkubation fand ein finaler Zentrifugationsschritt statt. Die Plasmid DNA war nun im Zentrifugat gelöst. Die Konzentration der Plasmid-DNA wurde mittels Nanodrop ermittelt.

Im letzten Schritt erfolgte ein Restriktionsverdau mit EcoRI. Dieses Enzym, welches von der Firma New England Biolabs stammte, besitzt seine Schnittstelle beidseits der inserierten Sequenz, nur wenige Nukleotide entfernt. 0,5 µg DNA wurden mit 2 µl Puffer EcoRI und 0,15 µl EcoRI auf ein Volumen von 20 µl mit nukleasefreiem Wasser aufgefüllt. Nach 90 minütiger Inkubation im Brutschrank erfolgte die Analyse des Verdau auf einem 1,5 % Gel. Dazu wurde der Verdau mit 2 µl 6X Dye gemischt und in die Tasche des Gels gefüllt. Wies das klonierte Konstrukt die richtige Größe auf, wurde es zum Sequenzieren durch die Firma GATC eingeschickt.

5 ERGEBNISSE

5.1 Klonierung der Gensequenzen von FXYD3, KRT17, KRT20, SPINK1 und UPKII

Die Sensitivität der qRT-PCR wurde u.a. mittels einer absoluten Quantifizierung untersucht. Hierzu wurden zunächst die durch die Primer flankierten Sequenzen mittels des TA-Cloning und Topo TA-Cloning Kits kloniert. Anschließend erfolgte eine Sequenzierung durch die Firma GATC zur Bestätigung einer erfolgreichen Klonierung (Tab. 13).

Im Anhang befindet sich eine Übersicht über die Sequenz der klonierten Marker.

Tabelle 13: Übersicht über die klonierten Marker KRT17, SPINK1, UPKII, KRT20, FXYD3 und MUC5B.

Name des klonierten Plasmids	Vektor / bp	Kloniertes Fragment	Herkunft
pCR2.1ΔKRT17-4	pCR®2.1-Vektor/ 3931bp	KRT17 / 93 bp	diese Arbeit
pCR2.1ΔSPINK1-12	pCR®2.1-Vektor/ 3931 bp	SPINK1 / 85 bp	diese Arbeit
pCR2.1ΔUPKII-5	pCR®2.1-Vektor/ 3931 bp	UPKII / 81 bp	diese Arbeit
pCR2.1ΔKRT20	pCR®2.1-Vektor/ 3931bp	KRT20 / 75 bp	diese Arbeit
pCRIIΔFXYD3-1	pCR®II-Vektor/ 3931bp	FXYD3 / 94 bp	diese Arbeit
pCRIIΔMUC5B	pCR®II-Vektor/	MUC5B/ bp	diese Arbeit

5.2 Sensitivität der qRT-PCR

Zur Determinierung der Sensitivität der qRT-PCR für die Marker FXYD3, KRT17, KRT20, MUC5B, SPINK1 und UPKII wurden zwei verschiedene Methoden angewendet. Es erfolgte eine Verdünnungsserie von 0 – 10⁴ Zellen der Blasen-tumorzelllinie 647V in 10⁷ PBMCs von gesunden, freiwilligen Spendern für die Marker FXYD3, KRT17, KRT20, SPINK1 und UPKII. Die Nachweisgrenze lag für alle Marker bei 10 Zellen.

Zudem erfolgte eine absolute Quantifizierung einer definierten Zahl an Kopien der klonierten Marker für die Marker FXYD3, KRT17, KRT20, SPINK1 und UPKII. Es konnte eine

reproduzierbare Sensitivität von 10 Kopien pro Reaktionsansatz für alle Marker gezeigt werden (Abb. 13).

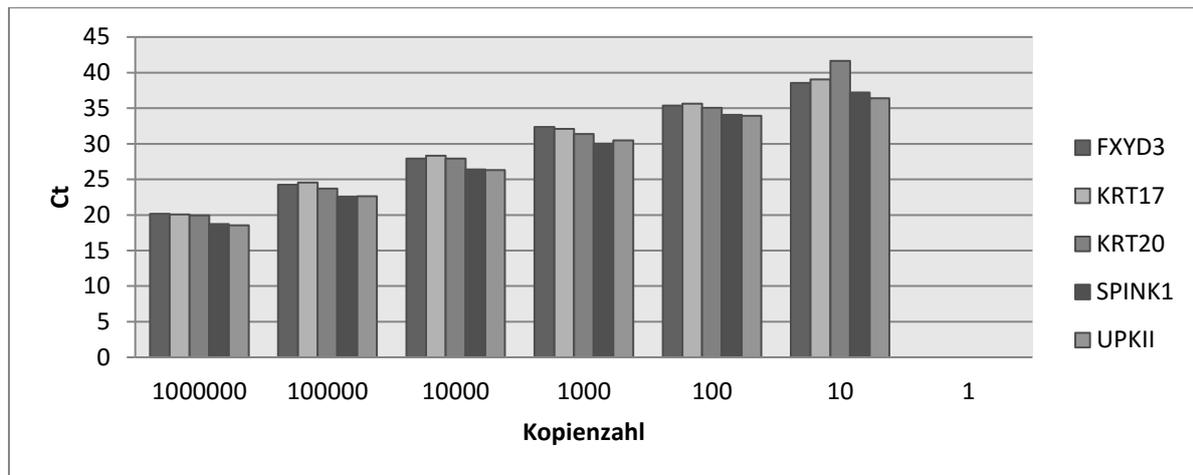


Abbildung 13: Verdünnungsserie einer definierten Zahl an Kopien der Marker FXDY3, KRT17, KRT20, SPINK1 und UPKII in Wasser. Die Zahl der Kopien der einzelnen Markergensequenzen auf der X-Achse ist gegen den Ct-Wert der jeweiligen Verdünnungsstufen auf der Y-Achse aufgetragen

5.3 Spezifität der qRT-PCR

In Verdünnungsserien der Kopien der klonierten Marker in 10^7 PBMCs zeigte sich für die beiden Marker KRT17 und FXDY3 eine basale Expression in den reinen PBMCs. Die anderen vier Marker wurden nicht von den PBMCs exprimiert. FXDY3 konnte in allen Verdünnungsstufen nachgewiesen werden, ab einer Kopienzahl von 100 zeigte sich bei den Ct-Werten ein quantitativer Unterschied und ließ eine Differenzierung zwischen Markerexpression der Fragmente in den Verdünnungsstufen und basaler PBMC-Expression zu. Für KRT17 lag die Nachweisgrenze um ein 10-faches niedriger als für FXDY3, also bei einer Kopienzahl von 10. KRT20 konnte in allen Verdünnungsstufen nachgewiesen werden. Zwischen den Verdünnungsstufen von 1 und 10 ließ sich allerdings kein quantitativer Unterschied nachweisen, so dass wir von einer Sensitivität von 10 Kopien in 10^7 PBMCs ausgehen. Die Nachweisgrenze für SPINK1 und UPKII lag ebenfalls bei 10 Kopien.

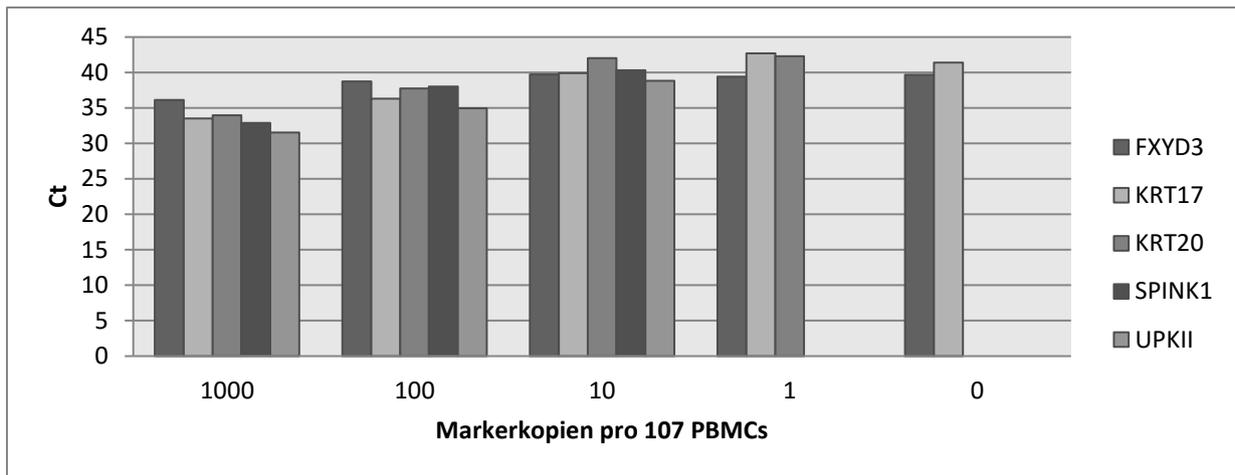


Abbildung 14: Verdünnungsserie einer definierten Zahl an Kopien der fünf Marker in 10^7 mononukleären Zellen peripheren Blutes (PBMCs). Die Zahl der Kopien der einzelnen Markergensequenzen auf der X-Achse ist gegen den Ct-Wert der jeweiligen Verdünnungsstufen auf der Y-Achse aufgetragen.

5.4 Expression der Marker in Blasen-tumorzelllinien

Zur Untersuchung der Spezifität der einzelnen Marker in der qRT-PCR wurden 17 verschiedenen Blasen-tumorzelllinien auf die Expression der sechs Marker getestet. Es erfolgte eine relative Quantifizierung der Werte (Abb. 15 – 20). KRT17 und KRT20 konnten in 16 der 17 Zelllinien detektiert werden, MUC5B konnte in 13 von 17 Zelllinien nachgewiesen werden. In den PBMCs konnten keine Genexpression der Marker nachgewiesen werden. FXYD3, SPINK1 und UPKII lieferten für jede der 17 Zelllinien ein positives Signal, jedoch zeigte sich auch eine Grundexpression der drei Marker in den PBMCs der gesunden Spender. Sechs der 17 Zelllinien wiesen eine geringere Expression von FXYD3 als die PBMCs der gesunden Spender auf (Abb. 15). Eine bzw. drei Zelllinien wiesen eine geringere Genexpression von SPINK1 bzw. UPKII als die PBMCs der Spender auf (Abb.19, 20). Tabelle 14 gibt einen zusammenfassenden Überblick.

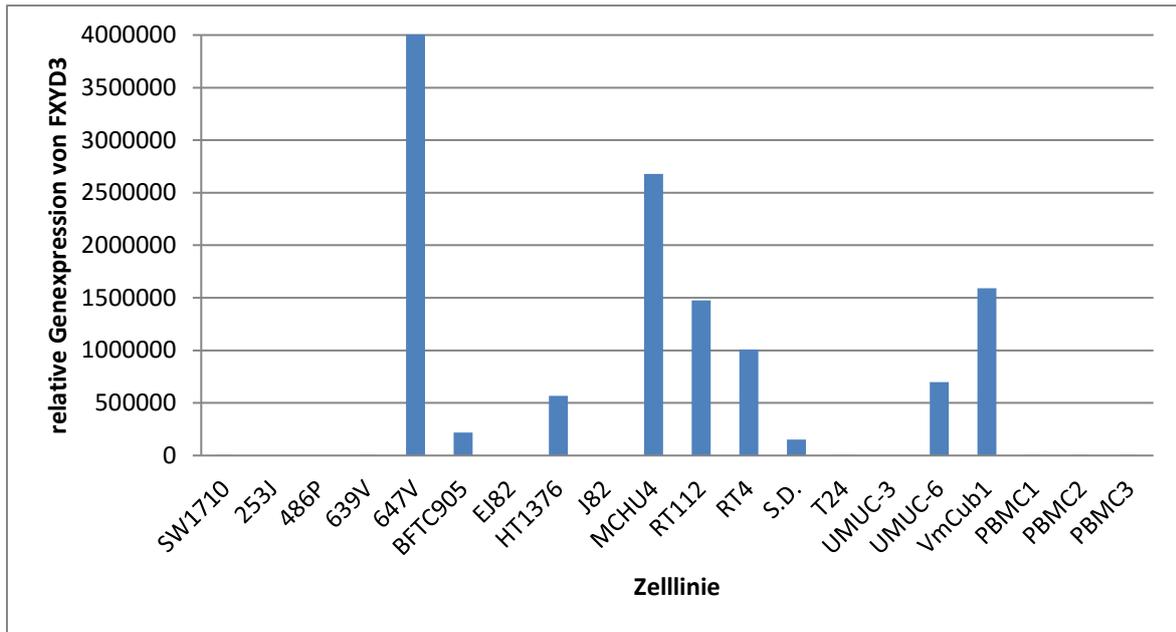


Abbildung 15: Expression von FXYD3 in 17 verschiedenen Blasen tumorzelllinien.

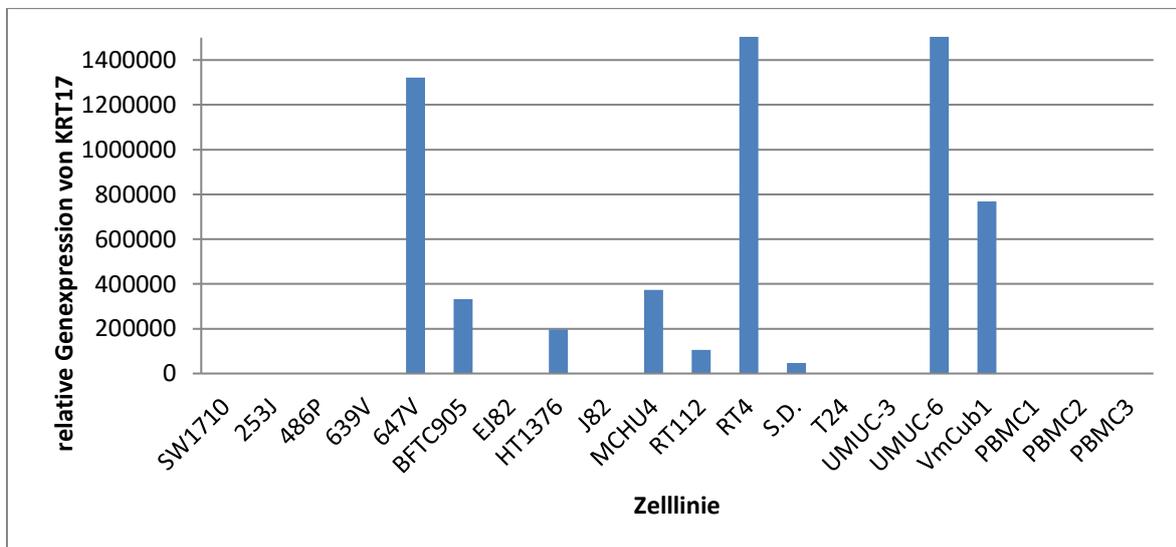


Abbildung 16: Expression von KRT17 in 17 verschiedenen Blasen tumorzelllinien.

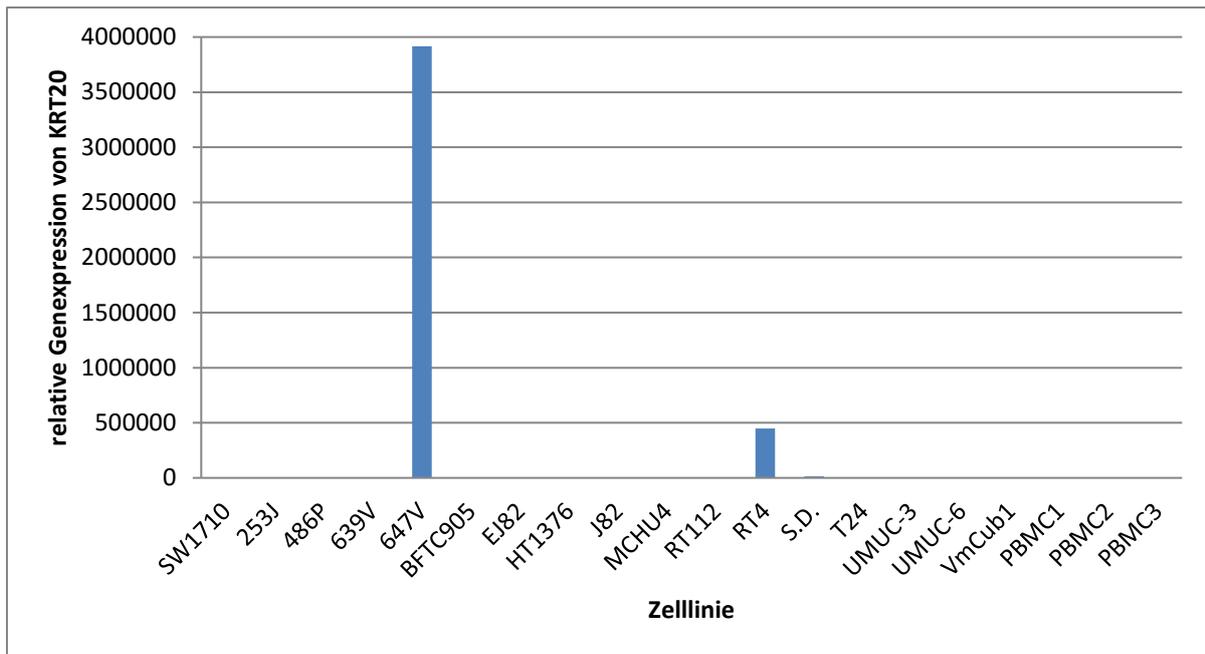


Abbildung 17: Expression von KRT20 in 17 verschiedenen Blasen tumorzelllinien.

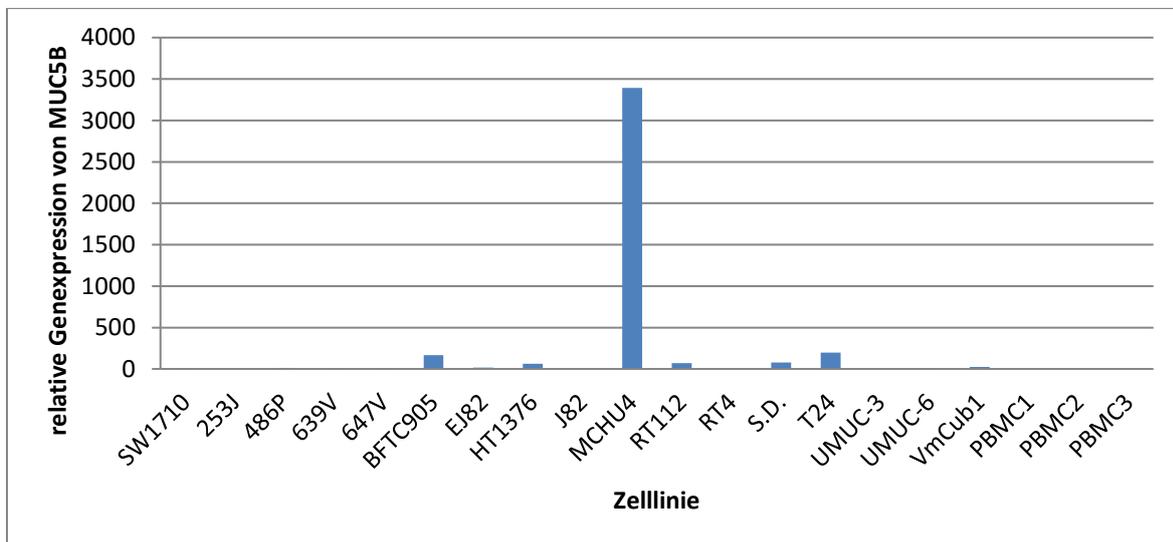


Abbildung 18: Expression von MUC5B in 17 verschiedenen Blasen tumorzelllinien.

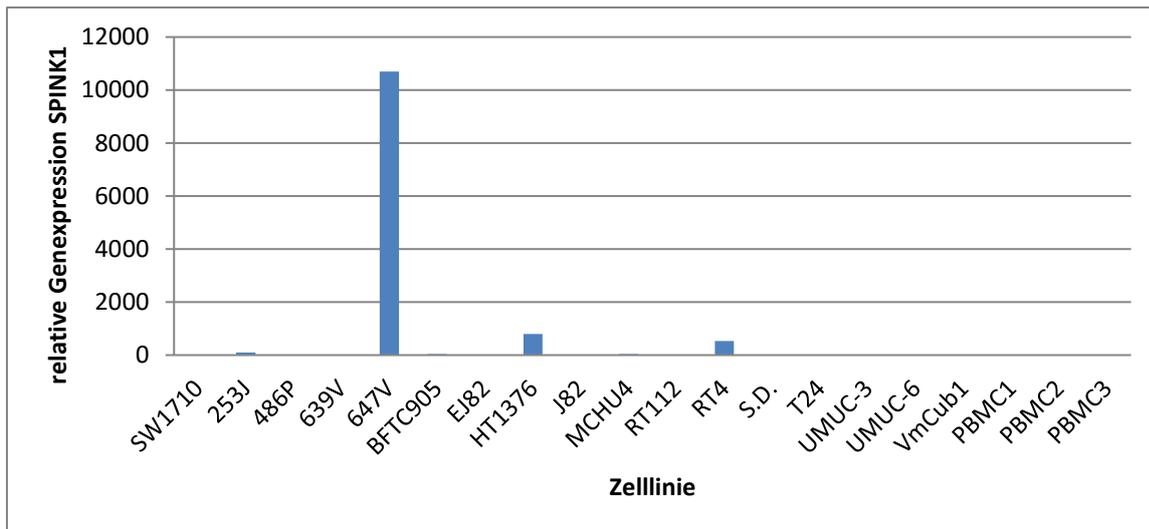


Abbildung 19: Expression von SPINK1 in 17 verschiedenen Blasen tumorzelllinien.

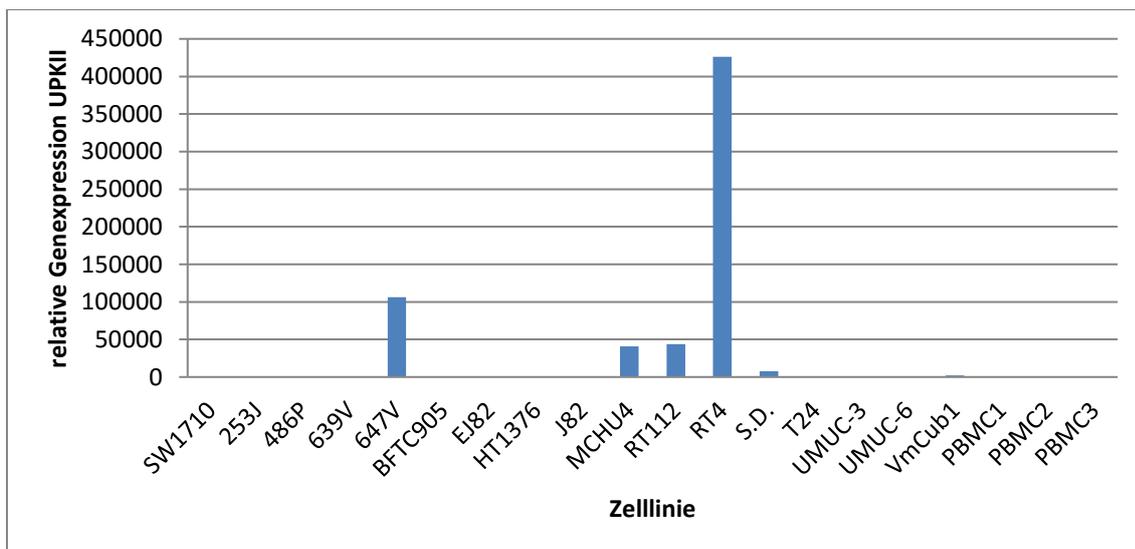


Abbildung 20: Expression von UPKII in 17 verschiedenen Blasen tumorzelllinien.

Tabelle 14: Zusammenfassung der Ergebnisse der Untersuchung der Blasen-tumorzelllinien.

	Anzahl positiver Zelllinien	Anzahl positiver Zelllinien mit höherer Genexpression als Genexpression in PBMCs
FXVD3	17	12
KRT17	16	16
KRT20	16	16
MUC5B	13	13
SPINK1	17	14
UPKII	17	16

5.5 Untersuchung der pelvinen Lymphknoten der Kontrollgruppe mittels qRT-PCR für FXVD3, KRT17, KRT20, MUC5B, SPINK1 und UPKII

Die 136 Lymphknoten der Kontrollgruppe wurden auf die Expression der sechs Marker und der drei Referenzgene GAPDH, HPRT1 und YWHAZ untersucht und die Ergebnisse anschließend einer relativen Quantifizierung unterzogen. Der Maximalwert der Genexpression jedes Markers in allen 136 Lymphknoten wurde für die spätere Analyse der Lymphknoten der Blasen-tumorpatienten als Grenzwert für die Beurteilung molekularpositiv (molN1) bzw. molekularnegativ (molN0) verwendet. In Abb. 21 sind die verwendeten Grenzwerte zusammengefasst.

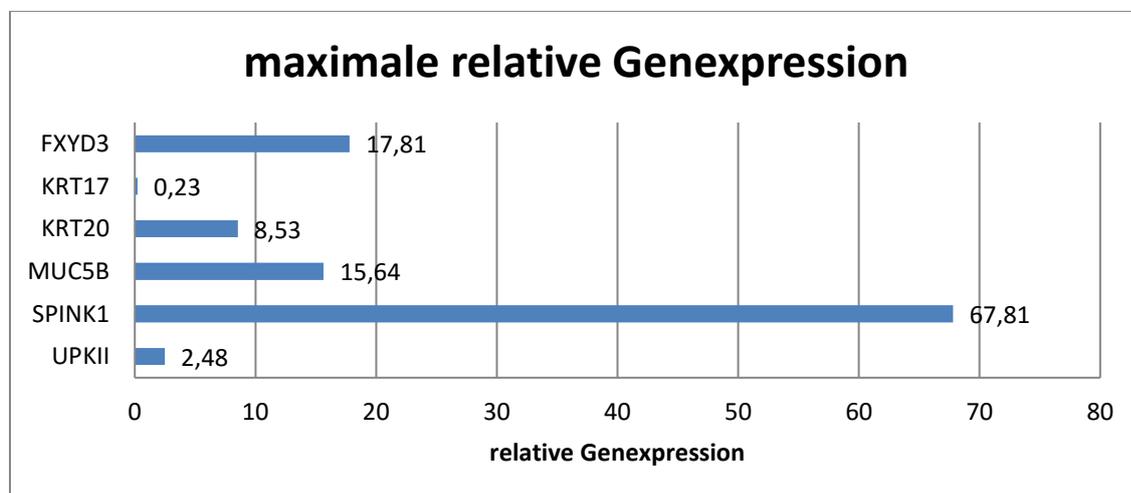


Abbildung 21: Maximale relative Genexpressionswerte in 136 Lymphknoten der Kontrollgruppe (n = 45 Patienten).

