

Urologische Klinik und Poliklinik des Klinikums rechts der Isar  
der Technischen Universität München

**Nachweis von disseminierten Tumorzellen im Knochenmark von  
Patienten mit Harnblasenkarzinom mittels quantitativer real-time  
PCR und der molekularbiologischen Marker CK20, CK14, CK17,  
UPK2, SPINK1 und TMPRSS2**

Friederike Anna Fiala

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

Vorsitzender: Prof. Dr. Ernst J. Rummeny

Prüfer der Dissertation:

1. Prof. Dr. Margitta Retz
2. Prof. Dr. Jürgen E. Gschwend

Die Dissertation wurde am 13.10.2015 bei der Technischen Universität München  
eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 04.05.2016 angenommen.



# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>7</b>
<b>2. Tabellenverzeichnis .....</b>	<b>9</b>
<b>3. Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>11</b>
<b>4. Einleitung .....</b>	<b>15</b>
4.1. Das Harnblasenkarzinom.....	15
4.1.1. Epidemiologie.....	15
4.1.2. Äthiologie und Pathogenese .....	16
4.1.3. Klassifikation des Harnblasenkarzinoms.....	17
4.1.4. Diagnostik und präoperatives Staging.....	19
4.1.5. Therapie und Nachsorge.....	20
4.1.6. Prognose des Harnblasenkarzinoms .....	22
4.2. Metastasierung .....	22
4.2.1. Fernmetastasen beim Harnblasenkarzinom.....	22
4.2.2. Disseminierte Tumorzellen.....	23
4.2.3. Prognostische Relevanz von Disseminierten Tumorzellen .....	24
4.2.4. Detektion von disseminierten Tumorzellen .....	25
4.3. Molekularer Marker .....	28
4.3.1. CK20 .....	28
4.3.2. Weitere Marker.....	30
4.4. Fragestellung der Arbeit.....	34
<b>5. Material und Methoden .....</b>	<b>37</b>
5.1. Vorversuche .....	37
5.1.1. Referenzgene.....	37
5.1.2. Versuche auf Blasenkarzinomzelllinien.....	38
5.1.3. Sensitivität.....	40
5.1.4. Spezifität.....	41

5.2.	Patientenkollektiv .....	41
5.2.1.	Studienprotokoll.....	41
5.2.2.	Therapieplan .....	42
5.3.	Molekularer Nachweis der Marker .....	42
5.3.1.	Knochenmarkspunktion.....	42
5.3.2.	Separation und Lyse von kernhaltigen Zellen .....	43
5.3.3.	RNA-Extraktion und Konzentrationsmessung.....	45
5.3.4.	Reverse Transkriptase Reaktion .....	47
5.3.5.	Polymerasekettenreaktion.....	50
5.4.	Auswertung der qPCR-Ergebnisse .....	56
5.4.1.	Fluoreszenzsignal und Rohdaten.....	56
5.4.2.	Quantifizierung .....	57
5.5.	Statistische Auswertung der Ergebnisse .....	59
5.5.1.	Auswertungskriterien.....	59
5.5.2.	Statistische Methoden.....	59
<b>6.</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>63</b>
6.1.	Vorversuche .....	63
6.1.1.	Blasenkarzinomzelllinien.....	63
6.1.2.	Sensitivität.....	64
6.1.3.	Spezifität.....	64
6.1.4.	Knochenmarksproben .....	65
6.2.	Patientenkollektiv .....	65
6.2.1.	Allgemeine und klinische Parameter im Gesamtpatientenkollektiv ...	65
6.2.2.	Ereignisse und Überlebensraten im Gesamtpatientenkollektiv .....	68
6.3.	Standardrisikofaktoren .....	70
6.3.1.	Tumorstadium .....	70
6.3.2.	Lymphknotenstatus .....	71
6.3.3.	Weitere relevante Faktoren .....	73
6.4.	Molekulare Marker .....	74

6.4.1.	CK20 .....	74
6.4.2.	CK20 Cut-off Wert 1,74752 .....	74
6.4.3.	CK20 Cut-off Wert 0,96108 .....	76
6.4.4.	SPINK1.....	80
6.4.5.	Weitere Marker.....	84
<b>7.</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>87</b>
7.1.	Studiendesign .....	87
7.1.1.	Motivation dieser Arbeit.....	87
7.1.2.	Vergleichbarkeit Patientenkollektiv.....	87
7.1.3.	Methoden .....	88
7.2.	Patientenkollektiv .....	91
7.2.1.	Klinische Parameter im Gesamtpatientenkollektiv .....	91
7.2.2.	Marker-unabhängige prognostische Faktoren.....	93
7.3.	Ergebnisse molekulare Marker .....	95
7.3.1.	CK20 .....	95
7.3.2.	SPINK1.....	98
7.3.3.	Weitere Marker.....	99
7.4.	Kommentar .....	100
7.4.1.	Fazit.....	100
7.4.2.	Ausblick.....	100
<b>8.</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>103</b>
<b>9.</b>	<b>Danksagung .....</b>	<b>107</b>
<b>10.</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>109</b>