5.6 Untersuchung der pelvinen Lymphknoten von Blasentumorpatienten mittels qRT-PCR für FXYD3, KRT17, KRT20, MUC5B, SPINK1 und UPKII

5.6.1 Beschreibung des Patientenkollektivs

Das mittlere Alter der 86 Blasentumorpatienten zum Zeitpunkt der Operation lag bei 68 Jahren (Median 67,5 Jahre), die Altersspanne reichte von 40 bis 84 Jahre. 12 (14 %) Patienten waren weiblichen Geschlechts, 74 (86 %) Patienten waren Männer (Tab. 15).

Es erfolgte eine Randomisierung der Patienten in zwei Kollektive: 50 % der Patienten erhielten eine eingeschränkte Lymphadenektomie (n = 43), 50 % eine ausgedehnte Lymphadenektomie (n = 43) (siehe Abb. 1)

Bei 24 von 86 (28 %) Patienten wurde im Zystektomie-Präparat histopathologisch ein nicht-muskelinvasiv wachsendes Urothelkarzinom (pTis, pTa oder pT1) festgestellt, während bei den restlichen 62 (72 %) Patienten ein muskelinvasives Wachstum (pT2, pT3, pT4) vorlag.

Insgesamt wurden 2906 pelvine Lymphknoten von 86 Patienten mit Urothelkarzinom der Harnblase im Rahmen der radikalen Zystektomie entnommen. Pro Patient wurden durchschnittlich 34 Lymphknoten entfernt (Median: 31, Spannweite 9 – 118). In der Gruppe der Patienten mit ausgedehnter Lymphadenektomie wurden insgesamt 1839 Lymphknoten entnommen und histopathologisch untersucht. (Mittelwert 43, Median 40, Spannweite 18 – 118 Lymphknoten pro Patient). Es wurden insgesamt 1067 Lymphknoten im Patientenkollektiv mit eingeschränkter Lymphadenektomie entnommen (Mittelwert 25, Median 24, Spannweite 9 – 56 Lymphknoten pro Patient). Bei 18 (21 %) Patienten lag eine histopathologisch nachweisbare Lymphknoten-Metastasierung vor (pN1 oder pN2) (Tab. 13). Die Verteilung auf die zwei Lymphadenektomiekollektive war folgendermaßen: 12 von 43 (28 %) Patienten mit ausgedehnter Lymphadenektomie und 6 (14 %) Patienten mit eingeschränkter Lymphadenektomie zeigten histopathologisch nachweisbare Lymphknotenmetastasen.

Tabelle 15: Charakteristika der 86 Blasentumorpatienten.

Alter, Jahre	
Mittelwert (Median)	68 (67,5)
Spannweite	61-77
Zahl der Patienten (%)	
< 65 Jahre	27 (31)
65 - 75 Jahre	35 (41)
> 75 Jahre	24 (28)
Geschlecht, Zahl der Patienten	
männlich	74 (86)
weiblich	12 (14)
Histopathologisches Tumorstadium, Zahl der Patienten (%)	

pTis, pTa,pT1	24 (28)
pT2	23 (27)
pT3	30 (35)
pT4	9 (10)
histopathologischer Lymphknotenstatus, Zahl der Patienten (%)	
pN0	68 (79)
pN1,pN2	18 (21)
Lymphadenektomiefeld; Zahl der Patienten (%)	
eingeschränkte Lymphadenektomie	43 (50)
ausgedehnte Lymphadenektomie	43 (50)

5.6.2 Histopathologische und molekularbiologische Ergebnisse der Lymphknoten der Blasentumorpatienten

1453 Lymphknoten (Größe ≥ 3 mm) konnten mittels qRT-PCR auf die Expression von FXYD3, KRT17, KRT20, MUC5B, SPINK1 und UPKII hin untersucht werden. Somit wurden im Mittel 17 Lymphknoten pro Patient (Median 16, Spannweite 1 - 42) mit beiden Methoden untersucht, wobei dies bei Patienten mit ausgedehnter Lymphadenektomie 21 Lymphknoten pro Patient (Median 19, Spannweite 7 - 42) und bei Patienten mit eingeschränkter Lymphadenektomie 13 Lymphknoten pro Patient (Median 14, Spannweite 1 - 24) waren.

5.6.2.1 Ergebnisse der histopathologischen Auswertung der Lymphknoten von Blasentumorpatienten

Insgesamt wurden 64 (2,2 %) Lymphknoten von 18 (20,9 %) Patienten als histopathologisch positiv beurteilt. Im Patientenkollektiv mit ausgedehnter Lymphadenektomie waren 50 von 1839 (2,7 %) Lymphknoten bei 12 von 43 (27,9 %) Patienten histopathologisch positiv, während im Patientenkollektiv mit eingeschränkter Lymphadenektomie 14 von 1067 (1,3 %) Lymphknoten bzw. 6 von 43 (14,0 %) Patienten eine histopathologisch nachweisbare Lymphknotenmetastasierung hatten (Abb. 22).

45 histopathologisch positive Lymphknoten von 18 Patienten wiesen eine Größe von mehr als 3 mm auf und konnten auch molekularbiologisch untersucht werden. 19 histopathologisch positive Lymphknoten konnten aufgrund mangelnder Größe nur histopathologisch analysiert werden.

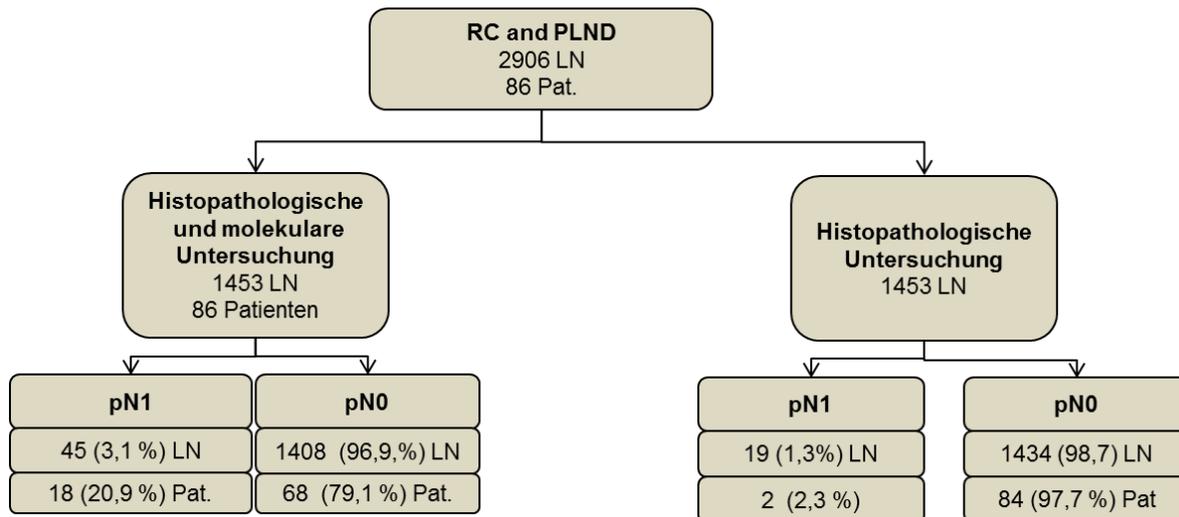


Abbildung 22: Ergebnisse der histopathologischen Untersuchung der 2906 Lymphknoten von 86 Blasenmorpriienten nach radikaler Zystektomie.

5.6.2.2 Ergebnisse der molekularbiologischen Auswertung der Lymphknoten

5.6.2.2.1 Markerexpression in 1453 Lymphknoten der 86 Blasenmorpriienten und der Kontrollgruppe

Insgesamt wurden 1453 Lymphknoten von 86 Blasenmorpriienten auf die Genexpression von FXYD3, KRT17, KRT20, MUC5B, SPINK1 und UPKII untersucht. Anhand der durch die Kontrollgruppe ermittelten Grenzwerte wurde dann eine Unterscheidung der Lymphknoten in molN1 und molN0 vorgenommen.

FXYD3

Anhand der histopathologischen und molekularbiologischen Untersuchung mit FXYD3 wurden 1372 (94,4 %) Lymphknoten als negativ eingestuft (pN0/molN0), 36 (2,5 %) Lymphknoten als histologisch negativ aber molekular positiv (pN0/molN1), 39 (2,7 %) Lymphknoten als histologisch und molekular positiv sowie 6 (0,4 %) Lymphknoten als histologisch positiv aber molekular negativ (pN1/molN0) (Abb. 23).

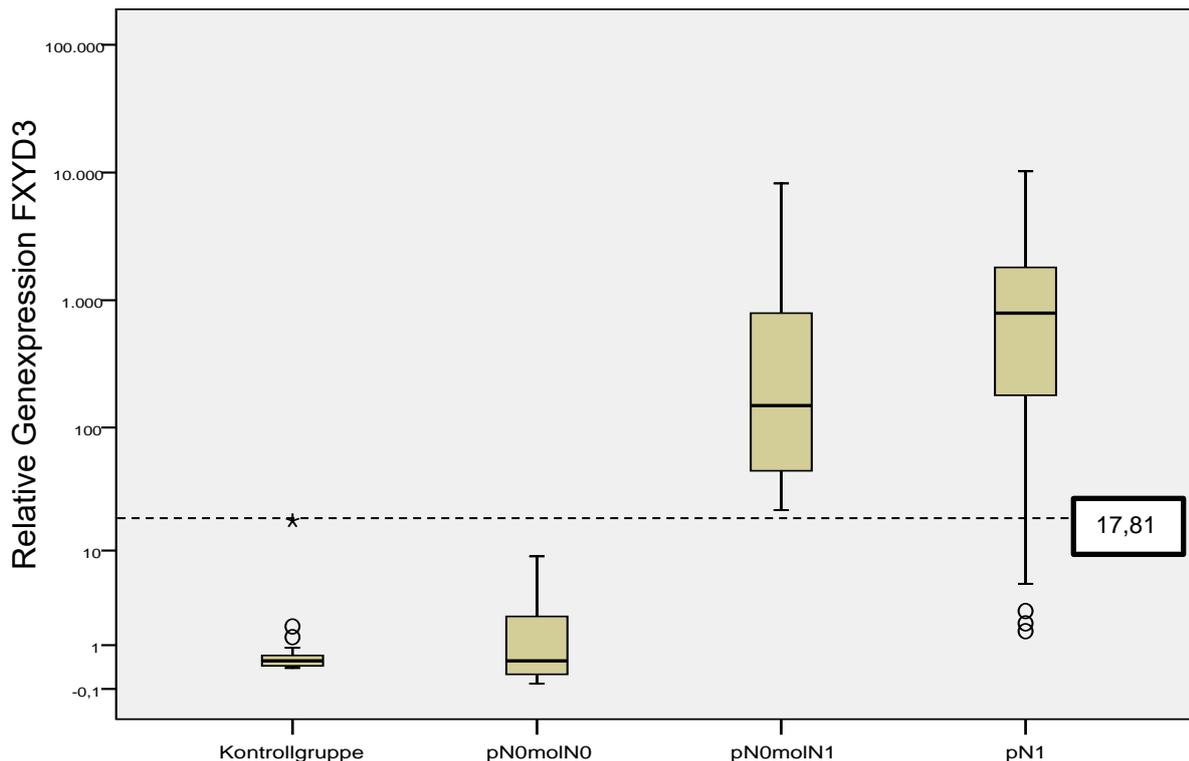


Abbildung 23: Logarithmischer Boxplot der relativen Genexpressionswerte für FXYD3 in 136 Lymphknoten (LN) der Kontrollgruppe sowie in 1453 Lymphknoten der Studiengruppe. In der Kontrollgruppe lag der mediane FXYD3-Genexpressionswert bei 0,23 (Spannweite 0,03 - 17,81). Der Maximalwert der FXYD3-Genexpression in der Kontrollgruppe lag bei 17,81 und wurde als Grenzwert für die FXYD3-Genexpression in der Studiengruppe verwendet. In der Gruppe pN0/moIN0 lag der Median bei 0,23 (Spannweite 0,00 - 12,28). Molekulare Lymphknotenmetastasen (pN0/moIN1) zeigten einen Medianwert von 150 (Spannweite 21,82 – 8230), histopathologisch positive Lymphknoten (pN1/moIN0 und pN1/moIN1) besaßen einen Medianwert von 829 (Spannweite 0,18 – 10231).

Auf Patienten bezogen, hatten 64 (74,4 %) Patienten negative Lymphknoten (pN0/moIN0), 4 (4,7 %) Patienten nur molekular positive Lymphknoten (pN0/moIN1), 18 (20,9 %) Patienten histopathologisch und molekular positive Lymphknoten (pN1/moIN1) und 0 (0 %) Patienten nur histopathologisch positive Lymphknoten (pN1/moIN0).

KRT17

Die histopathologische und molekularbiologische Untersuchung mit KRT17 stufte 1372 (94,4 %) Lymphknoten als negativ (pN0/moIN0), 69 (4,7 %) Lymphknoten als histologisch negativ aber molekular positiv (pN0/moIN1), 40 (2,8 %) Lymphknoten als histologisch und molekular positiv sowie 5 (0,3 %) Lymphknoten als histologisch positiv aber molekular negativ (pN1/moIN0) ein (Abb. 24).

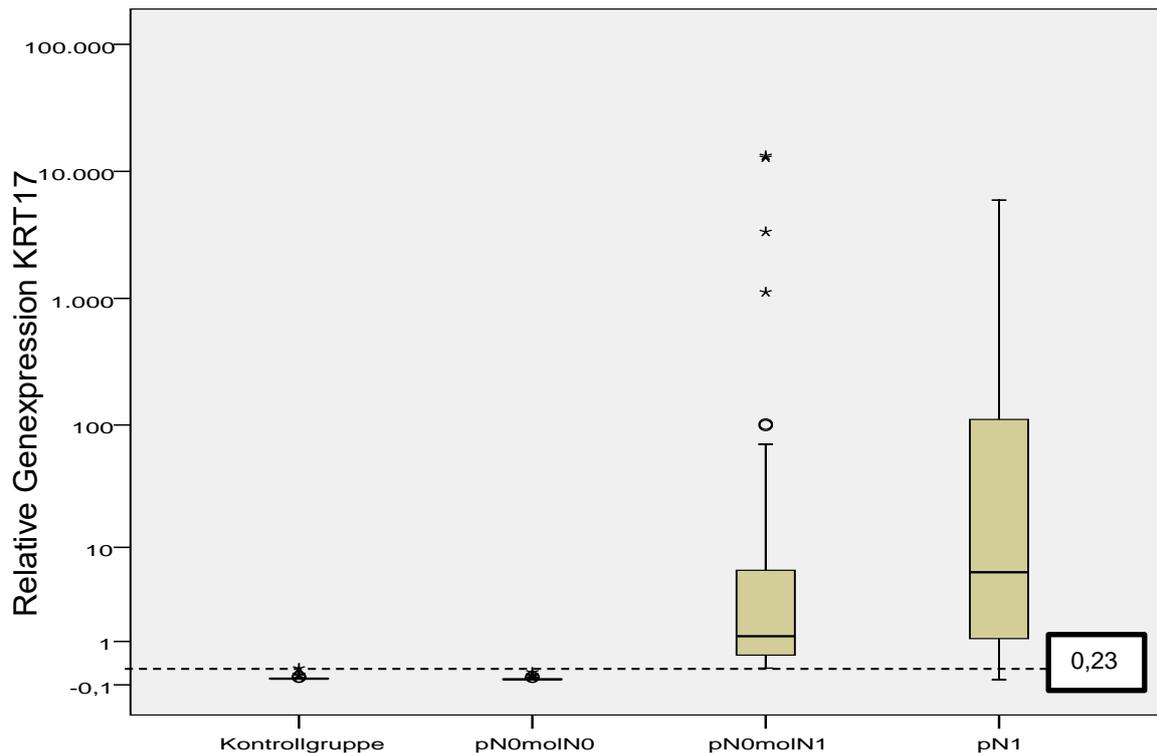


Abbildung 24: Logarithmischer Boxplot der relativen Genexpressionswerte für KRT17 in 136 Lymphknoten der Kontrollgruppe sowie in 1453 Lymphknoten der Studiengruppe. In der Kontrollgruppe betrug der mediane KRT17-Genexpressionswert 0,01 (Spannweite 0,00 – 0,23). Der Maximalwert der KRT17-Genexpression von 0,23 wurde als Grenzwert für die KRT17-Genexpression in der Studiengruppe verwendet. In der Gruppe pN0/molN0 lag der Median bei 0,01 (Spannweite 0,00 – 0,22). Molekulare Lymphknotenmetastasen (pN0/molN1) zeigten einen Medianwert von 1,03 (Spannweite 0,23 - 13287), histopathologisch positive Lymphknoten (pN1/molN0 und pN1/molN1) besaßen einen Medianwert von 6,00 (Spannweite 0,00 – 5963).

Auf Patienten bezogen, hatten 56 (65,1 %) Patienten negative Lymphknoten (pN0/molN0), 12 (14,0 %) Patienten nur molekular positive Lymphknoten (pN0/molN1), 18 (20,9 %) Patienten histopathologisch und molekular positive Lymphknoten (pN1/molN1) und 0 (0 %) Patienten nur histopathologisch positive Lymphknoten (pN1/molN0).

KRT20

Mittels histopathologischer und molekularbiologischer Untersuchung mit KRT20 wurden 1370 (94,3 %) Lymphknoten als negativ eingestuft (pN0/molN0), 38 (2,6 %) Lymphknoten als histologisch negativ aber molekular positiv (pN0/molN1), 28 (1,9 %) Lymphknoten als histologisch und molekular positiv sowie 17 (1,2 %) Lymphknoten als histologisch positiv aber molekular negativ (pN1/molN0) (Abb. 25).

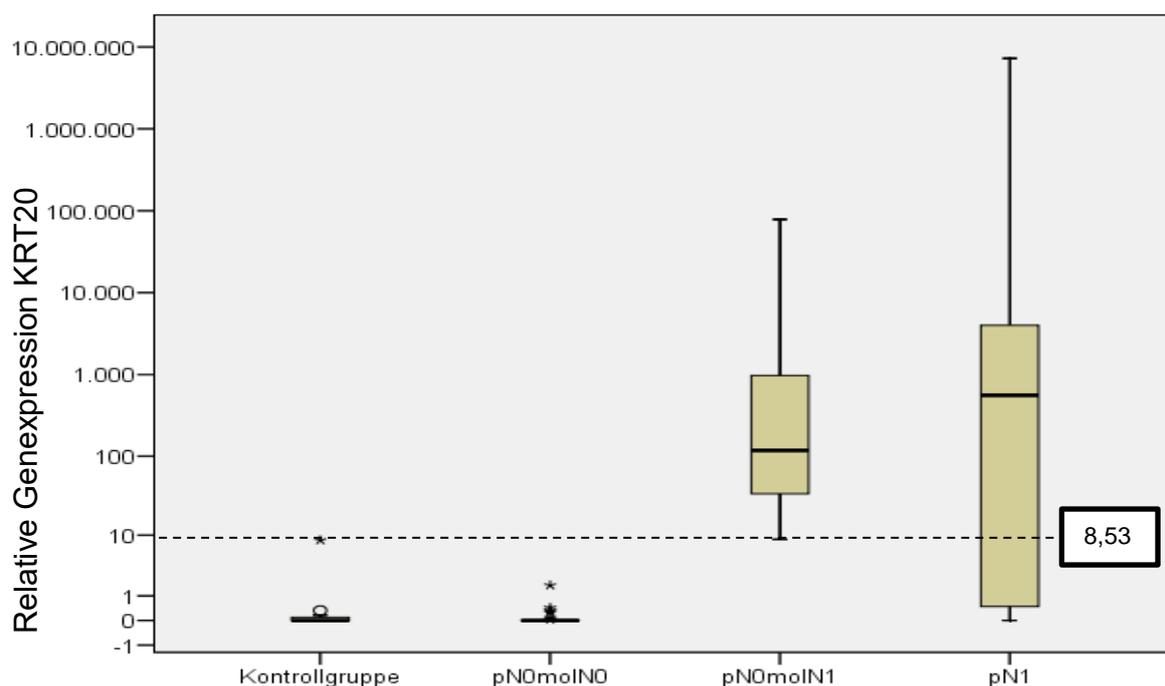


Abbildung 25: Logarithmischer Boxplot der relativen Genexpressionswerte für KRT20 in 136 Lymphknoten der Kontrollgruppe sowie in 1453 Lymphknoten der Studiengruppe. In der Kontrollgruppe lag der mediane KRT20-Genexpressionswert bei 0,00 (Spannweite 0 – 8,53). Der Maximalwert der KRT20-Genexpression von 8,53 wurde als Grenzwert für die KRT20-Genexpression in der Studiengruppe verwendet. In der Gruppe pN0/moIN0 lag der Median bei 0,00 (Spannweite 0,00 – 8,05). Molekulare Lymphknotenmetastasen (pN0/moIN1) zeigten einen Medianwert von 118 (Spannweite 8,74 - 78536), histopathologisch positive Lymphknoten (pN1/moIN0 und pN1/moIN1) besaßen einen Medianwert von 982 (Spannweite 0,00 – 7233777).

Auf Patienten bezogen, hatten 64 (74,4 %) Patienten negative Lymphknoten (pN0/moIN0), 4 (4,7 %) Patienten nur molekular positive Lymphknoten (pN0/moIN1), 16 (18,6 %) Patienten histopathologisch und molekular positive Lymphknoten (pN1/moIN1) und 2 (2,3 %) Patienten nur histopathologisch positive Lymphknoten (pN1/moIN0).

MUC5B

Anhand der histopathologischen und molekularbiologischen Untersuchung mit MUC5B wurden 1373 (94,4 %) Lymphknoten als negativ eingestuft (pN0/moIN0), 35 (2,4 %) Lymphknoten als histologisch negativ aber molekular positiv (pN0/moIN1), 18 (1,2 %) Lymphknoten als histologisch und molekular positiv sowie 27 (1,9 %) Lymphknoten als histologisch positiv aber molekular negativ (pN1/moIN0) (Abb. 26).

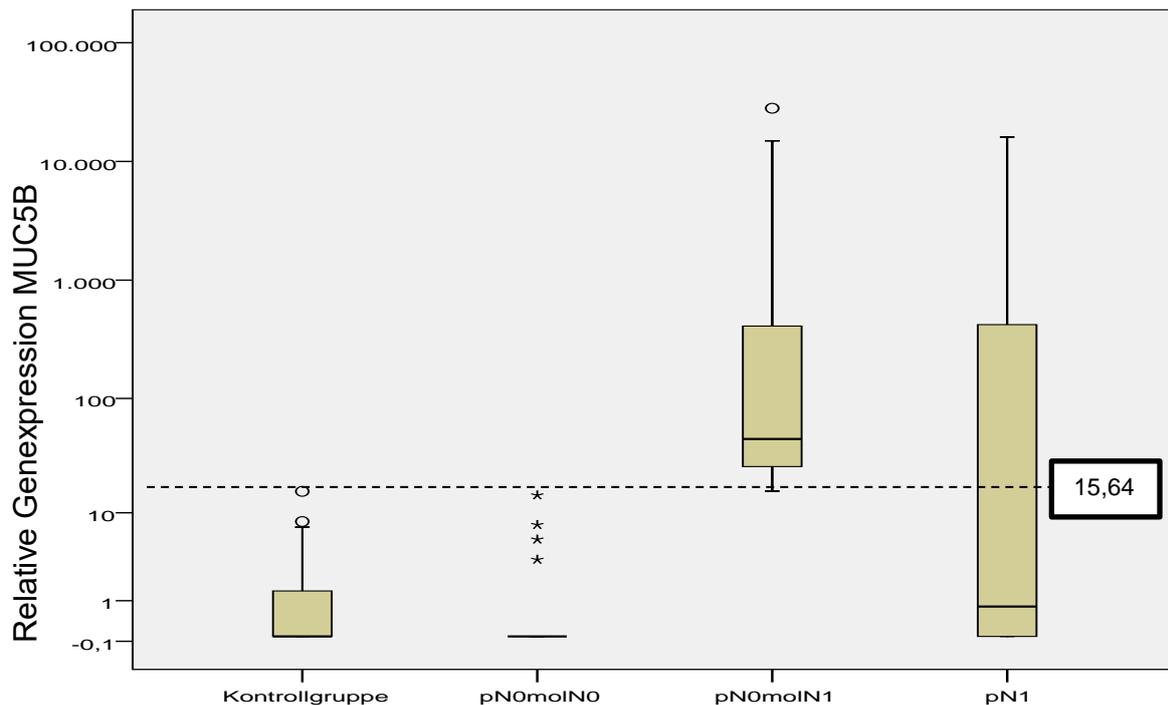


Abbildung 26: Logarithmischer Boxplot der relativen Genexpressionswerte für MUC5B in 136 Lymphknoten der Kontrollgruppe sowie in 1453 Lymphknoten der Studiengruppe. In der Kontrollgruppe lag der mediane MUC5B-Genexpressionswert bei 0,00 (Spannweite 0 – 15,64). Der Maximalwert der MUC5B-Genexpression von 15,64 wurde als Grenzwert für die MUC5B-Genexpression in der Studiengruppe verwendet. In der Gruppe pN0/moIN0 lag der Median bei 0,00 (Spannweite 0,00 – 14,58). Molekulare Lymphknotenmetastasen (pN0/moIN1) zeigten einen Medianwert von 45,02 (Spannweite 15,75 - 28053), histopathologisch positive Lymphknoten (pN1/moIN0 und pN1/moIN1) besaßen einen Medianwert von 0,78 (Spannweite 0,00 - 16058).

Auf Patienten bezogen, hatten 55 (64,0 %) Patienten negative Lymphknoten (pN0/moIN0), 13 (15,1 %) Patienten nur molekular positive Lymphknoten (pN0/moIN1), 10 (11,6 %) Patienten histopathologisch und molekular positive Lymphknoten (pN1/moIN1) und 8 (9,3 %) Patienten nur histopathologisch positive Lymphknoten (pN1/moIN0).

SPINK1

Anhand der histopathologischen und molekularbiologischen Untersuchung mit SPINK1 wurden 1325 (91,2 %) Lymphknoten als negativ eingestuft (pN0/moIN0), 83 (5,7 %) Lymphknoten als histologisch negativ aber molekular positiv (pN0/moIN1), 39 (2,7 %) Lymphknoten als histologisch und molekular positiv sowie 6 (0,4 %) Lymphknoten als histologisch positiv aber molekular negativ (pN1/moIN0) (Abb. 27).

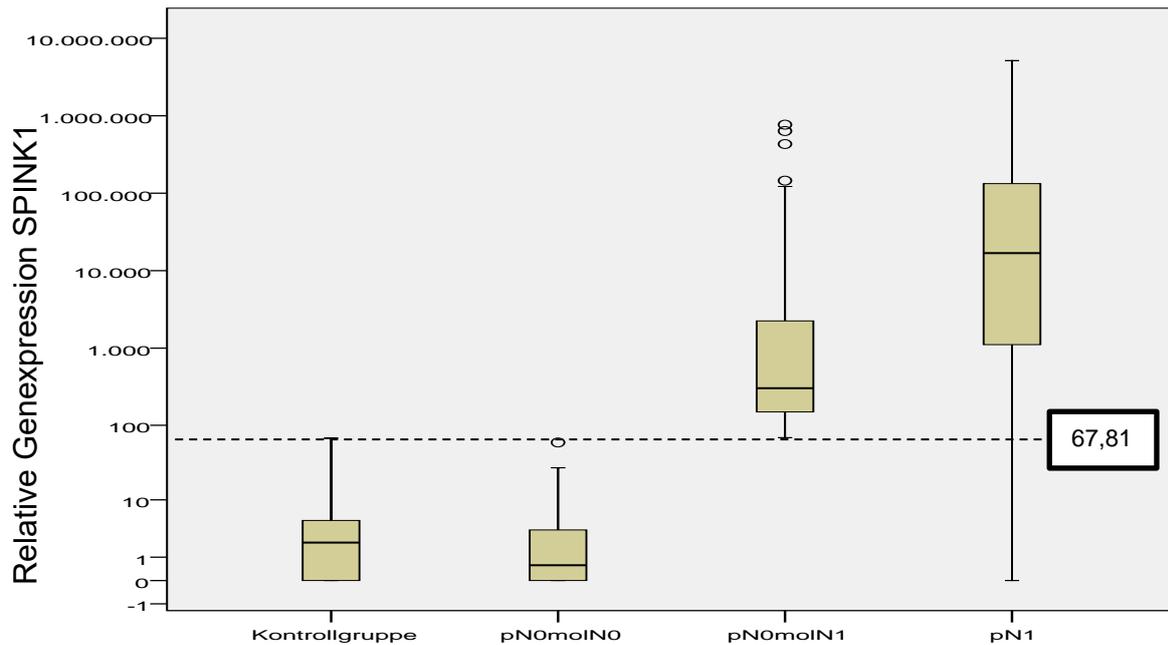


Abbildung 27: Logarithmischer Boxplot der relativen Genexpressionswerte für SPINK1 in 136 Lymphknoten der Kontrollgruppe sowie in 1453 Lymphknoten der Studiengruppe. In der Kontrollgruppe lag der mediane SPINK1-Genexpressionswert bei 0,00 (Spannweite 0 – 67,81). Der Maximalwert der SPINK1-Genexpression von 67,81 wurde als Grenzwert für die SPINK1-Genexpression in der Studiengruppe verwendet. In der Gruppe pN0/moIN0 lag der Median bei 0,00 (Spannweite 0,00 – 66,21). Molekulare Lymphknotenmetastasen (pN0/moIN1) zeigten einen Medianwert von 423 (Spannweite 68,81 - 766913), histopathologisch positive Lymphknoten (pN1/moIN0 und pN1/moIN1) besaßen einen Medianwert von 16853 (Spannweite 0,00 - 5142834).

Auf Patienten bezogen, hatten 57 (66,3 %) Patienten negative Lymphknoten (pN0/moIN0), 11 (12,8 %) Patienten nur molekular positive Lymphknoten (pN0/moIN1), 16 (18,6 %) Patienten histopathologisch und molekular positive Lymphknoten (pN1/moIN1) und 2 (2,3 %) Patienten nur histopathologisch positive Lymphknoten (pN1/moIN0).

UPKII

Anhand der histopathologischen und molekularbiologischen Untersuchung mit UPKII wurden 1302 (89,6 %) Lymphknoten als negativ eingestuft (pN0/moIN0), 106 (7,3 %) Lymphknoten als histologisch negativ aber molekular positiv (pN0/moIN1), 38 (2,76 %) Lymphknoten als histologisch und molekular positiv sowie 7 (0,05 %) Lymphknoten als histologisch positiv aber molekular negativ (pN1/moIN0) (Abb. 28).

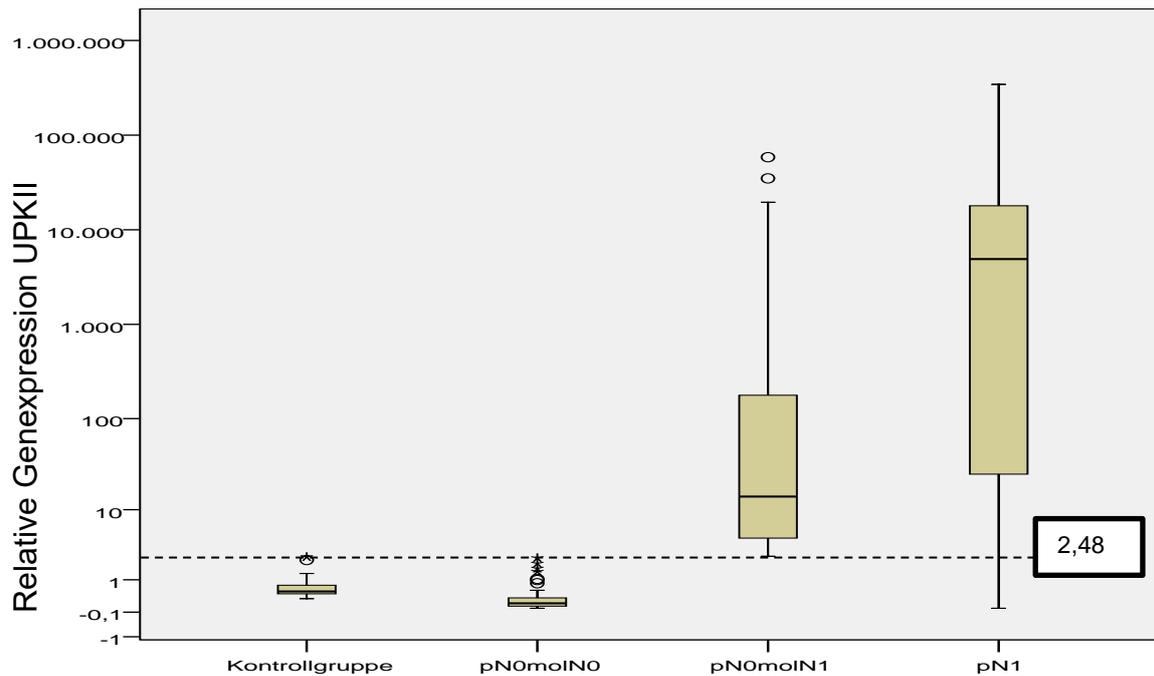


Abbildung 28: Logarithmischer Boxplot der relativen Genexpressionswerte für UPKII in 136 Lymphknoten (LN) der Kontrollgruppe sowie in 1453 Lymphknoten der Studiengruppe. In der Kontrollgruppe lag der mediane UPKII-Genexpressionswert bei 0,20 (Spannweite 0 – 2,48). Der Maximalwert der UPKII-Genexpression von 2,48 wurde als Grenzwert für die UPKII-Genexpression in der Studiengruppe verwendet. In der Gruppe pN0/moI0 lag der Median bei 0,10 (Spannweite 0,00 – 2,40). Molekulare Lymphknotenmetastasen (pN0/moI1) zeigten einen Medianwert von 13,73 (Spannweite 2,54 - 70100), histopathologisch positive Lymphknoten (pN1/moI0 und pN1/moI1) besaßen einen Medianwert von 4893 (Spannweite 0,00 - 343352).

Auf Patienten bezogen, hatten 55 (64,0 %) Patienten negative Lymphknoten (pN0/moI0), 13 (15,1 %) Patienten nur molekular positive Lymphknoten (pN0/moI1), 18 (20,9 %) Patienten histopathologisch und molekular positive Lymphknoten (pN1/moI1) und 0 (0,0 %) Patienten nur histopathologisch positive Lymphknoten (pN1/moI0).

Vergleich der Ergebnisse der Markerexpression in Lymphknoten von Blasen tumorpatienten

Insgesamt wurden 207 von 1453 (14,2 %) Lymphknoten und 48 von 86 (55,8 %) Blasenkarzinompatienten mit mindestens einem der 6 Marker als molekular positiv beurteilt (moI1) (Abb. 29 und Abb. 30). Bei 80 Lymphknoten bzw. 20 Patienten war nur ein Marker positiv. Es konnten 144 der 207 (69,6 %) molekularpositiven Lymphknoten durch UPKII detektiert werden, gefolgt von SPINK1 mit 122 positiven Lymphknoten (58,9 %), KRT17 mit

109 Lymphknoten (52,7 %), FXYD3 mit 75 Lymphknoten (36,2 %), KRT20 mit 66 Lymphknoten (31,9 %) und MUC5B mit 53 Lymphknoten (25,6 %) (Tab. 16).

Insgesamt wurden 48 Patienten mittels der sechs Marker als lymphknotenpositiv evaluiert werden. UPKII evaluierte 64,6 % der Patienten als molIN1 gefolgt von KRT17 (62,5 %), SPINK1 (56,3 %), MUC5B (47,9 %), FXYD3 (45,8 %) und KRT20 (41,7 %) (Tab. 16).

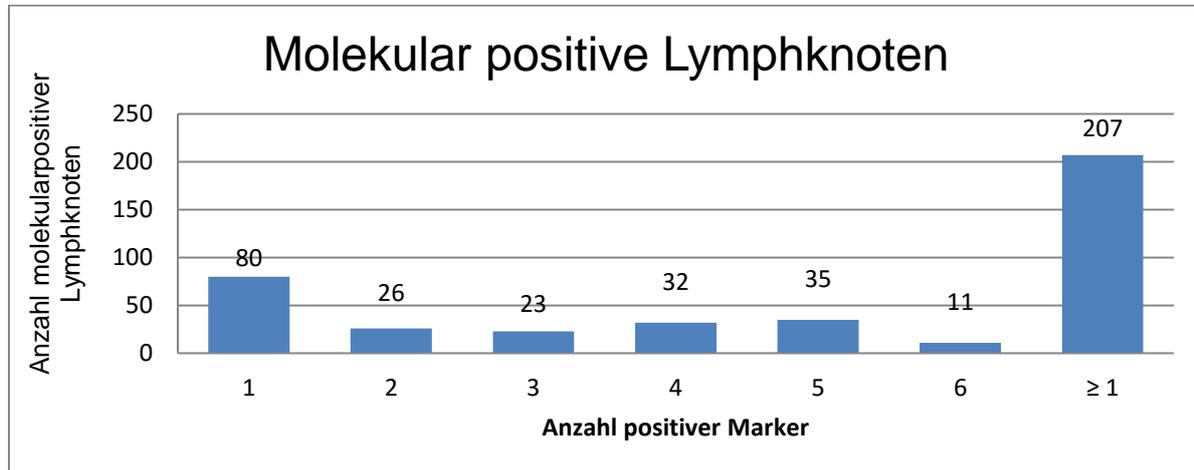


Abbildung 29: Anzahl positiver Marker in allen 207 molekular positiven Lymphknoten. 11 von 207 (5,3 %) Lymphknoten waren für alle sechs Marker positiv. 35 (16,9 %) waren für fünf Marker positiv, 32 (15,5 %) Lymphknoten zeigte eine erhöhte Expression von vier Markern. Drei Marker waren in 23 (11,1 %) Lymphknoten positiv, 26 (12,6 %) Lymphknoten für zwei Marker positiv. 80 (38,6 %) Lymphknoten zeigten lediglich eine erhöhte Expression in einem der sechs Marker.

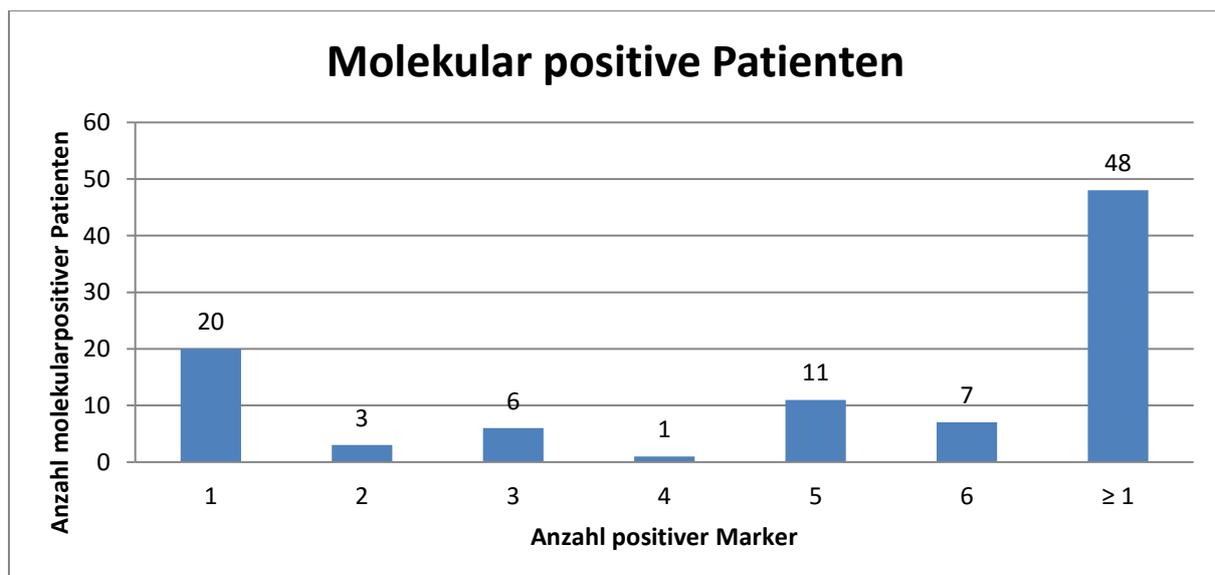


Abbildung 30: Anzahl positiver Marker in 48 molekular positiven Patienten. 7 von 48 (14,6 %) Patienten waren für alle sechs Marker positiv. 11 (22,9 %) Patienten waren für fünf Marker positiv, 1 (2,1 %) Patient zeigte eine erhöhte Expression von vier Markern. Drei Marker waren

in 6 (12,5 %) Patienten positiv, 3 (6,3 %) Patienten für zwei Marker positiv. 20 (41,7 %) Patienten zeigten lediglich eine erhöhte Expression in einem der sechs Marker.

In Tabelle 16 sind die Anzahl an positiven Lymphknoten bzw. Patienten pro Marker zusammengefasst.

Tabelle 16: Anzahl molekularpositiver Lymphknoten und Patienten und prozentualer Anteil an allen 207 molekularpositiven Lymphknoten und 48 molekularpositiven Patienten.

Marker	Molekularpositive LN pro Marker und Anteil an allen 207 molekularpositiven LN (%)	Molekularpositive Patienten pro Marker und Anteil an allen molekularpositiven Patienten (%)
FXYD3	75 (36,2)	22 (45,8)
KRT17	109 (52,7)	30 (62,5)
KRT20	66 (31,9)	20 (41,7)
MUC5B	53 (25,6)	23 (47,9)
SPINK1	122 (58,9)	27 (56,3)
UPKII	144 (69,6)	31 (64,6)
Positiv für mind. einen Marker	207 (100,0)	48 (100,0)

Interessanterweise konnten durch eine Kombination von KRT17, MUC5B, SPINK1 und UPKII alle 48 molekularpositiven Patienten als molekularpositiv evaluiert werden. KRT20 und FXYD3 detektierte dementsprechend keine zusätzlichen Patienten als molekularpositiv. 205 der 207 (99,0 %) molekularpositiven Lymphknoten waren ebenfalls durch eine Kombination dieser vier Marker positiv.

Vergleich der Ergebnisse der Markerexpression in histopathologisch positiven Lymphknoten bzw. Patienten

Bei 45 histopathologisch nachgewiesenen Lymphknotenmetastasen von 18 Patienten, welche auch molekularbiologisch untersucht wurden, lieferte KRT17 die höchste Detektionsrate mit 40 bestätigten Lymphknotenmetastasen (89%), gefolgt von FXYD3 und SPINK1 mit jeweils 39 (87 %) Lymphknoten, UPKII mit 38 (84%) Lymphknoten, KRT20 mit 28 (62%) Lymphknoten und MUC5B mit lediglich 18 (40%) Lymphknoten (Tab. 17). Insgesamt wurden zwei (4,4 %) Lymphknotenmetastasen durch keinen der sechs Marker molekularbiologisch als positiv bewertet. Bei Untersuchung der bestmöglichen Markerkombination zeigte sich die höchste

Detektionsrate bei Kombination der Marker KRT17 und SPINK1 mit 43 (96%) auch molekular als positiv bewerteten Lymphknoten.

Auf die 18 histopathologisch positiven Patienten bezogen, zeigten FXYD3, KRT17 und UPKII eine Detektionsrate von 100%. 16 von 18 (88,9 %) histopathologisch positiven Patienten konnten mittels KRT20 und SPINK1 detektiert werden. Die geringste Detektionsrate zeigte MUC5B mit nur zehn von 18 (55,6 %) Patienten (Tab. 17).

Tabelle 17: Ergebnis der molekularbiologischen Analyse der histopathologisch positiven Lymphknoten und Patienten (pN1).

	Anzahl molekularpositiver Lymphknoten in pN1 befundeten Lymphknoten (%)	Anzahl molekularpositiver Patienten in pN1 befundeten Patienten (%)
FXYD3	39/45 (87)	18/18 (100)
KRT17	40/45 (89)	18/18 (100)
KRT20	28/45 (62)	16/18 (89)
MUC5B	18/45 (40)	10/18 (56)
SPINK1	39/45 (87)	16/18 (89)
UPKII	38/45 (84)	18/18 (100)
Kombination aller Marker	43/45 (96)	18/18 (100)

Zusammenfassung der Ergebnisse bei molekularer Lymphknotenanalyse mit FXYD3, KRT17, KRT20, MUC5B, SPINK1 und UPKII sowie histopathologischer Lymphknotenauswertung von Blasentumorpatienten

Mit einer Kombination aller sechs Marker ergibt sich folgende Verteilung in allen 1453 Lymphknoten der 86 Blasentumorpatienten (Abb. 31). Insgesamt waren 207 Lymphknoten und 48 Patienten positiv für mindestens einen der sechs Marker. Hiervon zeigten 164 Lymphknoten bzw. 30 Patienten nur in der molekularbiologischen Lymphknotenuntersuchung ein positives Ergebnis (pN0/molN1) und 43 (3,0%) Lymphknoten von 18 Patienten wurden sowohl histopathologisch als auch molekularbiologisch als positiv bewertet (pN1/molN1). Nur 2 Lymphknoten (0,1%) wurden als histopathologisch positiv aber molekular negativ gewertet. Diese lagen bei Patienten vor, welche aufgrund zusätzlich. positiver Lymphknoten als pN1/molN1 eingestuft wurden. Insgesamt lag bei 1244 (85,6 %) Lymphknoten bzw. 38 (44,2 %) Patienten mit beiden Untersuchungsmethoden kein Hinweis auf eine Lymphknotenmetastasierung vor (pN0/molN0).

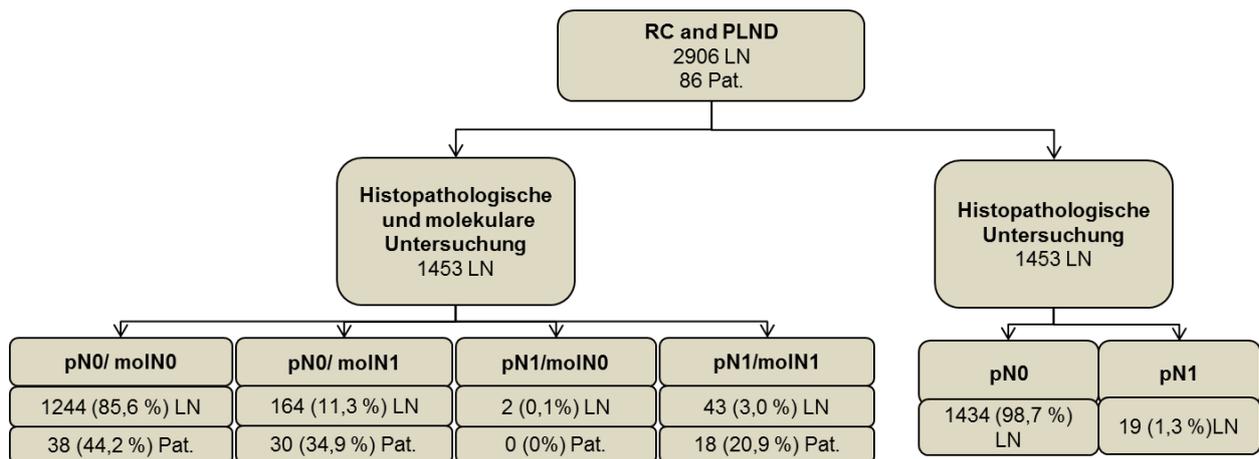


Abbildung 31: Ergebnisse der Untersuchung der 2906 Lymphknoten von 86 Blasentumorpatienten nach radikaler Zystektomie.

Bei Betrachtung der relativen Verteilung der Tumorstadien, zeigte sich eine prozentuale Zunahme von Patienten mit pT4-Stadium in der Gruppe mit negativen Lymphknoten (pN0/moIN0) mit 5,3% zur Patientengruppe mit nur molekular positiven Lymphknoten (pN0/moIN1) mit 10,0 % zur Patientengruppe mit sowohl histopathologisch als auch molekular positiven Lymphknoten (pN1/moIN1) mit 22,2 % (Tab. 18).

Tabelle 18: Assoziation zwischen Lymphknotenstatus in den Gruppen pN0/moIN0, pN0/moIN1 und pN1/moIN1 und histopathologischem Tumorstadium.

	pN0/moIN0	pN0/moIN1	pN1/moIN1
Anzahl	38	30	18
Patienten			
pTa, pTis, pT1 (%)	11 (28,9)	9 (30,0)	4 (22,2)
T2 (%)	14 (36,8)	8 (26,7)	1 (5,6)
T3 (%)	11 (28,9)	10 (33,3)	9 (50,0)
T4 (%)	2 (5,3)	3 (10)	4 (22,2)

5.6.3 Topographie der Lymphknotenmetastasen im ausgedehnten Lymphadenektomiekollektiv

Bei der Topographie von Lymphknotenmetastasen beschränkten wir uns auf die Gruppe von 43 Patienten, welche eine erweiterte Lymphadenektomie erhielten. Ausgewertet wurden 882 Lymphknoten, welche mit beiden Methoden untersucht wurden.

5.6.3.1 Topographie histopathologisch positiver Lymphknoten (pN1)

31 Lymphknoten von 12 Patienten wurden durch den Pathologen als positiv beurteilt. Dabei ergab sich folgende anatomische Verteilung der Lymphknotenmetastasen: 17 von 31 (54,8 %) histopathologisch positiven Lymphknoten befanden sich im eingeschränkten Lymphadenektomiefeld. Die restlichen 14 (45,2 %) Metastasen waren ausschließlich in Arealen des extendierten Feldes vorzufinden. Zwei der 12 (16,7 %) Patienten besaßen ausschließlich Metastasen in Lymphknoten außerhalb des eingeschränkten Lymphadenektomiefelds (Abb. 32).

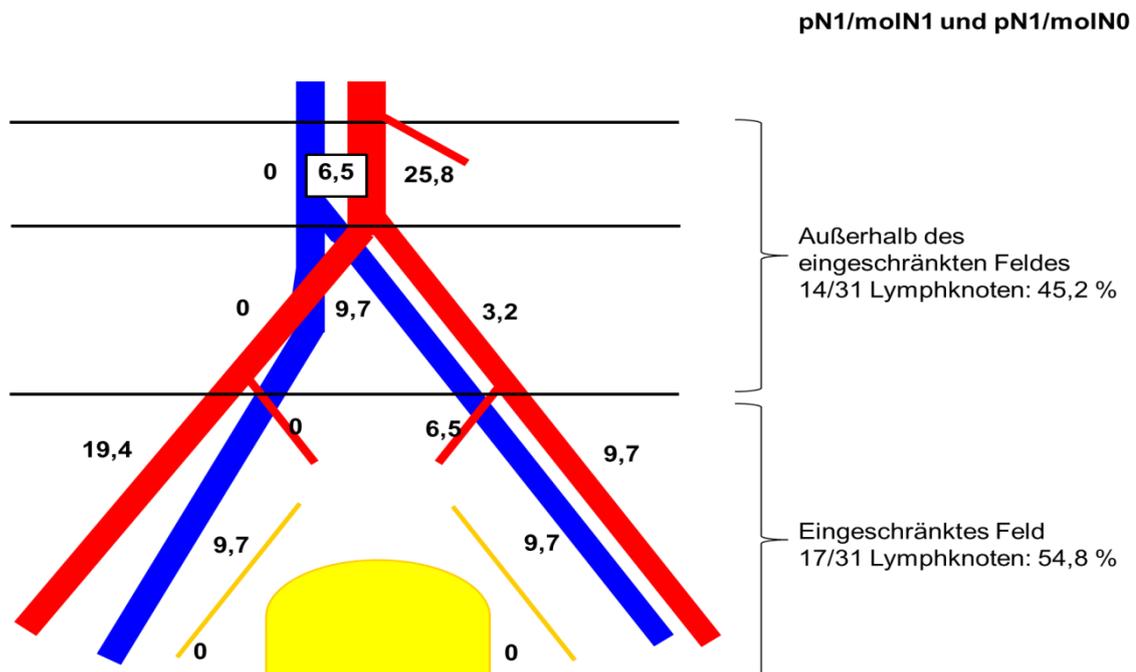


Abbildung 32: Topographie der 31 histopathologisch positiven Lymphknoten (pN1/moIN1 und pN1/moIN0) (%) im ausgedehnten Lymphadenektomiefeld.

5.6.3.2 Topographie molekularbiologisch positiver Lymphknoten (moIN1)

Insgesamt waren 141 der 882 Lymphknoten für mindestens einen der sechs Marker positiv. Der Anteil molekularpositiver Lymphknoten im eingeschränkten Lymphadenektomiefeld lag bei 45 - 71 %. Zwischen 29 und 55 % der molekular detektierten Metastasen waren außerhalb des eingeschränkten Lymphadenektomiefelds gelegen (Abb. 33 – Abb. 39, Tab. 19)

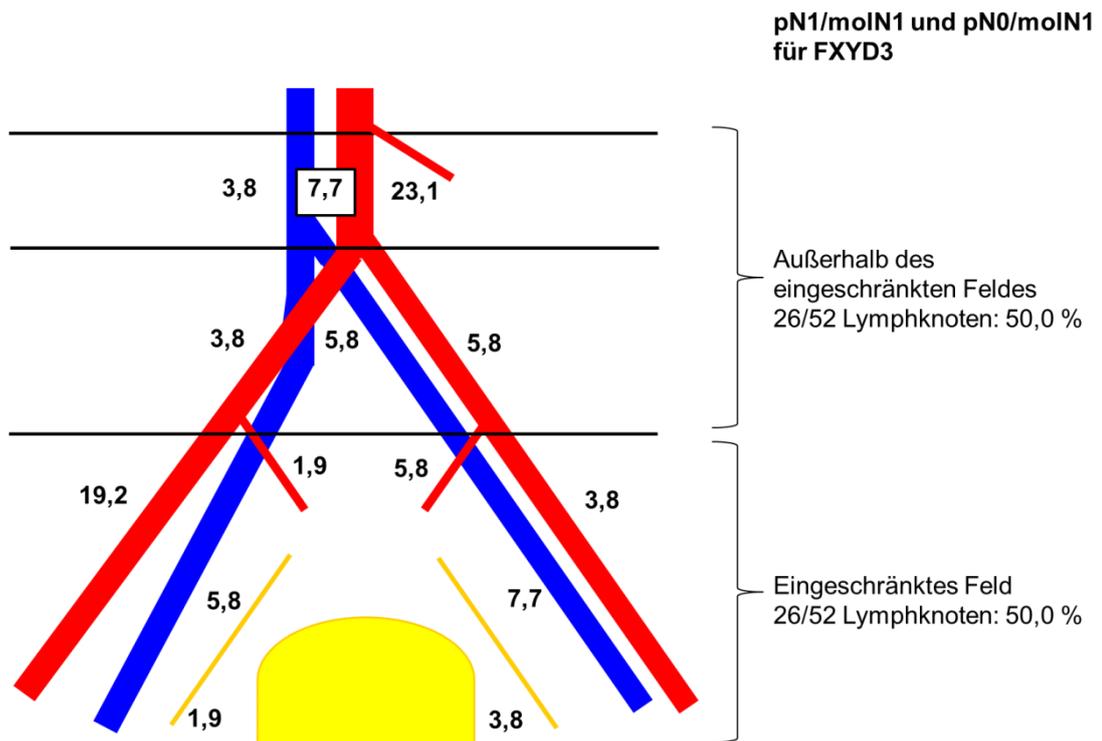


Abbildung 33: Topographie der 52 FXYD3-positiven Lymphknoten (pN1/molN1 und pN0/molN1) (%) im ausgedehnten Lymphadenektomiefeld.

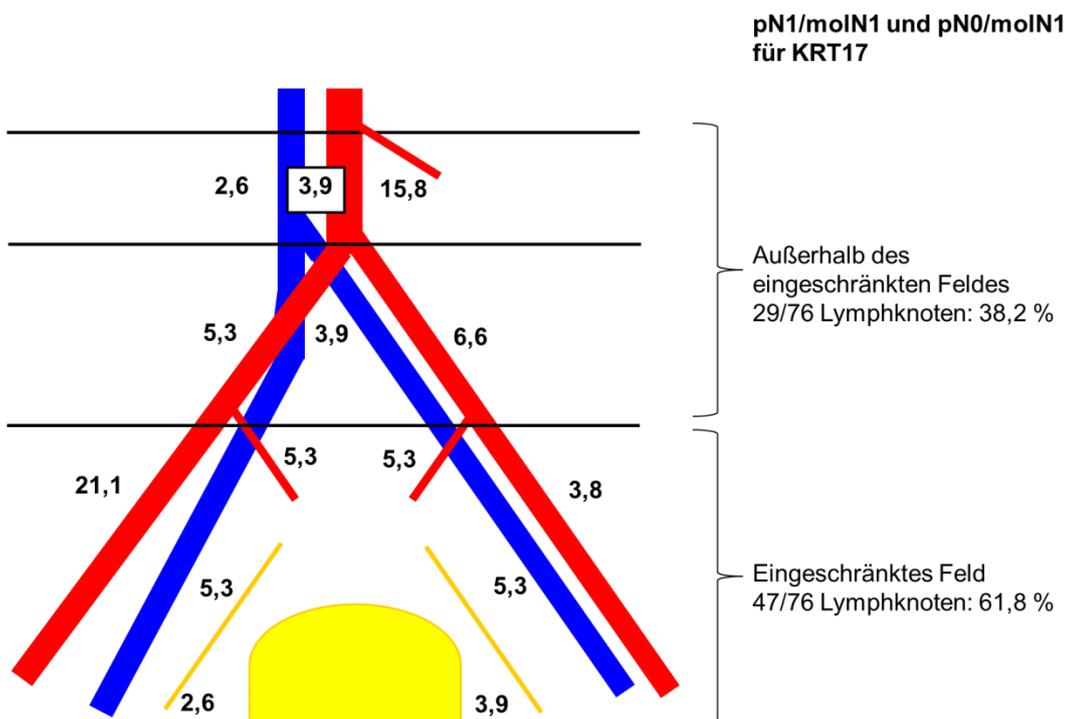


Abbildung 34: Topographie der 76 KRT17-positiven Lymphknoten (pN1/molN1 und pN0/molN1) (%) im ausgedehnten Lymphadenektomiefeld.

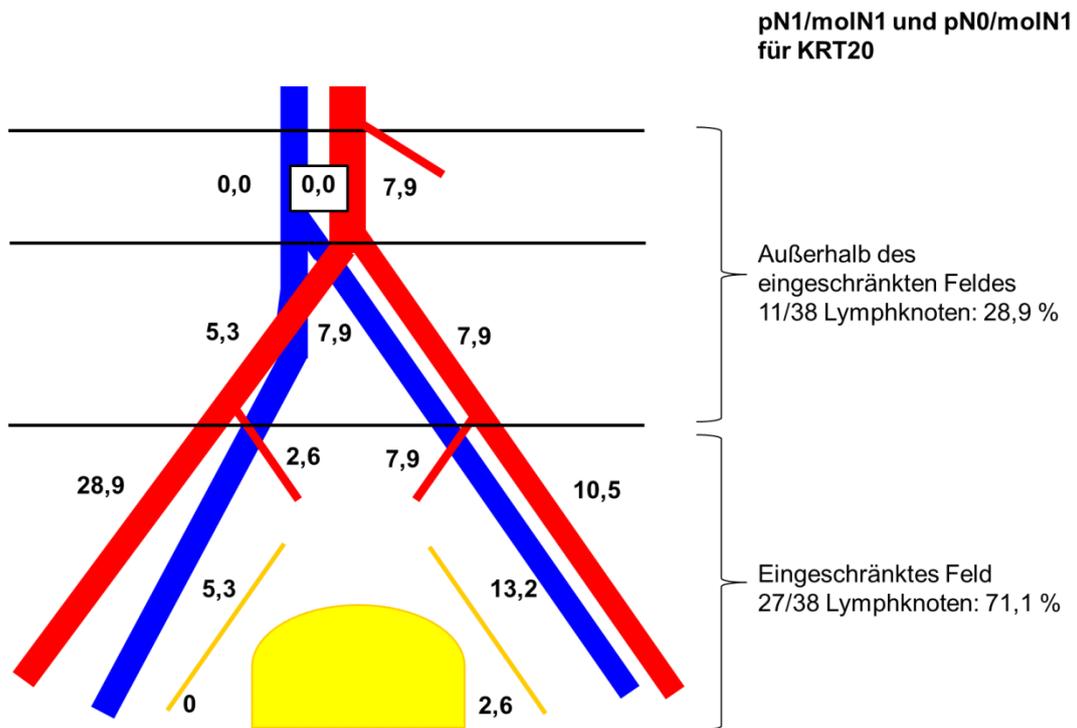


Abbildung 35: Topographie der 38 KRT20-positiven Lymphknoten (pN1/moIN1 und pN0/moIN1) (%) im ausgedehnten Lymphadenektomiefeld.

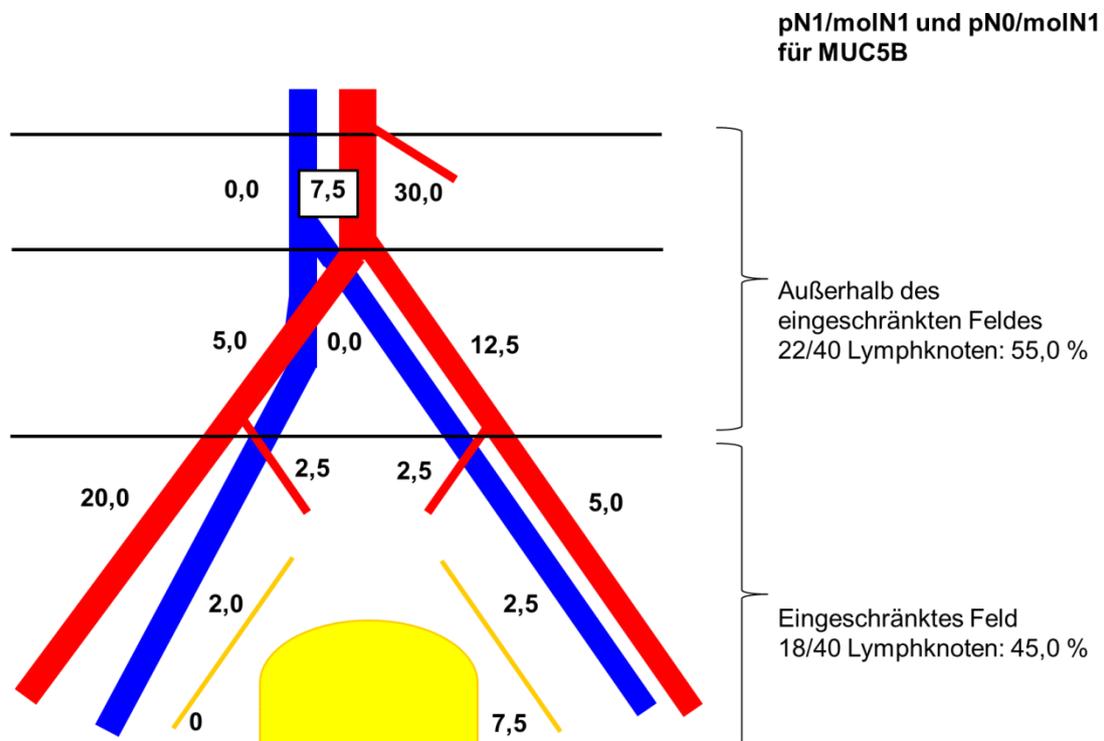


Abbildung 36: Topographie der 40 MUC5B-positiven Lymphknoten (pN1/moIN1 und pN0/moIN1) (%) im ausgedehnten Lymphadenektomiefeld.

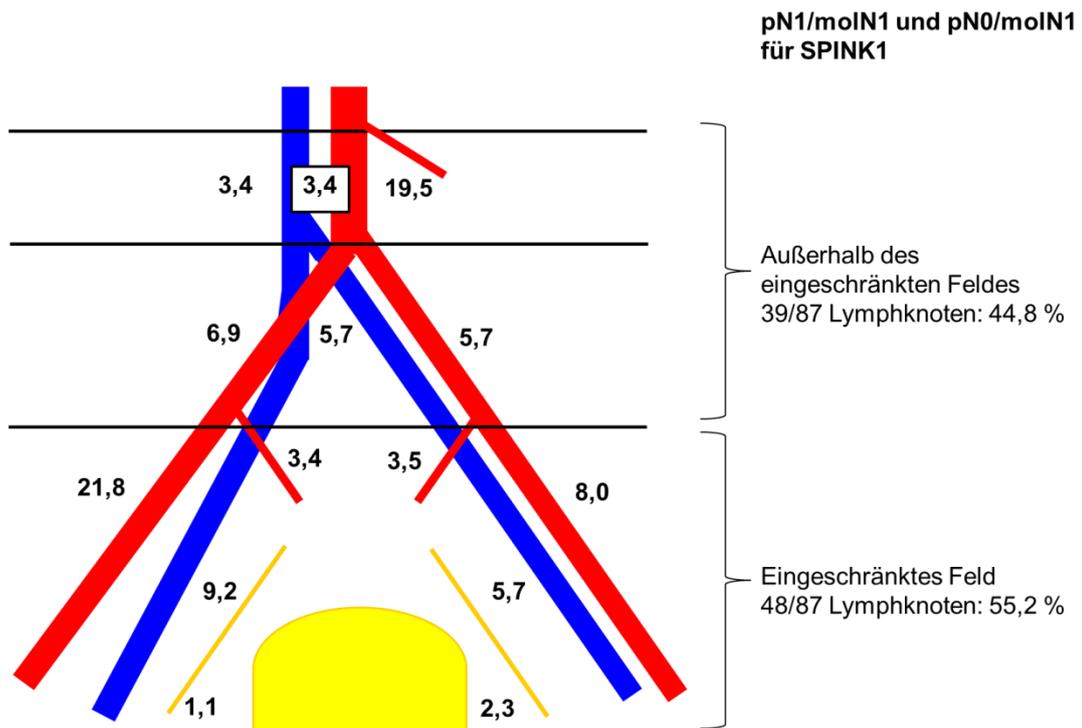


Abbildung 37: Topographie der 87 SPINK1-positiven Lymphknoten (pN1/molN1 und pN0/molN1) (%) im ausgedehnten Lymphadenektomiefeld.

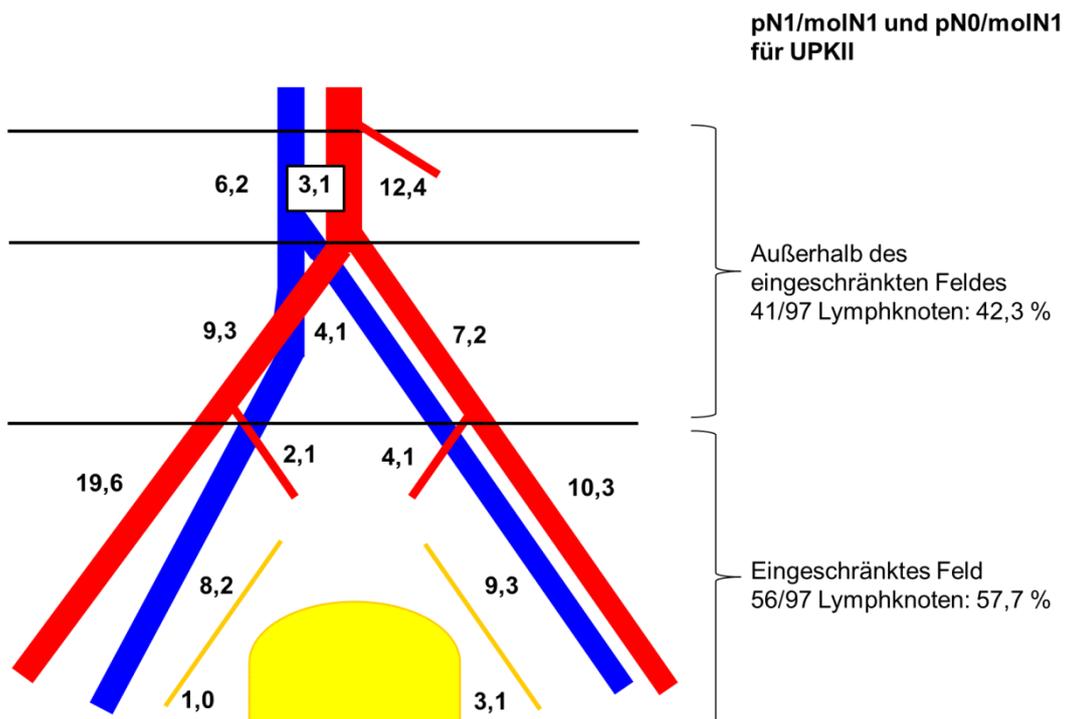


Abbildung 38: Topographie der 97 UPKII-positiven Lymphknoten (pN1/molN1 und pN0/molN1) (%) im ausgedehnten Lymphadenektomiefeld.

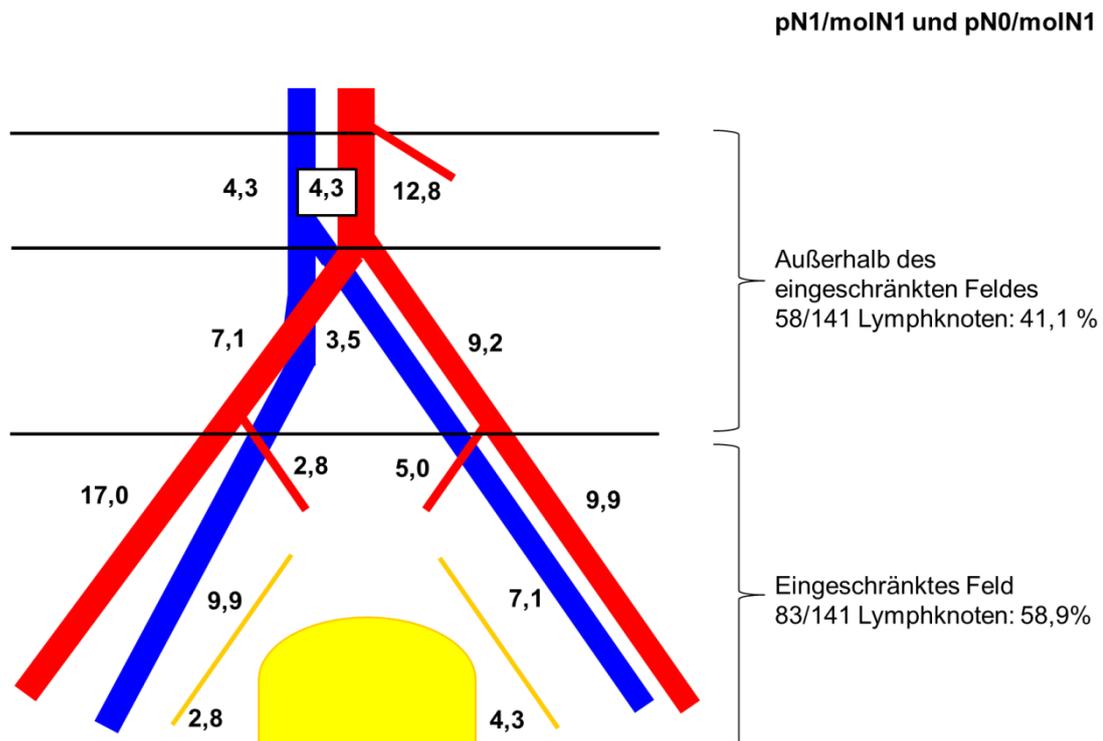


Abbildung 39: Topographie der 141 molekular positiven Lymphknoten (pN1/moIN1 und pN0/moIN1) (%) im ausgedehnten Lymphadenektomiefeld.

5.6.3.3 Zusammenfassung der Topographie der histopathologisch und molekular positiven Lymphknoten

Mittels konventioneller Histopathologie wurden 31 Lymphknoten als metastasenpositiv beurteilt, wovon 55 % im eingeschränkten und 45 % außerhalb des eingeschränkten Feldes lokalisiert waren. Die molekularbiologische Untersuchung konnte 141 Lymphknoten als metastasenpositiv detektieren. 59 % lagen im eingeschränkten Feld, die restlichen 41 % waren ausschließlich in Arealen des ausgedehnten Feldes lokalisiert (Tab. 19).

Tabelle 19: Lymphknotenmetastasen entsprechend ihrer Lage und Art der Metastasen im Kollektiv der Patienten mit ausgedehnter Lymphadenektomie .

Art der Metastasen	Lymphknoten im eingeschränkten Feld (%)	Lymphknoten außerhalb des eingeschränkten Feldes (%)
Histopathologische Lymphknotenmetastasen (pN1/molN1 und pN1/molN0)	17/31 (55)	14/31 (45)
Molekularbiologische Metastasen (pN1/molN1 und pN0/molN1)	83/141 (59)	58/141 (41)
FXYD3 positive Metastasen	26/52 (50)	26/52 (50)
KRT17 positive Metastasen	47/76 (62)	29/76 (38)
KRT20 positive Metastasen	27/38 (71)	11/38 (29)
MUC5B positive Metastasen	18/40 (45)	22/40 (55)
SPINK1 positive Metastasen	48/87 (55)	39/87 (45)
UPKII positive Metastasen	56/97 (58)	41/97 (42)

5.6.3.4 Topographie von Lymphknotenmetastasen entsprechend der Lage und Art der Metastasen auf Patientenebene

Bei Patienten-basierter Auswertung, hatten drei von 12 (25 %) Patienten mit histopathologisch positiven Lymphknoten, Lymphknotenmetastasen auch außerhalb des eingeschränkten Feldes (Tab. 20 – Tab. 26). Bemerkenswerterweise hatten zwei (17 %) Patienten Lymphknotenmetastasen nur außerhalb des eingeschränkten Feldes. Hätten diese Patienten eine eingeschränkte Lymphadenektomie erhalten wären sie fälschlicherweise als lymphknoten-negativ eingestuft worden.

Auswertung für jeden einzelnen Marker

Der prozentuale Anteil der Patienten, die ausschließlich histopathologische und/ oder molekulare Metastasen außerhalb des eingeschränkten Lymphadenektomiefeldes besaßen, schwankte zwischen 13 und 26 %. Hätten diese Patienten eine eingeschränkte Lymphadenektomie erhalten wären diese ebenfalls als lymphknoten-negativ eingestuft worden.

Tabelle 20: Zahl der Patienten mit Lymphknotenmetastasen entsprechend ihrer Lage und Art der Metastasen im Kollektiv der Patienten mit ausgedehnter Lymphadenektomie mittels FXYD3.

Art der Metastasen	Lage	
	Eingeschränkte Lymphadenektomie, Zahl der Patienten (%)	Außerhalb des eingeschränkten Feldes, Zahl der Patienten (%)
Histopathologische Lymphknotenmetastasen (pN1/moIN1 und pN1/moIN0)	10/12 (83)	3/12 (25)
Ausschließlich in dieser Lage	9/12 (75)	2/12 (17)
FXYD3 positive Lymphknotenmikrometastasen und histopathologisch negative Lymphknoten (pN0/moIN1)	2/2 (100)	0/2 (0)
Ausschließlich in dieser Lage	2/2 (100)	0/2 (0)
Histopathologische Lymphknotenmetastasen und/ oder FXYD3 positive Mikrometastasen (pN1/moIN1 und pN1/moIN0 und pN0/moIN1)	12/14 (86)	5/14 (36)
Ausschließlich in dieser Lage	9/14 (64)	2/14 (14)

Tabelle 21: Zahl der Patienten mit Lymphknotenmetastasen entsprechend ihrer Lage und Art der Metastasen im Kollektiv der Patienten mit ausgedehnter Lymphadenektomie mittels KRT17.

Art der Metastasen	Lage	
	Eingeschränkte Lymphadenektomie, Zahl der Patienten (%)	Außerhalb des eingeschränkten Feldes, Zahl der Patienten (%)
Histopathologische Lymphknotenmetastasen (pN1/moIN1 und pN1/moIN0)	10/12 (83)	3/12 (25)
Ausschließlich in dieser Lage	9/12 (75)	2/12 (17)
KRT17 positive Lymphknotenmikrometastasen und histopathologisch negative Lymphknoten (pN0/moIN1)	6/8 (75)	3/8 (37,5)
Ausschließlich in dieser Lage	5/8 (62,5)	2/4 (25)
Histopathologische Lymphknotenmetastasen und/ oder KRT17 positive Mikrometastasen (pN1/moIN1 und pN1/moIN0 und pN0/moIN1)	16/20 (80)	9/20 (45)
Ausschließlich in dieser Lage	11/20 (55)	4/20 (20)

Tabelle 22: Zahl der Patienten mit Lymphknotenmetastasen entsprechend ihrer Lage und Art der Metastasen im Kollektiv der Patienten mit ausgedehnter Lymphadenektomie mittels KRT20.

Art der Metastasen	Lage	
	Eingeschränkte Lymphadenektomie, Zahl der Patienten (%)	Außerhalb des eingeschränkten Feldes, Zahl der Patienten (%)
Histopathologische Lymphknotenmetastasen (pN1/moIN1 und pN1/moIN0)	10/12 (83)	3/12 (25)
Ausschließlich in dieser Lage	9/12 (75)	2/12 (17)
KRT20 positive Lymphknotenmikrometastasen und histopathologisch negative Lymphknoten (pN0/moIN1)	3/3 (100)	0/3 (0)
Ausschließlich in dieser Lage	3/3 (100)	0/3 (0)
Histopathologische Lymphknotenmetastasen und/ oder KRT20 positive Mikrometastasen (pN1/moIN1 und pN1/moIN0 und pN0/moIN1)	13/15 (87)	3/15 (20)
Ausschließlich in dieser Lage	12/15 (80)	2/15 (13)

Tabelle 23: Zahl der Patienten mit Lymphknotenmetastasen entsprechend ihrer Lage und Art der Metastasen im Kollektiv der Patienten mit ausgedehnter Lymphadenektomie mittels MUC5B.

Art der Metastasen	Lage	
	Eingeschränkte Lymphadenektomie, Zahl der Patienten (%)	Außerhalb des eingeschränkten Feldes, Zahl der Patienten (%)
Histopathologische Lymphknotenmetastasen (pN1/moIN1 und pN1/moIN0)	10/12 (83)	3/12 (25)
Ausschließlich in dieser Lage	9/12 (75)	2/12 (17)
MUC5B positive Lymphknotenmikrometastasen und histopathologisch negative Lymphknoten (pN0/moIN1)	5/7 (71)	3/7 (43)
Ausschließlich in dieser Lage	4/7 ((57)	2/7 (29)
Histopathologische Lymphknotenmetastasen und/ oder MUC5B positive Mikrometastasen (pN1/moIN1 und pN1/moIN0 und pN0/moIN1)	15/19 (79)	6/19 (32)
Ausschließlich in dieser Lage	13/19 (68)	4/19 (21)

Tabelle 24: Zahl der Patienten mit Lymphknotenmetastasen entsprechend ihrer Lage und Art der Metastasen im Kollektiv der Patienten mit ausgedehnter Lymphadenektomie mittels SPINK1.

Art der Metastasen	Lage	
	Eingeschränkte Lymphadenektomie, Zahl der Patienten (%)	Außerhalb des eingeschränkten Feldes, Zahl der Patienten (%)
Histopathologische Lymphknotenmetastasen (pN1/moIN1 und pN1/moIN0)	10/12 (83)	3/12 (25)
Ausschließlich in dieser Lage	9/12 (75)	2/12 (17)
SPINK1 positive Lymphknotenmikrometastasen und histopathologisch negative Lymphknoten (pN0/moIN1)	4/7 (57)	4/7 (57)
Ausschließlich in dieser Lage	3/7 (43)	3/7 (43)
Histopathologische Lymphknotenmetastasen und/ oder SPINK1 positive Mikrometastasen (pN1/moIN1 und pN1/moIN0 und pN0/moIN1)	14/19 (74)	7/19 (37)
Ausschließlich in dieser Lage	12/19 (63)	5/19 (26)

Tabelle 25: Zahl der Patienten mit Lymphknotenmetastasen entsprechend ihrer Lage und Art der Metastasen im Kollektiv der Patienten mit ausgedehnter Lymphadenektomie mittels UPKII.

Art der Metastasen	Lage	
	Eingeschränkte Lymphadenektomie, Zahl der Patienten (%)	Außerhalb des eingeschränkten Feldes, Zahl der Patienten (%)
Histopathologische Lymphknotenmetastasen (pN1/moIN1 und pN1/moIN0)	10/12 (83)	3/12 (25)
Ausschließlich in dieser Lage	9/12 (75)	2/12 (17)
UPKII positive Lymphknotenmikrometastasen und histopathologisch negative Lymphknoten (pN0/moIN1)	5/7 (71)	3/7 (43)
Ausschließlich in dieser Lage	4/7 (57)	2/7 (29)
Histopathologische Lymphknotenmetastasen und/ oder UPKII positive Mikrometastasen (pN1/moIN1 und pN1/moIN0 und pN0/moIN1)	15/19 (79)	6/19 (32)
Ausschließlich in dieser Lage	13/19 (68)	4/19 (21)

Auswertung für das Marker-Panel

Insgesamt konnten 31 von 43 (72,1 %) der Patienten entweder durch die Histopathologie oder Molekularbiologie als lymphknotenpositiv beurteilt werden.

Bei 19 der 31 (61,3 %) lymphknotenpositiven Patienten konnten nur im eingeschränkten Lymphadenektomiefeld Lymphknotenmetastasen detektiert werden. Sieben der 31 (22,6 %) lymphknotenpositiven Patienten besaßen ausschließlich außerhalb des eingeschränkten Lymphadenektomiefelds Lymphknotenmetastasen. Hätten diese Patienten eine eingeschränkte Lymphadenektomie erhalten wären sie fälschlicherweise als Lymphknoten-negativ eingestuft worden (Tab. 26).

Tabelle 26: Zahl der Patienten mit Lymphknotenmetastasen entsprechend ihrer Lage und Art der Metastasen im Kollektiv der Patienten mit ausgedehnter Lymphadenektomie.

Art der Metastasen	Lage	
	Eingeschränkte Lymphadenektomie, Zahl der Patienten (%)	Außerhalb des eingeschränkten Feldes, Zahl der Patienten (%)
Histopathologische Lymphknotenmetastasen (pN1/moIN1 und pN1/moIN0)	10/12 (83)	3/12 (25)
Ausschließlich in dieser Lage	9/12 (75)	2/12 (17)
molekular positive Lymphknotenmikrometastasen und histopathologisch negative Lymphknoten (pN0/moIN1)	14/19 (74)	9/19 (47)
Ausschließlich in dieser Lage	10/19 (53)	5/19 (26)
Histopathologische Lymphknotenmetastasen und/ oder molekulare positive Mikrometastasen (pN1/moIN1 und pN1/moIN0 und pN0/moIN1)	24/31 (77)	12/31 (39)
Ausschließlich in dieser Lage	19/31 (61)	7/31 (23)

6 DISKUSSION

6.1 Neue prognostische Marker zum Nachweis disseminierter Tumorzellen in Lymphknoten von Harnblasenkarzinompatienten

Etwa die Hälfte aller Harnblasenkarzinompatienten erliegt innerhalb von fünf Jahren nach Diagnosestellung trotz radikaler Zystektomie und Lymphadenektomie in kurativer Intention ihrem Krebsleiden. Der Grund liegt in wahrscheinlich zum Diagnosezeitpunkt bereits vorhandenen okkulten Metastasen. Es wird geschätzt, dass etwa 50 % der Patienten bereits zum Operationszeitpunkt okkulte Lymphknotenmetastasen besitzt (Stein & Skinner, 2006), welche jedoch durch die herkömmlichen bildgebenden Verfahren als auch durch die routinemäßige Untersuchung der Lymphknoten durch die konventionelle Histopathologie nicht detektierbar sind. Jene Patienten werden dann fälschlicherweise als lymphknotenmetastasenfrei evaluiert und werden daher weder einer adjuvanten noch neoadjuvanten Chemotherapie zugeführt (Liefers et al., 1998). Durch die Detektion disseminierter Tumorzellen in Lymphknoten von Blasen tumorpatienten mittels der Genexpression verschiedener epithelialer Marker in der qRT-PCR könnten eventuell zusätzliche lymphknotenpositive Patienten identifiziert werden. Dies könnte ein zusätzlicher Indikator für eine adjuvante Chemotherapie werden.

6.2 Genexpression der Marker in Blasenkarzinomzelllinien

Bisher liegen keine systematischen Untersuchungen bezüglich der Genexpression verschiedener potenzieller Marker zum Nachweis disseminierter Tumorzellen in Lymphknoten von Urothelkarzinompatienten an Blasenkarzinomzelllinien unterschiedlichen Differenzierungsgrades mittels qRT-PCR vor. Daher wurden 17 Blasen tumorzelllinien (G1 – G3) sowie PBMCs von drei gesunden freiwilligen Spendern auf die Genexpression der sechs in dieser Studie verwendeten Marker (FXVD3, KRT17, KRT20, MUC5B, SPINK1, UPKII) mittels qRT-PCR getestet. Es zeigte sich eine sehr heterogene Verteilung bezüglich der Markerexpression in den verschiedenen Zelllinien. Während FXVD3, SPINK1 und UPKII in allen Blasen tumorzelllinien nachgewiesen werden konnten, zeigte sich eine Expression von KRT17 und KRT20 in 16 von 17 Zelllinien. MUC5B wurde lediglich von 13 der 17 Zelllinien exprimiert. Es konnte kein KRT20-Expressionsnachweis in Zellen der schlecht differenzierten Zelllinie UmUc3 (G3), kein KRT17-Nachweis in Zellen der schlecht differenzierten Zelllinie J82 (G3) und kein Genexpressionsnachweis von MUC5B in den Zelllinien UMUC3 (G3), 253J (G3), RT4 (G1) und J82 (G3) erfolgen. Ein möglicher Grund für den teilweise fehlenden Nachweis der verschiedenen Marker in den Blasenkarzinomzelllinien mag im Verlust der Expression verschiedener Gene mit zunehmender Entdifferenzierung der Tumorzellen liegen. Eine andere

denkbare Erklärung für das Nicht-Expriemieren bestimmter Gensequenzen könnte das Vorliegen von Mutationen im Bereich der Primerbindung sein. Bereits der Austausch eines Basenpaares im Primerbindungsbereich kann dazu führen, dass sich die Primer nicht mehr suffizient an die cDNA anlagern können und dadurch keine Amplifikation mit Nachweis der betreffenden Gensequenz stattfinden kann. Solche Mutationen können im Rahmen der Instabilität des Genoms von Karzinomzellen entstehen. Ein Nachweis von FXYD3, SPINK1 und UPKII konnte in allen 17 hier getesteten Blasentumorzelllinien erfolgen, jedoch zeigte sich für diese Marker auch eine basale Expression in PBMCs gesunde Spender. Durch die Festlegung von Grenzwerten konnte jedoch eine Unterscheidung zwischen basaler Expression in PBMCs und tumorspezifischer Expression gemacht werden.

Die anderen drei Marker (KRT17, KRT20, MUC5B) konnten nicht in den PBMCs der gesunden Spender nachgewiesen werden.

Anhand dieses Vorversuches zeigte sich bereits ein eventueller Vorteil des Markers SPINK1 gegenüber den anderen fünf Markern, da er von allen Tumorzelllinien jedoch nicht von den PBMCs expriemiert wurde.

6.3 Bestimmung der Sensitivität der qRT-PCR

Um die Sensitivität der sechs Marker in der qRT-PCR zu testen, wurden Verdünnungsreihen von Blasentumorzelllinien sowie von klonierten Markergensequenzen erstellt. Abhängig von der Art des untersuchten Gewebes sind in der Literatur verschiedene Möglichkeiten zur Determinierung der Sensitivität verschiedener Marker vorbeschrieben. Zur Bestimmung der Sensitivität beim Nachweis disseminierter Tumorzellen in Knochenmark und Lymphknoten sowie zirkulierender Zellen im Blut von Patienten mit Brust-, Magen- oder kolorektalem Karzinom wurden vorwiegend Zell-Verdünnungsreihen unterschiedlicher Zelllinien in PBMCs von gesunden Spendern untersucht (Bosma et al., 2002; Majima, Ichikura, Takayama, Chochi, & Mochizuki, 2000; Stathopoulou et al., 2002). Die Nachweisgrenzen lagen abhängig von Marker und untersuchter Karzinomzelllinie bei einer bis zehn Zellen pro 10^6 PBMCs. Auch in Untersuchungen zu DTCs und CTCs bei Harnblasenkarzinompatienten mittels Genexpressionsnachweises konnten vergleichbare Ergebnisse gezeigt werden (Fujii et al., 1999; Kinjo, Okegawa, Horie, Nutahara, & Higashihara, 2004; Lu et al., 2000; Yuasa et al., 1998). Mit unseren Markern konnten wir eine Sensitivität von zehn Zellen in 10^7 PBMCs erzielen und können damit die Ergebnisse anderer Gruppen reproduzieren. Ein großes Problem bei dieser Art der Sensitivitätsbestimmung liegt in der geringen Vergleichbarkeit zwischen den verschiedenen Studien, da abhängig von Studie und untersuchtem Gewebe unterschiedliche Zelllinien verwendet wurden. In unserer Studie zeigten sich einerseits starke Schwankungen der Expressionswerte des jeweiligen Markers in den 17 unterschiedlichen

Zelllinien, andererseits auch starke Schwankungen der Expressionswerte der sechs Marker innerhalb der einzelnen Zelllinien. So zeigte sich beispielsweise bei der Zelllinie RT4 für die Marker FXYD3, KRT17, KRT20 und UPKII eine sehr starke und für SPINK1 eine etwas weniger starke Expression. MUC5B wurde überhaupt nicht von der Zelllinie exprimiert.

Die Variabilität der Expressionswerte eines Markers in den 17 verschiedenen Zelllinien ist anhand des Markers KRT17 sehr gut ersichtlich: die Ct-Werte schwanken von 29 bis weit über 40, in einer Zelllinie ist die KRT17-Genexpression nicht nachweisbar.

Um eine bessere Vergleichbarkeit und Reproduzierbarkeit der Ergebnisse zu erhalten, haben wir eine Bestimmung der Sensitivität anhand von Plasmidverdünnungsreihen der entsprechenden Marker vorgenommen. Für KRT20 wurde diese Art der Sensitivitätsbestimmung bereits 2001 durch die Arbeitsgruppe um Soong et al. beschrieben (Soong, Beyser et al. 2001). Dort wurde eine Verdünnungsreihe von KRT20-Konstrukten erstellt und anschließend in der qualitativen Polymerasekettenreaktion die Zahl an gerade noch nachweisbaren Kopien untersucht, welche zwischen einer und zehn Kopien lag. In unserer Studie konnten wir ebenfalls eine Sensitivität von zehn Kopien der Marker FXYD3, KRT17, KRT20, SPINK1 und UPKII anhand von Verdünnungsreihen in reinem Wasser zeigen.

6.4 Methodische Probleme

6.4.1 Entnahme- und Aufarbeitungstechniken der pelvinen Lymphknoten

Die Gewinnung der pelvinen Lymphknoten der Harnblasenkarzinompatienten und Prostatakarzinompatienten erfolgte im Rahmen der radikalen Zystektomie bzw. Prostatektomie unter sterilen Bedingungen nach einem standardisierten Verfahren. Die Extraktion der Lymphknoten aus dem umgebenden Fett- und Bindegewebe sowie die weitere Aufarbeitung der Lymphknoten erfolgten teilweise durch unterschiedliche Personen. Um dennoch eine hinreichende Vergleichbarkeit der Proben zu erzielen, erfolgten auch diese Schritte nach einem standardisierten Protokoll (s. Material und Methoden). Noch im Operationssaal, wenige Minuten nach Entnahme der Lymphknoten durch den Operateur, wurden die Lymphknoten von überschüssigem Fett- und Bindegewebe befreit und eine anschließende symmetrische Teilung der Lymphknoten in zwei Hälften vorgenommen. Jene Hälfte, die für das Institut der Pathologie der Technischen Universität München zur histopathologischen Begutachtung bestimmt war, wurde in Formalin fixiert und umgehend an das Institut weiter geleitet. Die andere für die molekularbiologische Untersuchung bestimmte Hälfte wurde nach Verpackung in sterilisierter Aluminiumfolie innerhalb weniger Minuten in flüssigem Stickstoff kryokonserviert um das Risiko eines Qualitätsverlusts der bei Raumtemperatur instabilen RNA zu minimieren. Jede Lymphknotenhälfte erhielt eine dem Entnahmeort bestimmte Bezeichnung. Dadurch konnte gewährleistet werden, dass eine

exakte anatomische Zuordnung zum Entnahmeort aber auch eine exakte Zuordnung zur adäquaten Lymphknotenhälfte stattfand.

Ein großer Nachteil in der Untersuchung der Lymphknoten mittels qRT-PCR gegenüber der histopathologischen Untersuchung besteht in der eingeschränkten Möglichkeit, Lymphknoten mit geringerem Durchmesser zu analysieren. In mehreren Studien konnte gezeigt werden, dass unter einer bestimmten Größe eine RNA-Extraktion insuffizient ist (Branagan, Hughes, Jeffrey, Crane-Robinson, & Perry, 2002; Liefers et al., 1998). Alle Lymphknoten mit einem Durchmesser von weniger als drei Millimeter waren daher einer alleinigen histopathologischen Untersuchung vorbestimmt. 50 % der entnommenen Lymphknoten konnten dadurch nicht molekularbiologisch untersucht werden, da die Konzentration der RNA nach RNA-Extraktion zu gering für die anschließende cDNA-Synthese gewesen wäre.

Zudem konnte weitere 107 Lymphknoten ebenfalls nur histopathologisch untersucht werden, da nach erfolgreicher Aufreinigung der keine suffiziente Menge an RNA vorhanden war.

Somit konnten lediglich 1453 von insgesamt 3013 pelvinen Lymphknoten sowohl durch die Histopathologie als auch die qRT-PCR untersucht werden. Exakt die Hälfte, nämlich 1453 Lymphknoten konnten ausschließlich durch die Standardhistopathologie begutachtet werden, wovon in 1434 (98,7 %) Lymphknoten keine Tumorf infiltration nachgewiesen werden konnte. Somit konnte in 19 Lymphknoten von zwei (2,3 %) Patienten histopathologisch eine Lymphknotenmetastasierung festgestellt werden. Diese Lymphknoten waren einer molekularbiologischen Analyse nicht zugänglich. Jene zwei Patienten besaßen allerdings noch weitere Lymphknoten, die sowohl histopathologisch als auch molekularbiologisch positiv waren.

Bei Betrachtung anderer bisher publizierter Studien ist ersichtlich, dass auch dort, wenn auch ein sehr viel geringerer Anteil an Lymphknoten aufgrund mangelnder Größe oder zu geringer RNA-Konzentrationsmenge nicht untersucht werden konnte (Liefers et al., 1998). Die Größe des Lymphknotens stellt einen der limitierenden Faktoren für die molekulare Untersuchung mittels qRT-PCR dar. Die Etablierung einer verbesserten RNA-Extraktionsmethode wäre somit sinnvoll um Lymphknoten mit einem geringeren Durchmesser ebenfalls einer molekularen Untersuchung unterziehen zu können.

6.4.2 Methodische Probleme der qRT-PCR

Prinzipiell ist immer die Möglichkeit einer Kontamination der PCR gegeben. Da mittels der Polymerasekettenreaktion eine Amplifikation spezifischer DNA-Sequenzen um ein Vielfaches der Ausgangsmenge möglich ist, steigt die Wahrscheinlichkeit, dass Kontamination mit bereits minimalen Nukleinsäurekonzentrationen mit der qRT-PCR nachgewiesen und als falsch positive Ergebnisse gedeutet werden können. Daher beinhaltet jedes Experiment neben der

eigentlich zu untersuchenden Probe eine sogenannte „Non-template Controle“ (NTC) als Negativkontrolle. Hierbei wurde anstelle der cDNA der Lymphknotenprobe reines Wasser pipettiert. Ein positives Resultat in der qRT-PCR hätte somit auf eine Verunreinigung der Marker, des Master-Mixes oder des destillierten Wassers hingewiesen. Alle NTCs waren in unseren Experimenten negativ, sodass von keiner Verunreinigung und damit falsch positiven Ergebnissen durch Kontamination ausgegangen werden musste. Zudem konnte eine Kontamination mit genomischer DNA durch die von uns verwendeten Exon umspannenden Primer der Zielsequenzen ausgeschaltet werden.

Da die RNA ein relativ instabiles Molekül ist und insbesondere durch RNasen abgebaut werden kann, wurde diese vor Verwendung für die qRT-PCR mit Hilfe der Reversen Transkriptase in die wesentlich stabilere cDNA umgeschrieben. Wir verwendeten eine Endkonzentration von 50 ng für die qRT-PCR. Allerdings können sich durch kleine Unterschiede in der Konzentration und der Effizienz deutliche Unterschiede bei einer exponentiellen Vervielfältigung im Rahmen der qRT-PCR ergeben. Um eine Vergleichbarkeit zwischen den verschiedenen Proben zu ermöglichen, erfolgte neben der Amplifikation der Markergensequenzen zusätzlich die Amplifikation der Referenzgene GAPDH, HPRT1 und YWHAZ in den Proben. Durch die anschließende relative Quantifizierung konnten so Konzentrationsunterschiede, die bei der Probenmaterialgewinnung, RNA-Extraktion oder reversen Transkription auftreten können, über die Bestimmung des Ziel- und Referenzgens aus der gleichen cDNA-Probe weitgehend ausgeglichen werden.

Zur Kontrolle von Pipettierfehlern wurde bei jedem Experiment zusätzlich eine Positivkontrolle (Blasentumorzelllinien 647V und BFTC905) pipettiert und auf die Genexpression der sechs Marker hin untersucht. Zwischen den einzelnen Experimenten zeigte sich eine vergleichbare Expression der Marker.

6.5 Detektionsmethoden zum Nachweis disseminierter Tumorzellen in pelvinen Lymphknoten

In den bisher veröffentlichten Studien zum Nachweis disseminierter Tumorzellen in Lymphknoten von Tumorpatienten wurden die Immunhistochemie und die Polymerasekettenreaktion als mögliche Methoden angewendet und mit den Ergebnissen aus der konventionellen histopathologischen Untersuchung der Lymphknoten verglichen. Dabei wurde mittels der Immunhistochemie die Proteinexpression verschiedener Epithelmarker in den Lymphknoten untersucht. Mit Hilfe der RT-PCR wurde auf Ebene der Genexpression der Epithelmarker das Vorhandensein von disseminierten Tumorzellen untersucht. Es zeigten sich höchste Detektionsraten disseminierter Tumorzellen mittels der PCR, gefolgt von der IHC. Die Histopathologie zeigte die geringste Sensitivität im Nachweis disseminierter Tumorzellen. Dies

mag an der Methodik im Vorgehen der histopathologischen Untersuchung liegen: Nach Entnahme der Lymphknoten durch den Operateur, anschließender Entfernung des Fett- und Bindegewebes und Fixierung der Lymphknoten in Formalin erfolgt eine Hämatoxylin-Eosin-Färbung einzelner, weniger Mikrometer dünner Schnitte der Lymphknoten. Die anschließende mikroskopische Untersuchung der Schnitte erfolgt durch den Histopathologen. Aufgrund von Kosten- und Zeitgründen werden jeweils nur wenige, in der Regel ein bis zwei Schnitte des Lymphknotens begutachtet. Dadurch besteht die Gefahr eines Stichprobenfehlers. Befindet sich ein suspekter Fokus in einem der nicht untersuchten Schnitte, so könnte der Lymphknoten fälschlicherweise als metastasenfrei klassifiziert werden. Ein möglicher Lösungsansatz hierfür wäre das Betrachten von Serienschnitten unter dem Mikroskop. Da dies aber aus ökonomischen Gründen kaum in den klinischen Alltag integrierbar ist, sind andere effizientere Verfahren zur Analyse der Lymphknoten notwendig. Ein weiterer Nachteil der histopathologischen Musterung der Lymphknoten besteht darin, dass diese stark vom Untersucher abhängig ist. Die Unterscheidung zwischen einer atypischen Zelle, einer nichtrelevanten suspekten Zelle und einer aktivierten Endothelzelle ist teilweise kaum möglich (Zehentner, 2002). Des Weiteren spielt auch die Größe des Fokus eine entscheidende Rolle, ob der Lymphknoten als pN1 oder pN0 durch den Histopathologen beurteilt wird. Untersuchungen dazu konnten zeigen, dass die Detektionswahrscheinlichkeit eines Fokus mit drei Zellen im Durchmesser bei 1 % liegt (Neville, Bettelheim, Gelber, & Goldhirsch, 1990). Ein entscheidender Vorteil gegenüber der molekularen Untersuchung der Lymphknoten besteht in der Möglichkeit der zytomorphologischen Begutachtung der Zellen in den einzelnen Schnitten. So können durch den Pathologen Aussagen darüber getroffen werden, wie viele Zellen im Lymphknoten suspekt erscheinen, wie groß und wo der abnorme Fokus im Lymphknoten lokalisiert ist und auch ob die suspekten Zellen im Lymphknoten eine Immunantwort der umgebende Zellen hervorrufen (Pelkey, Frierson, & Bruns, 1996).

Die Analyse der Lymphknoten durch die Immunhistochemie stellt derzeit ein additionalen Verfahren zur routinemäßigen histopathologischen Untersuchung der Lymphknoten dar. Eine Metastasierung im Lymphknoten kann durch die Reaktion der epithelialen Proteine mit spezifischen monoklonalen Antikörpern und anschließender Visualisierung durch eine Farbreaktion sichtbar gemacht werden. Bei Untersuchungen zum Brustkrebs konnte eine 13 % höhere Sensitivität als durch die alleinige histopathologische Untersuchung erzielt werden (Cote et al., 1999). In Untersuchungen an Lymphknoten von Blasen tumorpatienten zeigte sich abhängig vom Protein, gegen den der Antikörper gerichtet war, für FXD3 eine gleiche und für KRT20 sogar eine geringere Sensitivität als für die klassische Histopathologie (Gazquez et al., 2012b). Jensen et al. konnten eine geringfügig bessere Sensitivität der IHC gegenüber der Histopathologie zeigen (Jensen, Hoyer, & Jensen, 2011). Dass die höhere Detektionsrate auch klinische Auswirkung besitzt, konnte in einer Studie zum Brustkrebs gezeigt werden.

Patienten, deren Lymphknoten histopathologisch als tumorfrei beurteilt wurden, deren Lymphknoten sich aber in der Immunhistochemie anfärbten, zeigten eine höhere Rezidivrate und ein schlechteres Überleben (Byrne, Horgan, England, Callaghan, & Given, 1992).

Ein großer Vorteil der immunhistochemischen Untersuchung liegt in der leichten Integrierbarkeit in die routinemäßige histopathologische Untersuchung der Lymphknoten. Gegenüber der molekularen Analyse der Lymphknoten besitzt diese Art der Untersuchung gleiche Vorteile wie die oben beschriebene histopathologische Analyse. Allerdings ist auch wie bei der histopathologischen Untersuchung eine Standardisierung problematisch. Je nach Untersuchungsbedingungen des Gewebes wie pH-Wert, Fixiertemperatur des Gewebes, Dauer der Fixierung und technischer Ausführung der Fixierung ergeben sich so unterschiedliche Ergebnisse.

Die Hintergrundexpression von epithelialen Antigenen kann zudem zu falsch positiven Ergebnissen führen. Insbesondere bei schwächer gefärbten Arealen ist dann die Unterscheidung zwischen Hintergrundexpression und Tumorzellfokus sehr schwierig (Zehentner, 2002).

Nicht auf dem Proteinnachweis, sondern auf dem Genexpressionsnachweis epithelialer Marker basierend ist die Analyse der Lymphknoten mittels Polymerasekettenreaktion. Hierzu muss der Lymphknoten bzw. die Lymphknotenhälfte zunächst mechanisch lysiert werden. Nach anschließender RNA-Extraktion und cDNA-Synthese kann dann die einstige Lymphknotenprobe auf die Expression der epithelialen Gene mittels der PCR untersucht werden. Das Problem des Stichprobenfehlers ist damit gelöst, da mit dieser Methode nicht nur einzelne Schnitte, sondern die Probe als Ganzes zeitgleich untersucht wird. Auch eine Standardisierung ist sehr viel besser möglich als bei den zuvor beschriebenen Verfahren. Die PCR stellt somit eine einfache und schnelle Methode zum Nachweis einer Metastasierung dar. Bei der Immunhistochemie besteht die Gefahr falsch positiver Ergebnisse durch eine Reaktion der monoklonalen Antikörper mit den Epitopen nichtmaligner Zellen. Die Gefahr falsch positiver Ergebnisse durch Kontamination oder aber auch durch die basale Expression der Marker in nicht malignen Zellen besteht auch bei der PCR. Prinzipiell ist eine Expression epithelialer Marker nicht automatisch mit dem Vorhandensein von Tumorzellen gekoppelt. Eine Bewertung positiver Ergebnisse in der IHC und PCR ist damit viel kritischer zu beurteilen, als der mikroskopische Nachweis von maligne veränderten Zellen. Durch die Einführung der qRT-PCR und der damit verbundenen Verwendung von Grenzwerten für die Genexpression der verschiedenen Marker ist dieses Problem zumindest teilweise gelöst. Sie ermöglicht eine Differenzierung zwischen basaler Expression in gesundem Gewebe von einer erhöhten Expression von Tumorzellen befallenem Gewebe. Anhand des Abgleiches der klinischen Daten mit den Genexpressionswerten kann somit auch ein Grenzwert für die jeweilige

Markerexpression definiert werden, der es ermöglicht, zwischen klinisch signifikanter Lymphknotenbeteiligung und klinisch insignifikanter Beteiligung zu unterscheiden.

Ein entscheidender Nachteil der PCR gegenüber den anderen zuvor beschriebenen Methoden ist die Tatsache, dass keine retrospektive Beurteilung des molekular untersuchten Gewebes mehr möglich ist. Einmal mechanisch lysiert, kann keine Aussage mehr über das Wachstumsverhalten, die Lokalisation und die Größe des Fokus getroffen werden. Lediglich ein gewisser Eindruck über die Größe des Tumors kann durch die Quantifizierung in der qRT-PCR gewonnen werden, was einen Vorteil der quantitativen PCR gegenüber der klassischen PCR bedeutet. Um dennoch eine Beurteilung des Lymphknotens durch den Histopathologen zu erhalten, wurden im Rahmen dieser Studie die Lymphknoten halbiert und jeweils eine Hälfte durch den Histopathologen untersucht, die andere Hälfte molekulargenetisch untersucht. Außerdem wurde zusätzlich ein Anschnitt aus der molekulargenetisch untersuchten Lymphknotenhälfte entnommen und mikroskopisch untersucht, um zu verhindern, dass sich die abnormen Zellen just in dieser Hälfte befunden hätten und damit durch die Histopathologie gar nicht detektierbar gewesen wären.

Des Weiteren stellt die Größe der Lymphknoten(-hälfte) einen limitierenden Faktor für die molekulargenetische Untersuchung dar. Besaß der Lymphknoten eine Größe von weniger als 3 Millimeter, so wurde dieser in unserer Studie nur histopathologisch gemustert, die RNA-Menge hätte für keine molekulare Untersuchung ausgereicht.

In zahlreichen Studien zur Detektion disseminierter Tumorzellen in Lymphknoten von Patienten mit Brustkrebs, Melanom, Kolonkarzinom, nichtkleinzelligem Lungenkrebs und Blasenkrebs konnte eine bessere Sensitivität der PCR gegenüber der konventionellen histopathologischen Untersuchung festgestellt werden (Bostick et al., 1999; Gazquez et al., 2012b; Kataoka et al., 2000; Ribal et al., 2006; Van Trappen et al., 2001). Dennoch stellt die konventionelle Histopathologie den Goldstandard zur Untersuchung der Lymphknoten auf Metastasierung dar. Aufgrund oben aufgeführter Nachteile der PCR kann die PCR die konventionelle histopathologische Untersuchungsmethode nicht ersetzen und sollte daher als Zusatzmethode verwendet werden, um die Detektionsrate okkulterer Mikrometastasen in Lymphknoten von Harnblasenkarzinompatienten zu verbessern.

6.6 Genexpression in der Kontrollgruppe und Festlegung der Grenzwerte

Eine Untersuchung der pelvinen Lymphknoten der Studienpatienten auf disseminierte Tumorzellen wurde mittels Genexpressionsanalyse anhand der qRT-PCR durchgeführt. Diese Art der Methode basiert auf der Genexpression verschiedener epithelialer Marker in Lymphknoten. Da auch nichtmaligne Zellen eine basale Expression an epithelialen Markern zeigen können, ist die Festlegung von Grenzwerten, die eine Differenzierung zwischen basaler

Grundexpression und krebsspezifischer Expression ermöglicht, für die einzelnen Marker notwendig. Hierzu wurden 135 histopathologisch tumorfreie Lymphknoten von 45 Patienten mit lokalisiertem Prostatakarzinom als Kontrollgruppe verwendet. Der Ausschluss einer histopathologisch nicht erfassten Metastasierung durch das Prostatakarzinom fand durch den Ausschluss einer PSA-Expression mittels qRT-PCR molekularbiologisch statt. Die pelvinen Lymphknoten der Kontrollgruppe wurden nach gleichem Prinzip wie die Lymphknoten der Studiengruppe im Rahmen einer radikalen Prostatektomie gewonnen, noch im Operationssaal von überschüssigem Gewebe befreit, halbiert und zur histopathologischen Untersuchung gesendet bzw. zur weiteren molekularen Analyse kryokonserviert. Nach molekularer Aufarbeitung wurden die Lymphknoten auf die Genexpression der sechs in dieser Studie verwendeten Marker untersucht. Wir legten den maximalen Genexpressionswert jedes einzelnen Markers in den Lymphknoten der Kontrollgruppe als Grenzwert für die Studiengruppe fest. Alle Lymphknoten der Studiengruppe, deren Genexpressionswerte über den definierten Grenzwerten lagen, wurden dann als molN1 definiert.

In der Auswahl der Größe des Kontrollkollektivs herrscht Uneinigkeit zwischen den verschiedenen Autoren. Während in den bis dato veröffentlichten Studien zum Nachweis disseminierter Tumorzellen in Lymphknoten von Blasen tumorpatienten eine durchschnittliche Zahl von 32 Lymphknoten untersucht wurde (Gazquez et al., 2012b; Marin-Aguilera et al., 2008), lag die Zahl an untersuchten Kontrolllymphknoten bei einer Studie zum Prostatakarzinom bei 148 Lymphknoten (Miyake et al., 2007). Die Größe des Kontrollkollektivs ist dabei maßgeblich an der Festlegung der Grenzwerte beteiligt. Mit steigender Zahl an untersuchten Lymphknoten steigt einerseits die Wahrscheinlichkeit, einen möglichst realistischen Wert für die Basalexpression der einzelnen Marker zu erhalten, gleichzeitig erhöht sich aber auch die Wahrscheinlichkeit des Auftretens von Extremwerten, die dann wiederum zu einer Verfälschung der Ergebnisse führen können. Es bieten sich mehrere Möglichkeiten für die Definition der Grenzwerte an: entweder die Verwendung des Mittelwertes plus dem 2-fachen Wert der Standardabweichung (Miyake et al., 2007) oder aber die Verwendung des Maximalwertes (Dango et al., 2010). Wir untersuchten anhand beider Werte die Ergebnisse aus der Studiengruppe und entschieden uns für die Verwendung des Maximalwertes als Grenzwert. Mit diesem Wert als Grenzwert konnten weitaus weniger Lymphknoten in der Studiengruppe als molN1 definiert werden, dafür war die Gefahr falsch positiver Ergebnisse reduziert. Bis zum jetzigen Zeitpunkt ist aufgrund der noch nicht abgeschlossenen Tumornachsorge eine Festlegung der Grenzwerte nur anhand der Expressionswerte der Kontrollgruppe möglich. Womöglich wäre die Festlegung der Grenzwerte anhand der klinischen Nachsorge der Studienpatienten sinnvoller, um eine klinisch relevante Metastasierung zu detektieren. Untersuchungen diesbezüglich werden Gegenstand zukünftiger Studien sein.

6.7 Genexpression der Marker in histopathologisch positiven (pN1/pN2) Lymphknoten

Insgesamt wurden 1453 pelvine Lymphknoten von 86 Harnblasenkarzinompatienten sowohl histopathologisch als auch molekularbiologisch auf das Vorhandensein einer Metastasierung untersucht. Histopathologisch wurden 45 (3,1 %) Lymphknotenmetastasen festgestellt. Die restlichen 1408 Lymphknoten (96,6 %) wurden als metastasenfrei beurteilt (pN0). Die 45 histopathologisch positiven Lymphknoten stammten von 18 Patienten, in elf der 18 Patienten wurden zwei oder mehr Lymphknotenmetastasen mittels Histopathologie detektiert. Dementsprechend wurden sie einem pN2-Stadium zugeordnet, sieben Patienten hatten ein pN1-Stadium. In den Lymphknoten der restlichen 68 Patienten konnte histopathologisch keine Metastasierung festgestellt werden.

Ergebnisse der FXYD3-Expression: 39 der 45 durch die Histopathologie als N1 klassifizierten korrespondierenden Lymphknotenhälften wurden ebenfalls durch den Marker FXYD3 in der qRT-PCR als molekularpositiv beurteilt. Unter Hinzunahme der Ergebnisse der molekularen Untersuchung aller Lymphknoten konnten diese 18 Patienten auch als molekularpositiv beurteilt werden. Somit konnte in sechs Lymphknoten kein molekulargenetischer Nachweis einer Metastasierung erfolgen, dennoch waren alle Patienten, die als pN1/pN2 klassifiziert wurden, durch diesen Marker ebenfalls positiv.

Ergebnisse der KRT17-Expression: 40 von 45 Lymphknoten und 18 von 18 Patienten zeigten eine dem Grenzwert für KRT17 entsprechende erhöhte Genexpression von KRT17 und konnten daher als molekular positiv klassifiziert werden. KRT17 war damit der Marker mit der höchsten Sensitivität bezüglich der histopathologisch positiven Lymphknoten und Patienten.

Ergebnisse der KRT20-Expression: Nur 28 der 45 korrespondierenden Lymphknotenhälften der histopathologisch positiven Lymphknoten wiesen eine erhöhte KRT20-Expression auf. Bei Betrachtung der KRT20-negativen histopathologisch-positiven Lymphknoten fällt jedoch auf, dass 10 Lymphknoten dabei von einem einzigen Patienten (Patient 25) stammten. Nur einer von 11 histopathologisch positiven Lymphknoten dieses Patienten konnte durch den Marker detektiert werden, dieser zeigte ebenfalls eine im Vergleich zu den anderen histopathologisch und molekular positiven Lymphknoten niedrige Expression von KRT20. Diese Ergebnisse lassen sich mit den Ergebnissen der Genexpression von KRT20 in den 17 verschiedenen Zelllinien vereinbaren, wo ebenfalls gezeigt werden konnte, dass es Blasentumorzelllinien gibt (UmUc-3), die keine Expression von KRT20 zeigen. 16 von 18 histopathologisch Lymphknoten-befallenen Patienten wurden ebenfalls durch KRT20 detektiert.

Ergebnisse der MUC5B-Expression: Noch weniger histopathologisch Metastasen-befallene Patienten konnten durch den Marker MUC5B detektiert werden: 18 der 45 histopathologisch positiven Lymphknoten zeigten eine erhöhte MUC5B-Expression, lediglich 10 von 18 Patienten wiesen eine erhöhte Expression von MUC5B auf. Anhand der Untersuchungen zur

Expression von MUC5B in verschiedenen Zelllinien des Harnblasenkarzinoms bildete sich dieser Trend bereits ab. MUC5B war der Marker unter unseren sechs Markern, der die wenigsten Zelllinien detektierte. In der Lymphknotenstudie konnte dieses Ergebnis bestätigt werden.

Ergebnisse der SPINK1-Expression: Gleich viele Lymphknoten wie durch FXYD3 (n = 39) konnten durch den Marker SPINK1 als positiv beurteilt werden. Dennoch konnten zwei der pN1/pN2 Patienten nicht detektiert werden.

Ergebnisse der UPKII-Expression: Eine erhöhte Expression von UPKII zeigte sich in 38 der 45 histopathologisch positiven Lymphknoten. 18 von 18 Patienten besaßen mindestens einen Lymphknoten mit einer erhöhten UPKII-Expression.

Da der optimale Marker bzw. die beste Markerkombination am geltenden Goldstandard, der konventionellen Histopathologie, gemessen werden muss, schlagen wir die Markerkombination KRT17 und SPINK1 zur Detektion disseminierter Tumorzellen in Lymphknoten von Blasentumorpatienten vor. Mittels dieser Kombination konnten 43 von 45 histopathologisch positiven Lymphknoten und 18 der 18 histopathologisch positiven Patienten detektiert werden. Zwei histopathologisch positive Lymphknoten zeigten weder mit dieser Kombination noch mittels der anderen verbliebenen vier Marker eine erhöhte Markerexpression.

Folgende Gründe für die fehlende Expression eines oder mehrerer Marker sind denkbar:

1. Lokalisation der Tumorzelle im Lymphknoten: Wie bereits beschrieben, wird nicht der Lymphknoten als Ganzes sondern aus methodischen Gründen immer nur eine Hälfte des Lymphknotens molekular untersucht. Somit besteht prinzipiell die Möglichkeit, dass sich der Fokus nur in der nicht molekular analysierten Hälfte befindet und damit eine pN1 und moIN0 Klassifikation resultiert. Diese Möglichkeit scheint relativ wahrscheinlich, da die beiden Lymphknotenhälften für alle sechs Marker negativ waren. Eine Lösung für dieses Problem wäre eine Aufarbeitung und anschließende molekulare Analyse des gesamten Lymphknotens. Dadurch wäre jedoch dann eine histopathologische Beurteilung des Lymphknotens nicht mehr möglich, Informationen zur Lage der Metastase, zur Größe des Fokus und zur Reaktion der umgebenden Zellen würden dann verloren gehen. Alternativ könnte eine RNA-Extraktion aus Paraffinblöcken angewendet werden. Dadurch könnte zunächst der gesamte Lymphknoten histopathologisch analysiert werden und anschließend würde die RNA-Extraktion aus den Paraffinblöcken erfolgen. Ein großer Nachteil dieser Methode ist allerdings ein RNA-Mengenverlust bei der Extraktion aus Paraffin gegenüber der von uns verwendeten RNA-Extraktionsmethode aus Frischgewebe. Womöglich wäre die Menge an RNA so gering, dass eine molekulare Analyse nicht mehr möglich ist.

2. Verlust der Markerexpression bei zunehmender Entdifferenzierung der Tumorzellen: Die epitheliale-mesenchymale Transition der Tumorzellen mit einer Änderung des

Krebszellphänotyps zwischen epithelialen und mesenchymalen Zustand spielt eine entscheidende Rolle in der Tumorgenese und Disseminierung von Tumorzellen (Retz et al., 2011; Yilmaz & Christofori, 2009). Je stärker dabei die Tumorentdifferenzierung desto wahrscheinlicher ist das Auftreten eines alterierten Genexpressionsmusters. Damit ließe sich erklären, warum teilweise komplette Patienten für einige Marker negativ sind. Bei Betrachtung der zwei histopathologisch positiven molekular negativen Lymphknoten fällt auf, dass beide von einem einzigen Patienten stammen und dieser Patient einen stark entdifferenzierten Tumor aufweist. Prinzipiell ist es immer möglich, dass die Tumorzellen ein alteriertes Genexpressionsmuster zeigen und dadurch womöglich einzelne epitheliale Gene nicht mehr exprimiert werden. Um solche Patienten dennoch zu detektieren, bietet es sich an, die Lymphknoten auf die Expression mehrerer Gene zu untersuchen. Wir verwendeten eine Kombination von sechs Markern, dennoch konnten zwei Lymphknoten mittels der molekularen Marker nicht detektiert werden. Da allerdings alle Marker bei den zwei Lymphknoten negativ waren, jedoch einige der histopathologisch negativen Lymphknoten dieses Patienten eine erhöhte Expression einzelner Marker aufwiesen, scheint diese Erklärung jedoch weniger wahrscheinlich.

3. Mutationen oder Polymorphismen im Primerbindungsbereich. Eine weitere denkbare Begründung für das negative Resultat in der Genexpression epithelialer Marker in den histopathologisch positiv beurteilten Lymphknoten kann das Auftreten von Mutationen oder Polymorphismen im Primerbindungsbereich sein. Bereits durch den Austausch einer einzigen Base im Genom, dort wo die Primer für die verschiedenen epithelialen Gene binden, kann eine insuffiziente oder komplett ausbleibende Amplifikation resultieren.

Die alleinige molekulare Analyse der Lymphknoten kann bis zum jetzigen Zeitpunkt die Untersuchung der Lymphknoten mittels konventioneller Histopathologie nicht ersetzen. Sie bleibt daher momentan alleiniges zusätzliches diagnostisches Mittel in der Detektion disseminierter Tumorzellen.

6.8 Genexpression der Marker in histopathologisch tumorfreien (pN0) Lymphknoten

Ergebnisse der FXYD3-Expression: Die klassische Histopathologie ergab, dass 1408 der 1453 Lymphknoten von 68 Patienten tumorfrei (pN0) waren. Die Untersuchung der korrespondierenden Lymphknotenhälfte mit der FXYD3 qRT-PCR ergab eine positive Genexpression in 36 der 1408 (2,6 %) pN0-Lymphknoten von vier (5,9 %) Harnblasenkarzinompatienten.

Ergebnisse der KRT17-Expression: 69 der 1408 pN0 Lymphknoten (4,9 %) zeigten eine erhöhte KRT17 Expression. Mittels dieses Markers konnten zusätzlich zu den 18 pN1

Patienten weitere 12 Patienten detektiert werden. Somit zeigte sich ein Upstaging-Effekt für 17,6 % der pN0-Patienten.

Ergebnisse der KRT20-Expression: 38 (2,5 %) zusätzliche Lymphknoten von vier (5,9%) als pN0 klassifizierten Patienten wiesen eine erhöhte Genexpression von KRT20 auf.

Ergebnisse der MUC5B-Expression: Die Untersuchung der 1408 korrespondierenden Lymphknotenhälften der 68 Harnblasenkarzinompatienten ergab bei 35 (2,5 %) Lymphknotenhälften von 13 (19,1 %) Patienten eine über dem Grenzwert liegende Genexpression von MUC5B. Auffällig ist, dass zwar weitaus weniger Lymphknoten im Vergleich zu anderen Markern mittels MUC5B detektiert wurden, dennoch aber die meisten Patienten ein Upstaging durch diesen Marker erfahren würden. Während es teilweise große Überschneidungen in den durch die verschiedenen Marker zusätzlich detektierten Patienten gibt, handelt es sich bei den MUC5B-positiven Patienten um solche, die teilweise nur aufgrund einer erhöhten Expression von MUC5B als mIN1 beurteilt wurden. Es bleibt abzuwarten, ob diese Patienten eventuell ein abweichendes Rezidivrisiko gegenüber den Patienten aufweisen, die durch die anderen Marker positiv sind.

Ergebnisse der SPINK1-Expression: 83 der 1408 (5,9 %) histopathologisch negativen Lymphknoten wiesen eine erhöhte SPINK1-Expression auf. Es zeigte sich ein Upstaging von elf (16,2 %) Patienten

Ergebnisse der UPKII-Expression: UPKII war der Marker, der in den meisten histopathologisch negativen Lymphknoten eine erhöhte Genexpression zeigte. Zusätzliche 106 (7,5 %) Lymphknoten und 13 (19,1 %) Patienten wiesen ein der Histopathologie widersprüchliches Ergebnis auf.

Das Vorhandensein okkulten Tumorzellen in Lymphknoten von Blasentumorpatienten wurde bereits mehrfach diskutiert (Gazquez et al., 2012b; Poulsen et al., 1998). Dabei wurden teilweise einige unserer Marker bereits zum Detektionsnachweis disseminierter Tumorzellen in Lymphknoten von Blasentumorpatienten untersucht (FXD3, KRT20, UPKII), andere Marker (KRT17, MUC5B, SPINK1) wurden durch unsere Studie erstmals an Lymphknoten von Blasentumorpatienten untersucht.

Die Arbeitsgruppe um Gazquez untersuchte 504 Lymphknoten von 90 Blasenkarzinompatienten auf die Expression von KRT20 und FXD3. Im Gegensatz zu unserer Studie wurden nicht die Lymphknotenhälften sondern 345 Paraffinblöcke auf die Genexpression dieser beiden Marker untersucht. Die Pathologie befandete 16 der 90 Patienten (17,8 %) als pN1. 19 der pN0 beurteilten Patienten zeigten eine erhöhte Expression von entweder KRT20 oder FXD3 oder beiden Markern (Gazquez et al., 2012b). Zu ähnlichen Ergebnissen kam die Studie von Marin-Aguilera. 15 % der Lymphknoten von 18,6 % der Patienten wurden mittels konventioneller Histopathologie als pN1 befundet. Mittels einer

Kombination von FXYD3 und KRT20 konnten weitere 20,5 % der Patienten als molN1 und 15 % der pN0-evaluierten Lymphknoten detektiert werden (Marin-Aguilera et al., 2008).

In unserer Studie konnten vergleichbare Ergebnisse in der histopathologischen Untersuchung der Lymphknotenhälften gezeigt werden. Anders verhielt es sich allerdings mit den molekularen Ergebnissen. In den zuvor beschriebenen Studien konnten durch die Kombination von FXYD3 und KRT20 alle histopathologisch positiven Lymphknoten ebenfalls molekular als N1 klassifiziert werden (100 %). Bei uns konnten 41 von 45 histopathologisch positiven Lymphknoten durch diese Kombination detektiert werden (91 %). Noch divergenter sind die Ergebnisse bei Analyse der histopathologisch negativen Lymphknoten. Während sich bei den zuvor beschriebenen Studien ein Upstaging –Effekt von etwa 19 % bei den pN0-Patienten ergab, konnten bei uns lediglich 6 (9 %) Patienten und 57 von 1408 (4 %) Lymphknoten durch die Kombination jener zwei Marker additional zur Histopathologie als pN0molN1 evaluiert werden. Ein möglicher Grund für eine in unserer Studie niedrigere Detektionsrate im Vergleich zu vorherigen Studien mag in der Festlegung unserer Grenzwerte für die einzelnen Marker liegen. Das Kontrollkollektiv in beiden zuvor beschriebenen Studien umfasste eine viel geringere Kontrollgruppen- und Lymphknotenzahl. Die Wahrscheinlichkeit des Auftretens von Ausreißern ist dementsprechend geringer, der Grenzwert liegt dadurch niedriger und das Risiko für falsch-positive Lymphknoten ist in der Auswertung der molekularen Analyse erhöht. Bis zum aktuellen Zeitpunkt sind noch keine vergleichbaren Studien zu KRT17 als molekularer Marker in der Detektion disseminierter Tumorzellen in Lymphknoten von Blasen tumorpatienten gelaufen. KRT17 erwies sich in unseren Untersuchungen als der Marker mit der größten Übereinstimmung mit den positiven Lymphknoten in der konventionellen Histopathologie.

KRT20 wurde bereits in anderen Studien zum Harnblasenkarzinom auf die Eignung als molekularer Marker zur Detektion disseminierter Tumorzellen beurteilt. Die Kombination mit FXYD3 wurde durch die Gruppen um Gazquez und Marin-Aguilera beurteilt (Gazquez et al., 2012b; Marin-Aguilera et al., 2008). Isoliert betrachtet wurde KRT20 zusätzlich durch die Arbeitsgruppe um Ribal. In der histopathologischen Untersuchung der Lymphknoten konnten 44 % der Patienten als pN1/pN2 beurteilt werden. Ein Upstaging durch KRT20 konnte in 47 % der pN0-beurteilten Patienten gezeigt werden. Die Ergebnisse dieser Gruppe weichen jedoch stark von den unseren ab. Es zeigen sich sowohl in der histopathologischen als auch molekularen Analyse sehr viel höhere Detektionsraten. Im Gegensatz dazu zeigte sich in unserer Studie ein Upstaging von 5,9 % der pN0 beurteilten Patienten durch den Marker KRT20.

MUC5B und SPINK1 wurde von uns erstmals als Marker zur Detektion disseminierter Tumorzellen in Lymphknoten von Blasenkarzinompatienten getestet.

Bereits anhand der Vorversuche bildete sich ab, dass MUC5B eine schlechtere Sensitivität im Vergleich zu den anderen fünf Markern besitzt. Wir nahmen diesen Marker dennoch in unsere Untersuchung auf, um in späteren Studien evaluieren zu können, ob dieser Marker eventuell eine Gruppe von Patienten abbildet, die mit einer schlechteren oder besseren Prognose im Vergleich zur MUC5B-negativen Gruppe assoziiert ist.

UPKII wurde bereits in mehreren Studien als eventueller Marker für den Nachweis disseminierter Tumorzellen in Lymphknoten von Blasen tumorpatienten getestet (Copp et al., 2006; Kurahashi et al., 2005; X. Wu et al., 2005). Der Anteil der Patienten, die histopathologisch negativ aber molekular positiv waren, schwankte zwischen zehn und 46 % und ist mit einem schlechteren Überleben gegenüber der Gruppe, die sowohl histopathologisch als auch molekularnegativ ist, assoziiert. In unserer Studie konnten 104 von 1408 (7,5 %) Lymphknoten bzw. 13 (19,1 %) Patienten als pN0molN1 klassifiziert werden. UPKII war in unserer Studie der Marker, der die meisten Patienten und Lymphknoten als singulärer Marker als molekularpositiv evaluierte. Copp et al. konnten zeigen, dass nur 5 % der histopathologisch und UPKII-negativen Patienten, jedoch 91 % der histopathologisch negativen und UPKII-positiven Patienten innerhalb von fünf Jahren nach Diagnosestellung trotz lokaler Tumorkontrolle durch radikale Zystektomie rezidierten. Somit stellt dieser Tumormarker einen signifikanten Prognosemarker für ein rezidivfreies Überleben von Harnblasenkarzinompatienten dar. Aufgrund der noch nicht abgeschlossenen Nachsorge in unserem Studienkollektiv, kann noch keine Aussage hierzu getroffen werden.

6.9 Topographie der positiven Lymphknoten (pN1 und molN1)

Alle bisherigen Studien zur Topographie von Lymphknotenmetastasen basierten auf den Ergebnissen der histopathologischen Untersuchung der Lymphknoten. Da aber die Sensitivität der konventionellen Histopathologie anderen Methoden wie Immunhistochemie und PCR-basierten Methoden unterlegen ist, wäre eine Kartographie mittels dieser Methoden detektierten Metastasen durchaus sinnvoll. Nach unserem Wissen ist diese Studie die erste Studie zur Topographie und Prävalenz von okkulten Mikrometastasen in Lymphknoten von Blasen tumorpatienten, die durch molekulare Untersuchung mittels qRT-PCR detektiert wurden.

Bis zum aktuellen Zeitpunkt ist in den Leitlinien nicht eindeutig festgelegt, wie groß das Entnahmefeld der Lymphknoten im Rahmen einer radikalen Zystektomie sein sollte. Es existieren bereits zahlreiche Studien, die den Nutzen einer ausgedehnten Lymphadenektomie gegenüber einer eingeschränkten Lymphadenektomie auf Basis histopathologischer Lymphknotenergebnisse retrospektiv analysierten. Einige Studien berichten von einem

Upstaging-Effekt durch eine ausgedehnte Lymphadenektomie (Jensen et al., 2010; Leissner et al., 2004; Poulsen et al., 1998; Vazina et al., 2004). Leissner et al. konnten zeigen, dass 55 % der Lymphknotenmetastasen im Standardlymphadenektomiefeld und 45 % außerhalb des Standard-Feldes liegen (Leissner et al., 2004). Einige Studien evaluierten das Vorhandensein von Skip-Lesions, also das Überspringen von tumornahen Lymphknotenstationen und Wiederauftreten in entfernteren Arealen in Lymphknoten von Blasen-tumorpatienten. In Untersuchungen diesbezüglich zeigte sich bei der Gruppe um Abol-Enein kein Patient mit einer solchen Läsion (Abol-Enein, El-Baz, Abd El-Hameed, Abdel-Latif, & Ghoneim, 2004). Sie schlussfolgerte daher, dass eine ausgedehnte Lymphadenektomie nicht notwendig sei. In einer ähnlichen Untersuchung um El-Shazli zeigte lediglich ein Patient von 33 Patienten eine Skip-Lesion (El-Shazli, Anwar, Ramzy, & Al-Didi, 2004). Die Gruppe erklärte dieses Ergebnis durch eine womöglich lymphatischen Verbindung zwischen Lymphknoten aus dem Gebiet um die A. Iliaca Externa und Aorta und lumbalen Lymphknoten, welche bei 3 % der Menschen (Shvetsov, 1991) vorhanden wäre und schlussfolgerte ebenfalls, dass eine eingeschränkte Lymphadenektomie ausreichend sei.

In dieser Studie lagen 45,2 % der histopathologisch positiven Lymphknoten außerhalb des eingeschränkten Feldes. Die Verteilung ist nahezu identisch mit Werten der Arbeitsgruppe um Leissner. Auch sie zeigten, dass 45 % der histopathologisch positiven Lymphknoten außerhalb des eingeschränkten Feldes liegen.

38,4 % der ausschließlich molekular positiven Lymphknoten (KRT17 oder SPINK1) lagen in dieser Studie außerhalb von Arealen des eingeschränkten Feldes.

Zwei von zwölf (16,7 %) histopathologisch als pN1-klassifizierten Patienten und vier von zwölf (33,3 %) ausschließlich molekular positiven Patienten wären fälschlicherweise als pN0 bzw. moIN0 klassifiziert worden, wenn sie nur eine eingeschränkte PLND erhalten hätten. Bei Kombination von histopathologischen und molekularbiologischen Ergebnissen hatten neun von 24 (38%) Patienten positive Lymphknoten außerhalb des eingeschränkten Feldes. Davon hatten sechs (25%) Patienten positive Lymphknoten ausschließlich außerhalb des eingeschränkten Feldes. Hätten diese Patienten eine eingeschränkte Lymphadenektomie erhalten, wären diese ebenfalls als Lymphknoten-negativ eingestuft worden. Da das Auftreten von Lymphknotenmetastasen selbstverständlich an das Vorhandensein von Lymphknoten gebunden ist, ist es durchaus möglich, dass jene Patienten, die keine Metastasen im ausgedehnten Feld aufwiesen vom therapeutischen Effekt der ausgedehnten Lymphknotenentfernung profitierten.

Prinzipiell kann aus den Ergebnissen der molekularen Untersuchungen allerdings nicht geschlussfolgert werden, ob es sich tatsächlich um disseminierte Tumorzellen und damit eine statt gehabte Metastasierung oder aber nur um zirkulierende Tumorzellen, die sich in

lymphatischen Gefäßen in Lymphknoten aufgehalten haben, handelt. Auch eine Aussage darüber, ob es sich tatsächlich um maligne Zellen handelt ist schwierig, da die in unserer Studie verwendeten Marker epithel- jedoch nicht tumorspezifisch sind. Da allerdings die Verteilung der histopathologisch positiven Lymphknoten (45,2 % der Metastasen außerhalb des eingeschränkten Felds) mit der Verteilung der für KRT17 bzw. SPINK1 positiven Lymphknoten nahezu identisch ist (45,6 % der Metastasen außerhalb des eingeschränkten Feldes), interpretieren wir den molekularen Nachweis einer KRT17 oder SPINK1-Expression als Vorhandensein von disseminierten Tumorzellen in den entsprechenden Lymphknoten. Unsere Ergebnisse können vorherigen Daten zum Nicht-Vorhandensein von Skip-Lesions bei Blasenkarzinompatienten nicht bestätigen, viel mehr unterstreichen sie die Wichtigkeit einer ausgedehnten pelvinen Lymphadenektomie bis hin zur Aortenbifurkation, um einerseits ein korrektes Staging der Patienten und eine damit verbundenen adäquate Therapie wie etwa eine adjuvante Chemotherapie bei Vorhandensein von Lymphknotenmetastasen zu gewährleisten. Andererseits steigt durch eine steigende Zahl an entfernten Lymphknoten auch die Wahrscheinlichkeit, histologisch unentdeckte Metastasen entfernt zu haben, was wiederum in einer besseren Prognose für den Patienten resultieren könnte (Karl et al., 2009; Leissner et al., 2004). Ob die Patienten mit ausgedehnter PLND tatsächlich einen Überlebensvorteil gegenüber den Patienten mit eingeschränkter PLND besitzen, wurde in der LEA-Studie, einer prospektiven Multicenterstudie untersucht. Die Ergebnisse sind noch in Bearbeitung.

7 ZUSAMMENFASSUNG

Das Harnblasenkarzinom ist bei Frauen der häufigste, bei Männern nach dem Prostatakarzinom der zweithäufigste bösartige Tumor des Urogenitalsystems.

Etwa die Hälfte aller Harnblasenkarzinompatienten erliegt innerhalb von 5 Jahren nach Diagnosestellung trotz radikaler Zystektomie und Lymphadenektomie in kurativer Intention ihrem Krebsleiden. Der Grund für ein Tumorrezidiv nach radikaler Zystektomie liegt wahrscheinlich in einer zum Diagnosezeitpunkt bereits vorhandenen okkulten Metastasierung, welche weder durch die präoperativen bildgebenden Verfahren noch durch die routinemäßige histologische Untersuchung der Lymphknoten detektierbar sind. Jene Patienten werden dann fälschlicherweise als metastasenfrei evaluiert und werden daher weder mittels adjuvanter noch neoadjuvanter Chemotherapie behandelt.

Gegenstand dieser Arbeit ist die Untersuchung von Lymphknoten von Patienten mit Urothelkarzinom der Harnblase, welche mit einer radikalen Zystektomie behandelt wurden, auf die Expression urothelspezifischer Marker (Cytokeratin 17 (KRT17), Cytokeratin 20 (KRT20), FXD3, MUC5B, SPINK1 sowie Uroplakin II (UPKII)) mittels quantitativer Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion als Hinweis für disseminierte Tumorzellen im Vergleich zur konventionellen histopathologischen Untersuchung. Zudem erfolgte eine Analyse der Topographie von histopathologisch und molekular nachgewiesenen molekularen Lymphknotenmetastasen bei Patienten mit ausgedehnter Lymphadenektomie. Ob die Patienten mit ausgedehnter PLND einen Überlebensvorteil gegenüber den Patienten mit eingeschränkter PLND besitzen, wurde in der LEA-Studie, einer prospektiven Multicenterstudie untersucht. Die Ergebnisse sind noch in Bearbeitung.

Es wurden insgesamt 2906 Lymphknoten von 86 Blasentumorpatienten entnommen und histopathologisch untersucht. Davon wiederum besaßen 1453 Lymphknoten eine Größe von > 3mm und konnten zusätzlich mittels qRT-PCR auf die Expression der oben genannten Marker untersucht werden. Zur Festlegung der Grenzwerte der sechs Marker dienten 136 histopathologisch negative Lymphknoten von 45 Patienten mit lokal beschränktem Prostatakarzinom, welche auf die basale Expression der Urothelmarker untersucht wurden. Das mittlere Alter der 86 Harnblasenkarzinompatienten zum Zeitpunkt der Operation lag bei 68 Jahren, die Altersspanne reichte von 40 bis 84 Jahre. 12 (14 %) Patienten waren weiblichen Geschlechts, 74 (86 %) Patienten waren Männer. 50 % der Patienten erhielten eine eingeschränkte Lymphadenektomie, 50 % eine ausgedehnte Lymphadenektomie.

Insgesamt konnten 207 von 1453 (14,2 %) Lymphknoten und 48 von 86 (55,8 %) Blasenkarzinompatienten mit mindestens einem der 6 Marker als molekular positiv beurteilt (molN1) werden. Bei 80 (5,5 %) Lymphknoten bzw. 20 (23,3 %) Patienten war nur ein Marker positiv.

164 Lymphknoten bzw. 30 Patienten zeigten nur in der molekularbiologischen Lymphknotenuntersuchung ein positives Ergebnis (pN0/molN1) und 43 Lymphknoten von 18 Patienten wurden sowohl histopathologisch als auch molekularbiologisch als positiv bewertet (pN1/molN1).

Bei 45 histopathologisch nachgewiesenen Lymphknotenmetastasen von 18 Patienten, welche auch molekularbiologisch untersucht wurden, wurden zwei (4,4 %) Lymphknotenmetastasen von einem Patienten durch keinen der sechs Marker molekularbiologisch als positiv bewertet. Allerdings hatten diese Patienten zusätzlich molekular positive Lymphknoten, so dass bei der Patienten-basierten Auswertung alle Patienten mit histopathologisch positiven Lymphknoten auch als molekularbiologisch positiv gewertet werden konnten.

Bei der Topographie von Lymphknotenmetastasen beschränkten wir uns auf die Gruppe von 43 Patienten, welche eine erweiterte Lymphadenektomie erhielten. Ausgewertet wurden 882 Lymphknoten, welche mit beiden Methoden untersucht wurden.

Insgesamt wurden 31 von 43 (72,1 %) der Patienten entweder durch die Histopathologie oder Molekularbiologie als lymphknotenpositiv beurteilt. Bei 19 der 31 (61,3 %) lymphknotenpositiven Patienten konnten ausschließlich im eingeschränkten Lymphadenektomiefeld Lymphknotenmetastasen nachgewiesen werden. 7 der 31 (22,6 %) lymphknotenpositiven Patienten besaßen ausschließlich außerhalb des eingeschränkten Lymphadenektomiefelds Lymphknotenmetastasen. Hätten diese Patienten eine eingeschränkte Lymphadenektomie erhalten, wären sie fälschlicherweise als Lymphknoten-negativ eingestuft worden

Prinzipiell kann aus den Ergebnissen der molekularen Untersuchungen allerdings nicht geschlussfolgert werden, ob es sich tatsächlich um disseminierte Tumorzellen und damit eine statt gehabte Metastasierung oder aber nur um zirkulierende Tumorzellen, die sich in lymphatischen Gefäßen in Lymphknoten aufgehalten haben, handelt. Auch eine Aussage darüber, ob es sich tatsächlich um maligne Zellen handelt, ist schwierig, da die in unserer Studie verwendeten Marker urothel- jedoch nicht tumorspezifisch sind. Die Bedeutung der molekularen Lymphknotenmetastasendetektion für die Prognose ist ein wichtiger Bestandteil der Studie und wird im weiteren Verlauf durch die Nachsorgeerhebung und die Korrelation mit Tumorrezidiv und Gesamtüberleben der Studienteilnehmer evaluiert.

Unsere Ergebnisse unterstreichen die Wichtigkeit einer ausgedehnten pelvinen Lymphadenektomie bis hin zur Aortenbifurkation, um einerseits ein korrektes Staging der Patienten und eine damit verbundenen adäquate Therapie wie etwa eine adjuvante Chemotherapie bei Vorhandensein von Lymphknotenmetastasen zu gewährleisten. Andererseits steigt durch eine steigende Zahl an entfernten Lymphknoten auch die

Wahrscheinlichkeit, histologisch unentdeckte Metastasen entfernt zu haben, was wiederum in einer besseren Prognose für den Patienten resultieren könnte.

8 LITERATURVERZEICHNIS

- H. Abol-Enein, M. El-Baz, M. A. Abd El-Hameed, M. Abdel-Latif, and M. A. Ghoneim, 'Lymph Node Involvement in Patients with Bladder Cancer Treated with Radical Cystectomy: A Patho-Anatomical Study--a Single Center Experience', *J Urol*, 172 (2004), 1818-21.
- M. Autenrieth, R. Nawroth, S. Semmlack, J. E. Gschwend, and M. Retz, '[Muscle-Invasive Urothelial Carcinoma of the Bladder. Detection and Topography of Micrometastases in Lymph Nodes]', *Urologe A*, 47 (2008), 1157-61.
- M. Autenrieth, M. Retz, and J. E. Gschwend, '[the Significance of Extended Pelvic Lymphadenectomy in Bladder Cancer]', *Urologe A*, 50 (2011), 1591-4.
- M. Babjuk, Oosterlinck', W., Sylvester, R., , 'Guidelines - European Association of Urology', 2012 edition (2012), 58-74.
- M. Balic, A. Williams, N. Dandachi, and R. J. Cote, 'Micrometastasis: Detection Methods and Clinical Importance', *Cancer Biomark*, 9 (2010), 397-419.
- Applied Biosystems, 'Einführung in Die Real-Time Taqman^a Pcr-Technologie', (Germany - Weiterstadt).
- B. H. Bochner, D. Cho, H. W. Herr, M. Donat, M. W. Kattan, and G. Dalbagni, 'Prospectively Packaged Lymph Node Dissections with Radical Cystectomy: Evaluation of Node Count Variability and Node Mapping', *J Urol*, 172 (2004), 1286-90.
- A. J. Bosma, B. Weigelt, A. C. Lambrechts, O. J. Verhagen, R. Pruntel, A. A. Hart, S. Rodenhuis, and L. J. van 't Veer, 'Detection of Circulating Breast Tumor Cells by Differential Expression of Marker Genes', *Clin Cancer Res*, 8 (2002), 1871-7.
- P. J. Bostick, D. L. Morton, R. R. Turner, K. T. Huynh, H. J. Wang, R. Elashoff, R. Essner, and D. S. Hoon, 'Prognostic Significance of Occult Metastases Detected by Sentinel Lymphadenectomy and Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction in Early-Stage Melanoma Patients', *J Clin Oncol*, 17 (1999), 3238-44.
- M. F. Botteman, C. L. Pashos, A. Redaelli, B. Laskin, and R. Hauser, 'The Health Economics of Bladder Cancer: A Comprehensive Review of the Published Literature', *Pharmacoeconomics*, 21 (2003), 1315-30.
- G. Branagan, D. Hughes, M. Jeffrey, C. Crane-Robinson, and P. M. Perry, 'Detection of Micrometastases in Lymph Nodes from Patients with Breast Cancer', *Br J Surg*, 89 (2002), 86-9.
- P. Brennan, 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, 'Cigarette Smoking and Bladder Cancer in Men: A Pooled Analysis of 11 Case-Control Studies', *Int J Cancer*, 86 (2000), 289-94.
- J. Byrne, P. G. Horgan, S. England, J. Callaghan, and H. F. Given, 'A Preliminary Report on the Usefulness of Monoclonal Antibodies to Ca 15-3 and Mca in the Detection of Micrometastases in Axillary Lymph Nodes Draining Primary Breast Carcinoma', *Eur J Cancer*, 28 (1992), 658-60.
- S. Calmels, H. Ohshima, P. Vincent, A. M. Gounot, and H. Bartsch, 'Screening of Microorganisms for Nitrosation Catalysis at Ph 7 and Kinetic Studies on Nitrosamine Formation from Secondary Amines by E. Coli Strains', *Carcinogenesis*, 6 (1985), 911-5.
- A. J. Carmack, and M. S. Soloway, 'The Diagnosis and Staging of Bladder Cancer: From Rbcs to Turs', *Urology*, 67 (2006), 3-8; discussion 8-10.
- M. Castillo-Martin, J. Domingo-Domenech, O. Karni-Schmidt, T. Matos, and C. Cordon-Cardo, 'Molecular Pathways of Urothelial Development and Bladder Tumorigenesis', *Urol Oncol*, 28 (2010), 401-8.
- A. F. Chambers, G. N. Naumov, H. J. Varghese, K. V. Nadkarni, I. C. MacDonald, and A. C. Groom, 'Critical Steps in Hematogenous Metastasis: An Overview', *Surg Oncol Clin N Am*, 10 (2001), 243-55, vii.

- P. Chomczynski, and N. Sacchi, 'Single-Step Method of Rna Isolation by Acid Guanidinium Thiocyanate-Phenol-Chloroform Extraction', *Anal Biochem*, 162 (1987), 156-9.
- J. S. Colt, M. R. Karagas, M. Schwenn, D. Baris, A. Johnson, P. Stewart, C. Verrill, L. E. Moore, J. Lubin, M. H. Ward, C. Samanic, N. Rothman, K. P. Cantor, L. E. Beane Freeman, A. Schned, S. Cherala, and D. T. Silverman, 'Occupation and Bladder Cancer in a Population-Based Case-Control Study in Northern New England', *Occup Environ Med*, 68 (2011), 239-49.
- H. L. Copp, J. L. Chin, M. Conaway, and D. Theodorescu, 'Prospective Evaluation of the Prognostic Relevance of Molecular Staging for Urothelial Carcinoma', *Cancer*, 107 (2006), 60-6.
- R. J. Cote, H. F. Peterson, B. Chaiwun, R. D. Gelber, A. Goldhirsch, M. Castiglione-Gertsch, B. Gusterson, and A. M. Neville, 'Role of Immunohistochemical Detection of Lymph-Node Metastases in Management of Breast Cancer. International Breast Cancer Study Group', *Lancet*, 354 (1999), 896-900.
- S. Dango, X. T. Wang, M. Gold, B. Cucuruz, C. A. Klein, B. Passlick, and W. Siemel, 'Expression of Melanoma-Antigen-a (MAGE-a) in Disseminated Tumor Cells in Regional Lymph Nodes of Patients with Operable Non-Small Cell Lung Cancer', *Lung Cancer*, 67 (2010), 290-5.
- D. J. DeGraff, and P. E. Clark, 'Detection of Tumor Cells in the Bone Offers Independent Prognostic Value in Bladder Cancer Patients: The Clinical and Basic Science Perspective', *Eur Urol*, 60 (2011), 239-40.
- N. B. Dhar, E. A. Klein, A. M. Reuther, G. N. Thalmann, S. Madersbacher, and U. E. Studer, 'Outcome after Radical Cystectomy with Limited or Extended Pelvic Lymph Node Dissection', *J Urol*, 179 (2008), 873-8; discussion 78.
- S. Dhayat, S. Sorescu, D. Vallbohmer, S. Kraus, S. E. Baldus, A. Rehders, F. Kropil, A. Krieg, W. T. Knoefel, and N. H. Stoecklein, 'Prognostic Significance of Epcam-Positive Disseminated Tumor Cells in Rectal Cancer Patients with Stage I Disease', *Am J Surg Pathol*, 36 (2012), 1809-16.
- C. P. Diggle, S. Cruickshank, J. D. Olsburgh, S. Pellegrin, B. Smith, R. E. Banks, P. J. Selby, M. A. Knowles, J. Southgate, and P. Harnden, 'Identification of Genes up-Regulated in Urothelial Tumors: The 67-Kd Laminin Receptor and Tumor-Associated Trypsin Inhibitor', *Am J Pathol*, 163 (2003), 493-504.
- R. E. Dorfman, M. B. Alpern, B. H. Gross, and M. A. Sandler, 'Upper Abdominal Lymph Nodes: Criteria for Normal Size Determined with Ct', *Radiology*, 180 (1991), 319-22.
- F. Dorp, Kausch, Ingo, Jocham, Dieter, 'Diagnostik Und Therapie Des Nichtinvasiven Harnblasenkarzinoms: Teil 2 Der Serie Zum Harnblasenkarzinom', *Dtsch Arztebl*, 104(12) (2007).
- J. Eble, Sauter, G., Epstein, J., Sesterkenn, I.A., 'World Helath Organisation Classification of Tumours - Pathology and Genetics of Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs', (2004), 90-108.
- S. El-Shazli, H. Anwar, S. Ramzy, and M. Al-Didi, 'Extended Lymphadenectomy to the Lower Paraaortic Nodes During Radical Cystectomy', *J Egypt Natl Canc Inst*, 16 (2004), 22-8.
- W. V. Fairchild, C. R. Spence, H. D. Solomon, and M. P. Gangai, 'The Incidence of Bladder Cancer after Cyclophosphamide Therapy', *J Urol*, 122 (1979), 163-4.
- T. W. Flaig, S. Wilson, A. van Bokhoven, M. Varella-Garcia, P. Wolfe, P. Maroni, E. E. Genova, D. Morales, and M. S. Lucia, 'Detection of Circulating Tumor Cells in Metastatic and Clinically Localized Urothelial Carcinoma', *Urology*, 78 (2011), 863-7.
- N. D. Freedman, D. T. Silverman, A. R. Hollenbeck, A. Schatzkin, and C. C. Abnet, 'Association between Smoking and Risk of Bladder Cancer among Men and Women', *JAMA*, 306 (2011), 737-45.
- D. Frohneber, 'Muskelinvasives Harnblasenkarzinom', *deutsches Ärzteblatt* (2007), 868-72.
- Y. Fujii, Y. Kageyama, S. Kawakami, K. Kihara, and H. Oshima, 'Detection of Disseminated Urothelial Cancer Cells in Peripheral Venous Blood by a Cytokeratin 20-Specific Nested Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction', *Jpn J Cancer Res*, 90 (1999), 753-7.

- M. Fukayama, Y. Hayashi, M. Koike, M. Ogawa, and G. Kosaki, 'Immunohistochemical Localization of Pancreatic Secretory Trypsin Inhibitor in Fetal and Adult Pancreatic and Extrapancreatic Tissues', *J Histochem Cytochem*, 34 (1986), 227-35.
- C. Gazquez, M. J. Ribal, M. Marin-Aguilera, H. Kayed, P. L. Fernandez, L. Mengual, and A. Alcaraz, 'Biomarkers Vs Conventional Histological Analysis to Detect Lymph Node Micrometastases in Bladder Cancer: A Real Improvement?', *BJU Int* (2012).
- C. Gazquez, M. J. Ribal, M. Marin-Aguilera, H. Kayed, P. L. Fernandez, L. Mengual, and A. Alcaraz, 'Biomarkers Vs Conventional Histological Analysis to Detect Lymph Node Micrometastases in Bladder Cancer: A Real Improvement?', *BJU Int*, 110 (2012), 1310-6.
- P. Gazzaniga, O. Gandini, L. Giuliani, M. Magnanti, A. Gradilone, I. Silvestri, W. Gianni, M. Gallucci, L. Frati, and A. M. Agliano, 'Detection of Epidermal Growth Factor Receptor Mrna in Peripheral Blood: A New Marker of Circulating Neoplastic Cells in Bladder Cancer Patients', *Clin Cancer Res*, 7 (2001), 577-83.
- M. J. Ge, Q. C. Wu, M. Wang, Y. H. Zhang, and L. B. Li, 'Detection of Disseminated Lung Cancer Cells in Regional Lymph Nodes by Assay of Ck19 Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction and Its Clinical Significance', *J Cancer Res Clin Oncol*, 131 (2005), 662-8.
- K. Geering, 'Fxyd Proteins: New Regulators of Na-K-ATPase', *Am J Physiol Renal Physiol*, 290 (2006), F241-50.
- M. A. Ghoneim, M. Abdel-Latif, M. el-Mekresh, H. Abol-Enein, A. Mosbah, A. Ashamallah, and M. A. el-Baz, 'Radical Cystectomy for Carcinoma of the Bladder: 2,720 Consecutive Cases 5 Years Later', *J Urol*, 180 (2008), 121-7.
- R. A. Ghossein, and S. Bhattacharya, 'Molecular Detection and Characterisation of Circulating Tumour Cells and Micrometastases in Solid Tumours', *Eur J Cancer*, 36 (2000), 1681-94.
- J. L. Gore, J. Lai, C. M. Setodji, M. S. Litwin, C. S. Saigal, and Project Urologic Diseases in America, 'Mortality Increases When Radical Cystectomy Is Delayed More Than 12 Weeks: Results from a Surveillance, Epidemiology, and End Results-Medicare Analysis', *Cancer*, 115 (2009), 988-96.
- M. A. Gorin, R. Ayyathurai, and M. S. Soloway, 'Diagnosis and Treatment of Bladder Cancer: How Can We Improve?', *Postgrad Med*, 124 (2012), 28-36.
- Page Greene, Fleming, *Ajcc Cancer Staging Manual, Sixth Edition* (Springer Verlag, 2002).
- G. D. Grossfeld, J. S. Wolf, Jr., M. S. Litwin, H. Hricak, C. L. Shuler, D. C. Agerter, and P. R. Carroll, 'Asymptomatic Microscopic Hematuria in Adults: Summary of the AUA Best Practice Policy Recommendations', *Am Fam Physician*, 63 (2001), 1145-54.
- C. J. Gudemann, J. Weitz, P. Kienle, J. Lacroix, M. J. Wiesel, M. Soder, A. Benner, G. Staehler, and M. V. Doeberitz, 'Detection of Hematogenous Micrometastasis in Patients with Transitional Cell Carcinoma', *J Urol*, 164 (2000), 532-6.
- T. Habuchi, M. Marberger, M. J. Droller, G. P. Hemstreet, 3rd, H. B. Grossman, J. A. Schalken, B. J. Schmitz-Drager, W. M. Murphy, A. V. Bono, P. Goebell, R. H. Getzenberg, S. H. Hautmann, E. Messing, Y. Fradet, and V. B. Lokeshwar, 'Prognostic Markers for Bladder Cancer: International Consensus Panel on Bladder Tumor Markers', *Urology*, 66 (2005), 64-74.
- R. E. Hautmann, H. Abol-Enein, K. Hafez, I. Haro, W. Mansson, R. D. Mills, J. D. Montie, A. I. Sagalowsky, J. P. Stein, A. Stenzl, U. E. Studer, and B. G. Volkmer, 'Urinary Diversion', *Urology*, 69 (2007), 17-49.
- R. E. Hautmann, J. E. Gschwend, R. C. de Petriconi, M. Kron, and B. G. Volkmer, 'Cystectomy for Transitional Cell Carcinoma of the Bladder: Results of a Surgery Only Series in the Neobladder Era', *J Urol*, 176 (2006), 486-92; discussion 91-2.
- X. He, L. Marchionni, D. E. Hansel, W. Yu, A. Sood, J. Yang, G. Parmigiani, W. Matsui, and D. M. Berman, 'Differentiation of a Highly Tumorigenic Basal Cell Compartment in Urothelial Carcinoma', *Stem Cells*, 27 (2009), 1487-95.
- P. Hermanek, 'Disseminated Tumor Cells Versus Micrometastasis: Definitions and Problems', *Anticancer Res*, 19 (1999), 2771-4.

- I. Honma, N. Masumori, E. Sato, T. Maeda, M. Hirobe, H. Kitamura, A. Takahashi, N. Itoh, M. Tamakawa, and T. Tsukamoto, 'Removal of More Lymph Nodes May Provide Better Outcome, as Well as More Accurate Pathologic Findings, in Patients with Bladder Cancer--Analysis of Role of Pelvic Lymph Node Dissection', *Urology*, 68 (2006), 543-8.
- Florian Horn, *Biochemie Des Menschen* (2005).
- H. Huland, Friedrich, M., 'Harnblasenkarzinom', in *Urologie* (Hautmann, H., , 2006), pp. 202-12.
- Invitrogen, 'Ta Cloning® Kit', (2004).
- G. J. Jager, J. O. Barentsz, G. O. Oosterhof, J. A. Witjes, and S. J. Ruijs, 'Pelvic Adenopathy in Prostatic and Urinary Bladder Carcinoma: Mr Imaging with a Three-Dimensional T1-Weighted Magnetization-Prepared-Rapid Gradient-Echo Sequence', *AJR Am J Roentgenol*, 167 (1996), 1503-7.
- J. B. Jensen, S. Hoyer, and K. M. Jensen, 'Incidence of Occult Lymph-Node Metastasis Missed by Standard Pathological Examination in Patients with Bladder Cancer Undergoing Radical Cystectomy', *Scand J Urol Nephrol*, 45 (2011), 419-24.
- J. B. Jensen, B. P. Ulhoi, and K. M. Jensen, 'Lymph Node Mapping in Patients with Bladder Cancer Undergoing Radical Cystectomy and Lymph Node Dissection to the Level of the Inferior Mesenteric Artery', *BJU Int*, 106 (2010), 199-205.
- D. Jocham, H. Stepp, and R. Waidelich, 'Photodynamic Diagnosis in Urology: State-of-the-Art', *Eur Urol*, 53 (2008), 1138-48.
- A. Karl, P. R. Carroll, J. E. Gschwend, R. Knuchel, F. Montorsi, C. G. Stief, and U. E. Studer, 'The Impact of Lymphadenectomy and Lymph Node Metastasis on the Outcomes of Radical Cystectomy for Bladder Cancer', *Eur Urol*, 55 (2009), 826-35.
- A. Kataoka, M. Mori, N. Sadanaga, H. Ueo, K. Tsuji, Y. Rai, G. F. Barnard, and K. Sugimachi, 'Rt-Pcr Detection of Breast Cancer Cells in Sentinel Lymph Modes', *Int J Oncol*, 16 (2000), 1147-52.
- E. Kelloniemi, E. Rintala, P. Finne, U. H. Stenman, and Group Finnbladder, 'Tumor-Associated Trypsin Inhibitor as a Prognostic Factor During Follow-up of Bladder Cancer', *Urology*, 62 (2003), 249-53.
- J. K. Kim, S. Y. Park, H. J. Ahn, C. S. Kim, and K. S. Cho, 'Bladder Cancer: Analysis of Multi-Detector Row Helical Ct Enhancement Pattern and Accuracy in Tumor Detection and Perivesical Staging', *Radiology*, 231 (2004), 725-31.
- M. Kinjo, T. Okegawa, S. Horie, K. Nutahara, and E. Higashihara, 'Detection of Circulating Muc7-Positive Cells by Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction in Bladder Cancer Patients', *Int J Urol*, 11 (2004), 38-43.
- A. Klein, R. Zemer, V. Buchumensky, R. Klaper, and I. Nissenkorn, 'Expression of Cytokeratin 20 in Urinary Cytology of Patients with Bladder Carcinoma', *Cancer*, 82 (1998), 349-54.
- C. A. Klein, 'Parallel Progression of Primary Tumours and Metastases', *Nat Rev Cancer*, 9 (2009), 302-12.
- B. R. Konety, and R. H. Getzenberg, 'Urine Based Markers of Urological Malignancy', *J Urol*, 165 (2001), 600-11.
- H. Kuper, P. Boffetta, and H. O. Adami, 'Tobacco Use and Cancer Causation: Association by Tumour Type', *J Intern Med*, 252 (2002), 206-24.
- T. Kurahashi, I. Hara, N. Oka, S. Kamidono, H. Eto, and H. Miyake, 'Detection of Micrometastases in Pelvic Lymph Nodes in Patients Undergoing Radical Cystectomy for Locally Invasive Bladder Cancer by Real-Time Reverse Transcriptase-Pcr for Cytokeratin 19 and Uroplakin Ii', *Clin Cancer Res*, 11 (2005), 3773-7.
- J. Lehmann, Retz, M., *Blasenkarzinom* (Springer Medizin Verlag, 2005).
- J. Leissner, M. A. Ghoneim, H. Abol-Enein, J. W. Thuroff, L. Franzaring, M. Fisch, H. Schulze, G. Managadze, E. P. Allhoff, M. A. el-Baz, H. Kastendieck, P. Buhtz, S. Kropf, R. Hohenfellner, and H. K. Wolf, 'Extended Radical Lymphadenectomy in Patients with Urothelial Bladder Cancer: Results of a Prospective Multicenter Study', *J Urol*, 171 (2004), 139-44.

- J. Leissner, R. Hohenfellner, J. W. Thuroff, and H. K. Wolf, 'Lymphadenectomy in Patients with Transitional Cell Carcinoma of the Urinary Bladder; Significance for Staging and Prognosis', *BJU Int*, 85 (2000), 817-23.
- S. M. Li, Z. T. Zhang, S. Chan, O. McLenan, C. Dixon, S. Taneja, H. Lepor, T. T. Sun, and X. R. Wu, 'Detection of Circulating Uroplakin-Positive Cells in Patients with Transitional Cell Carcinoma of the Bladder', *J Urol*, 162 (1999), 931-5.
- F. Liedberg, G. Chebil, T. Davidsson, S. Gudjonsson, and W. Mansson, 'Intraoperative Sentinel Node Detection Improves Nodal Staging in Invasive Bladder Cancer', *J Urol*, 175 (2006), 84-8; discussion 88-9.
- G. J. Liefers, A. M. Cleton-Jansen, C. J. van de Velde, J. Hermans, J. H. van Krieken, C. J. Cornelisse, and R. A. Tollenaar, 'Micrometastases and Survival in Stage II Colorectal Cancer', *N Engl J Med*, 339 (1998), 223-8.
- E. D. Lobban, B. A. Smith, G. D. Hall, P. Harnden, P. Roberts, P. J. Selby, L. K. Trejdosiewicz, and J. Southgate, 'Uroplakin Gene Expression by Normal and Neoplastic Human Urothelium', *Am J Pathol*, 153 (1998), 1957-67.
- J. J. Lu, Y. Kakehi, T. Takahashi, X. X. Wu, T. Yuasa, T. Yoshiki, Y. Okada, T. Terachi, and O. Ogawa, 'Detection of Circulating Cancer Cells by Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction for Uroplakin II in Peripheral Blood of Patients with Urothelial Cancer', *Clin Cancer Res*, 6 (2000), 3166-71.
- S. Madersbacher, W. Hochreiter, F. Burkhard, G. N. Thalmann, H. Danuser, R. Markwalder, and U. E. Studer, 'Radical Cystectomy for Bladder Cancer Today--a Homogeneous Series without Neoadjuvant Therapy', *J Clin Oncol*, 21 (2003), 690-6.
- T. Majima, T. Ichikura, E. Takayama, K. Chochi, and H. Mochizuki, 'Detecting Circulating Cancer Cells Using Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction for Cytokeratin Mrna in Peripheral Blood from Patients with Gastric Cancer', *Jpn J Clin Oncol*, 30 (2000), 499-503.
- M. Marin-Aguilera, L. Mengual, M. Burset, A. Oliver, E. Ars, M. J. Ribal, D. Colomer, B. Mellado, H. Villavicencio, F. Algaba, and A. Alcaraz, 'Molecular Lymph Node Staging in Bladder Urothelial Carcinoma: Impact on Survival', *Eur Urol*, 54 (2008), 1363-72.
- M. Marin-Aguilera, L. Mengual, M. J. Ribal, E. Ars, J. Rios, C. Gazquez, H. Villavicencio, and A. Alcaraz, 'Utility of Urothelial Mrna Markers in Blood for Staging and Monitoring Bladder Cancer', *Urology*, 79 (2012), 240 e9-15.
- M. May, E. Herrmann, C. Bolenz, A. Tiemann, S. Brookman-May, H. M. Fritsche, M. Burger, A. Buchner, C. Gratzke, C. Wulfing, L. Trojan, J. Ellinger, D. Tilki, C. Gilfrich, T. Hofner, J. Roigas, M. Zacharias, S. Gunia, W. F. Wieland, M. Hohenfellner, M. S. Michel, A. Haferkamp, S. C. Muller, C. G. Stief, and P. J. Bastian, 'Lymph Node Density Affects Cancer-Specific Survival in Patients with Lymph Node-Positive Urothelial Bladder Cancer Following Radical Cystectomy', *Eur Urol*, 59 (2011), 712-8.
- M. McCredie, J. H. Stewart, J. M. Ford, and R. A. MacLennan, 'Phenacetin-Containing Analgesics and Cancer of the Bladder or Renal Pelvis in Women', *Br J Urol*, 55 (1983), 220-4.
- H. Miyake, I. Hara, T. Kurahashi, T. A. Inoue, H. Eto, and M. Fujisawa, 'Quantitative Detection of Micrometastases in Pelvic Lymph Nodes in Patients with Clinically Localized Prostate Cancer by Real-Time Reverse Transcriptase-Pcr', *Clin Cancer Res*, 13 (2007), 1192-7.
- R. Moll, A. Lowe, J. Laufer, and W. W. Franke, 'Cytokeratin 20 in Human Carcinomas. A New Histodiagnostic Marker Detected by Monoclonal Antibodies', *Am J Pathol*, 140 (1992), 427-47.
- R. Moll, D. L. Schiller, and W. W. Franke, 'Identification of Protein It of the Intestinal Cytoskeleton as a Novel Type I Cytokeratin with Unusual Properties and Expression Patterns', *J Cell Biol*, 111 (1990), 567-80.
- B. W. Morrison, J. R. Moorman, G. C. Kowdley, Y. M. Kobayashi, L. R. Jones, and P. Leder, 'Mat-8, a Novel Phospholemmann-Like Protein Expressed in Human Breast Tumors, Induces a Chloride Conductance in *Xenopus* Oocytes', *J Biol Chem*, 270 (1995), 2176-82.

- M. Müller, 'Neue Diagnostische Und Therapeutische Möglichkeiten Im Fachgebiet Urologie', *Med. Habilitationsschrift, Berlin* (1999).
- NCBI, 'Upk2 Uroplakin 2 [Homo Sapiens] '.
- A. M. Neville, R. Bettelheim, R. D. Gelber, and A. Goldhirsch, 'Occult Axillary Lymph-Node Micrometastases in Breast Cancer', *Lancet*, 336 (1990), 759.
- Clive Newton, 'The Elimination of Primer-Dimer Accumulation in Pcr', *Nucleic Acids Res* (1997).
- T. Okegawa, M. Kinjo, K. Nutahara, and E. Higashihara, 'Value of Reverse Transcription Polymerase Chain Assay in Peripheral Blood of Patients with Urothelial Cancer', *J Urol*, 171 (2004), 1461-6.
- I. Osman, M. Kang, A. Lee, F. M. Deng, D. Polsky, M. Mikhail, C. Chang, D. A. David, N. Mitra, X. R. Wu, T. T. Sun, and D. F. Bajorin, 'Detection of Circulating Cancer Cells Expressing Uroplakins and Epidermal Growth Factor Receptor in Bladder Cancer Patients', *Int J Cancer*, 111 (2004), 934-9.
- P. Patel, and E. I. Chen, 'Cancer Stem Cells, Tumor Dormancy, and Metastasis', *Front Endocrinol (Lausanne)*, 3 (2012), 125.
- D. Pectasides, D. Bafaloucos, F. Antoniou, L. Gogou, N. Economides, J. Varthalitis, M. Dimitriades, P. Kosmidis, and A. Athanassiou, 'Tpa, Tati, Cea, Afp, Beta-Hcg, Psa, Scc, and Ca 19-9 for Monitoring Transitional Cell Carcinoma of the Bladder', *Am J Clin Oncol*, 19 (1996), 271-7.
- T. J. Pelkey, H. F. Frierson, Jr., and D. E. Bruns, 'Molecular and Immunological Detection of Circulating Tumor Cells and Micrometastases from Solid Tumors', *Clin Chem*, 42 (1996), 1369-81.
- M.W. Pfaffl, 'Real-Time Rt-Pcr: Neue Ansätze Zur Exakten Mrna Quantifizierung', *Biospectrum* (2004), 92-95.
- A. L. Poulsen, T. Horn, and K. Steven, 'Radical Cystectomy: Extending the Limits of Pelvic Lymph Node Dissection Improves Survival for Patients with Bladder Cancer Confined to the Bladder Wall', *J Urol*, 160 (1998), 2015-9; discussion 20.
- J. Rassow, *Biochemie - Duale Reihe* (2006).
- M. Retz, J. Lehmann, C. Roder, K. Weichert-Jacobsen, T. Loch, E. Romahn, C. Luhl, H. Kalthoff, and M. Stockle, 'Cytokeratin-20 Reverse-Transcriptase Polymerase Chain Reaction as a New Tool for the Detection of Circulating Tumor Cells in Peripheral Blood and Bone Marrow of Bladder Cancer Patients', *Eur Urol*, 39 (2001), 507-15; discussion 16-7.
- M. Retz, J. Rotering, R. Nawroth, A. Buchner, M. Stockle, J. E. Gschwend, and J. Lehmann, 'Long-Term Follow-up of Bladder Cancer Patients with Disseminated Tumour Cells in Bone Marrow', *Eur Urol*, 60 (2011), 231-8.
- M. J. Ribal, L. Mengual, M. Marin, F. Algaba, E. Ars, P. L. Fernandez, R. Oliva, H. Villavicencio, and A. Alcaraz, 'Molecular Staging of Bladder Cancer with Rt-Pcr Assay for Ck20 in Peripheral Blood, Bone Marrow and Lymph Nodes: Comparison with Standard Histological Staging', *Anticancer Res*, 26 (2006), 411-9.
- M. Rink, K. Park, B. G. Volkmer, E. Xylinas, J. Hansen, E. K. Cha, B. D. Robinson, R. Hautmann, R. Kufer, O. Engel, F. K. Chun, R. Dahlem, M. A. Rubin, S. F. Shariat, and J. M. Mosquera, 'Loss of Spink1 Expression Is Associated with Unfavorable Outcomes in Urothelial Carcinoma of the Bladder after Radical Cystectomy', *Urol Oncol* (2012).
- Robert Koch Institut, 'Krebs in Deutschland - 2007/2008', (2012).
- Rübber H., *Uroonkologie* (2009).
- A. Sherif, M. De La Torre, P. U. Malmstrom, and M. Thorn, 'Lymphatic Mapping and Detection of Sentinel Nodes in Patients with Bladder Cancer', *J Urol*, 166 (2001), 812-5.
- E. V. Shvetsov, '[Anatomy and Topography of External Iliac Lymph Nodes in Adults]', *Arkh Anat Gistol Embriol*, 100 (1991), 50-7.
- S. E. Singletary, F. L. Greene, and L. H. Sobin, 'Classification of Isolated Tumor Cells: Clarification of the 6th Edition of the American Joint Committee on Cancer Staging Manual', *Cancer*, 98 (2003), 2740-1.

- L.H. Sobin, Gospodariwicz, M., , and C. Wittekind, 'Tnm Classification of Malignant Tumors. Uicc International Union against Cancer. 7th Edn.', *Wiley-Blackwell* (2010), 262-65.
- M. S. Sosa, P. Bragado, J. Debnath, and J. A. Aguirre-Ghiso, 'Regulation of Tumor Cell Dormancy by Tissue Microenvironments and Autophagy', *Adv Exp Med Biol*, 734 (2013), 73-89.
- A. Stathopoulou, I. Vlachonikolis, D. Mavroudis, M. Perraki, Ch Kouroussis, S. Apostolaki, N. Malamos, S. Kakolyris, A. Kotsakis, N. Xenidis, D. Reppa, and V. Georgoulis, 'Molecular Detection of Cytokeratin-19-Positive Cells in the Peripheral Blood of Patients with Operable Breast Cancer: Evaluation of Their Prognostic Significance', *J Clin Oncol*, 20 (2002), 3404-12.
- J. P. Stein, G. Lieskovsky, R. Cote, S. Groshen, A. C. Feng, S. Boyd, E. Skinner, B. Bochner, D. Thangathurai, M. Mikhail, D. Raghavan, and D. G. Skinner, 'Radical Cystectomy in the Treatment of Invasive Bladder Cancer: Long-Term Results in 1,054 Patients', *J Clin Oncol*, 19 (2001), 666-75.
- J. P. Stein, and D. G. Skinner, 'Radical Cystectomy for Invasive Bladder Cancer: Long-Term Results of a Standard Procedure', *World J Urol*, 24 (2006), 296-304.
- J. P. Stein, and D. G. Skinner, 'The Role of Lymphadenectomy in High-Grade Invasive Bladder Cancer', *Urol Clin North Am*, 32 (2005), 187-97.
- C. N. Sternberg, and N. J. Vogelzang, 'Gemcitabine, Paclitaxel, Pemetrexed and Other Newer Agents in Urothelial and Kidney Cancers', *Crit Rev Oncol Hematol*, 46 Suppl (2003), S105-15.
- K. Steven, and A. L. Poulsen, 'Radical Cystectomy and Extended Pelvic Lymphadenectomy: Survival of Patients with Lymph Node Metastasis above the Bifurcation of the Common Iliac Vessels Treated with Surgery Only', *J Urol*, 178 (2007), 1218-23; discussion 23-4.
- M. Suzuki, E. S. Mose, V. Montel, and D. Tarin, 'Dormant Cancer Cells Retrieved from Metastasis-Free Organs Regain Tumorigenic and Metastatic Potency', *Am J Pathol*, 169 (2006), 673-81.
- K. J. Sweadner, and E. Rael, 'The Fxyd Gene Family of Small Ion Transport Regulators or Channels: Cdna Sequence, Protein Signature Sequence, and Expression', *Genomics*, 68 (2000), 41-56.
- A. Takahashi, T. Tsukamoto, K. Tobisu, N. Shinohara, K. Sato, Y. Tomita, S. Komatsubara, O. Nishizawa, T. Igarashi, H. Fujimoto, H. Nakazawa, H. Komatsu, Y. Sugimura, Y. Ono, M. Kuroda, O. Ogawa, Y. Hirao, T. Hayashi, T. Tsushima, Y. Kakehi, Y. Arai, S. Ueda, and M. Nakagawa, 'Radical Cystectomy for Invasive Bladder Cancer: Results of Multi-Institutional Pooled Analysis', *Jpn J Clin Oncol*, 34 (2004), 14-9.
- R. Thurairaja, U. E. Studer, and F. C. Burkhard, 'Indications, Extent, and Benefits of Pelvic Lymph Node Dissection for Patients with Bladder and Prostate Cancer', *Oncologist*, 14 (2009), 40-51.
- S. M. Troyanovsky, R. E. Leube, and W. W. Franke, 'Characterization of the Human Gene Encoding Cytokeratin 17 and Its Expression Pattern', *Eur J Cell Biol*, 59 (1992), 127-37.
- P. O. Van Trappen, V. G. Gyselman, D. G. Lowe, A. Ryan, D. H. Oram, P. Bosze, A. R. Weekes, J. H. Shepherd, S. Dorudi, S. A. Bustin, and I. J. Jacobs, 'Molecular Quantification and Mapping of Lymph-Node Micrometastases in Cervical Cancer', *Lancet*, 357 (2001), 15-20.
- A. Vazina, D. Dugi, S. F. Shariat, J. Evans, R. Link, and S. P. Lerner, 'Stage Specific Lymph Node Metastasis Mapping in Radical Cystectomy Specimens', *J Urol*, 171 (2004), 1830-4.
- L. E. Vinall, A. S. Hill, P. Pigny, W. S. Pratt, N. Toribara, J. R. Gum, Y. S. Kim, N. Porchet, J. P. Aubert, and D. M. Swallow, 'Variable Number Tandem Repeat Polymorphism of the Mucin Genes Located in the Complex on 11p15.5', *Hum Genet*, 102 (1998), 357-66.
- D. Volanis, T. Kadiyska, A. Galanis, D. Delakas, S. Logotheti, and V. Zoumpourlis, 'Environmental Factors and Genetic Susceptibility Promote Urinary Bladder Cancer', *Toxicol Lett*, 193 (2010), 131-7.
- H. von der Maase, L. Sengelov, J. T. Roberts, S. Ricci, L. Dogliotti, T. Oliver, M. J. Moore, A. Zimmermann, and M. Arning, 'Long-Term Survival Results of a Randomized Trial

- Comparing Gemcitabine Plus Cisplatin, with Methotrexate, Vinblastine, Doxorubicin, Plus Cisplatin in Patients with Bladder Cancer', *J Clin Oncol*, 23 (2005), 4602-8.
- X. Wu, Y. Kakehi, Y. Zeng, R. Taoka, H. Tsunemori, and M. Inui, 'Uroplakin Ii as a Promising Marker for Molecular Diagnosis of Nodal Metastases from Bladder Cancer: Comparison with Cytokeratin 20', *J Urol*, 174 (2005), 2138-42, discussion 42-3.
 - X. R. Wu, J. H. Lin, T. Walz, M. Haner, J. Yu, U. Aebi, and T. T. Sun, 'Mammalian Uroplakins. A Group of Highly Conserved Urothelial Differentiation-Related Membrane Proteins', *J Biol Chem*, 269 (1994), 13716-24.
 - M. Yilmaz, and G. Christofori, 'Emt, the Cytoskeleton, and Cancer Cell Invasion', *Cancer Metastasis Rev*, 28 (2009), 15-33.
 - T. Yuasa, T. Yoshiki, T. Isono, T. Tanaka, H. Hayashida, and Y. Okada, 'Expression of Transitional Cell-Specific Genes, Uroplakin Ia and Ii, in Bladder Cancer: Detection of Circulating Cancer Cells in the Peripheral Blood of Metastatic Patients', *Int J Urol*, 6 (1999), 286-92.
 - T. Yuasa, T. Yoshiki, T. Tanaka, C. J. Kim, T. Isono, and Y. Okada, 'Expression of Uroplakin Ib and Uroplakin Iii Genes in Tissues and Peripheral Blood of Patients with Transitional Cell Carcinoma', *Jpn J Cancer Res*, 89 (1998), 879-82.
 - M. P. Zeegers, E. Kellen, F. Buntinx, and P. A. van den Brandt, 'The Association between Smoking, Beverage Consumption, Diet and Bladder Cancer: A Systematic Literature Review', *World J Urol*, 21 (2004), 392-401.
 - B. K. Zehentner, 'Detection of Disseminated Tumor Cells: Strategies and Diagnostic Implications', *Expert Rev Mol Diagn*, 2 (2002), 41-8.
 - S. Zhang, H. S. Zhang, V. E. Reuter, S. F. Slovin, H. I. Scher, and P. O. Livingston, 'Expression of Potential Target Antigens for Immunotherapy on Primary and Metastatic Prostate Cancers', *Clin Cancer Res*, 4 (1998), 295-302.
 - Z. Zhang, S. T. Pang, K. A. Kasper, C. Luan, B. Wondergem, F. Lin, C. K. Chuang, B. T. Teh, and X. J. Yang, 'Fxyd3: A Promising Biomarker for Urothelial Carcinoma', *Biomark Insights*, 6 (2011), 17-26.

DANKSAGUNG

Dem Klinikdirektor der Klinik für Urologie am Klinikum rechts der Isar der technischen Universität München, Univ.-Prof. Dr. med. J. Gschwend, meiner Doktormutter Frau Prof. Dr. Margitta Retz, sowie dem Leiter des urologischen Forschungslabors Dr. rer. nat. R. Nawroth

danke ich für die Bereitstellung des urologischen Forschungslabors für die Durchführung meiner Forschungsarbeit sowie die kompetente Betreuung während meiner Arbeit.

Außerdem möchte ich mich besonders bei Dr. M. Heck für die kompetente und persönliche Betreuung sowie für das Angebot und die Vergabe des interessanten Themas bedanken.

Auch der technischen Assistentinnen des urologischen Labors, Frau M. Moissl, gilt mein besonderer Dank.

Meiner Familie und insbesondere meiner Labor-Kollegin Lisa Vitzthum danke ich von Herzen für die Motivation, das Verständnis und das Vertrauen in mich.