# 1. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1: Krebsneuerkrankungen Männer 2010 [1] .....	15
Abbildung 1.2: Krebsneuerkrankungen Frauen 2010 [1] .....	16
Abbildung 1.3: Mikrobiologischer Nachweis von Mikrometastasen .....	26
Abbildung 2.1: Nachweisverfahren mittels Polymerasekettenreaktion .....	50
Abbildung 2.2: Prinzip exonübergreifender Primer .....	52
Abbildung 2.3: Entwicklung des Fluoreszenzsignals während der qPCR.....	56
Abbildung 2.4: Beispiel für Kaplan-Meier-Kurve .....	60
Abbildung 3.1: Rezidivfreies Überleben nach pT-Stadium .....	70
Abbildung 3.2: Gesamtüberleben nach pT-Stadium .....	71
Abbildung 3.3: Rezidivfreies Überleben nach pN-Status .....	72
Abbildung 3.4: Gesamtüberleben nach pN-Status.....	73
Abbildung 3.5: Rezidivfreies Überleben nach CK20-Status (Cut-off 1,74752) .....	75
Abbildung 3.6: Gesamtüberleben nach CK20-Status (Cut-off 1,7475) .....	76
Abbildung 3.7: Rezidivfreies Überleben nach CK20-Status (Cut-off 0,96108) .....	77
Abbildung 3.8: Gesamtüberleben nach CK20-Status (Cut-off 0,96108) .....	78
Abbildung 3.9: Rezidivfreies Überleben nach SPINK1-Status (Cut-off 2,37327).....	81
Abbildung 3.10: Gesamtüberleben nach SPINK1-Status (Cut-off 2,37327) .....	82



## 2. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1.1: TNM-Klassifikation des Harnblasenkarzinoms.....	18
Tabelle 1.2: Einteilung Invasivität des Harnblasenkarzinoms.....	19
Tabelle 2.1: Humane Blasenkarzinomzelllinien .....	39
Tabelle 2.2: Materialien Knochenmarkspunktion .....	42
Tabelle 2.3: Materialien zur Separation und Lyse der kernhaltigen Zellen .....	44
Tabelle 2.4: Materialien für die RNA-Extraktion.....	46
Tabelle 2.5: Materialien für die Reverse Transkriptase Reaktion .....	48
Tabelle 2.6: Reaktionsgemisch für die Reverse Transkriptase Reaktion .....	49
Tabelle 2.7: Materialien für die real-time PCR.....	54
Tabelle 2.8: Reaktionsgemisch für die real-time PCR .....	55
Tabelle 2.9: Programm für die real-time PCR Zyklen .....	55
Tabelle 3.1: Ergebnisse humane Blasenkarzinomzelllinien.....	63
Tabelle 3.2: Ergebnisse absolute Quantifizierung und Zellverdünnungsreihe.....	64
Tabelle 3.3: Ergebnisse PBMC-Proben der gesunden Kontrollgruppe.....	65
Tabelle 3.4: Allgemeine und klinische Parameter im Patientenkollektiv .....	66
Tabelle 3.5: Klinische Parameter im Gesamtpatientenkollektiv .....	67
Tabelle 3.6: Allgemeine und klinische Parameter nach pTNM-Stadium.....	67
Tabelle 3.7: Rezidiv- und Todesfälle in den einzelnen Untergruppen .....	69
Tabelle 3.8: Rezidivfreies Überleben nach pT-Stadium.....	70
Tabelle 3.9: Gesamtüberleben nach pT-Stadium .....	71
Tabelle 3.10: Rezidivfreies Überleben nach pN-Status .....	72
Tabelle 3.11: Gesamtüberleben nach pN-Status.....	72
Tabelle 3.12: Rezidivfreies Überleben nach CK20-Status (Cut-off 1,74752).....	75
Tabelle 3.13: Gesamtüberleben nach CK20-Status (Cut-off 1,74752).....	75
Tabelle 3.14: Rezidivfreies Überleben nach CK20-Status (Cut-off 0,96108).....	77
Tabelle 3.15: Gesamtüberleben nach CK20-Status (Cut-off 0,96108) .....	78
Tabelle 3.16: CK20-Expression nach pT-Stadium und pN-Status.....	79
Tabelle 3.17: Rezidivfreies Überleben nach SPINK1-Status (Cut-off 2,37327).....	81
Tabelle 3.18: Gesamtüberleben nach SPINK1-Status (Cut-off 2,37327) .....	81
Tabelle 3.19: Auswertung R0, kPCA, R0 + kPCA.....	83



### 3. Abkürzungsverzeichnis

and. Urs.	Andere Ursache
Aqua bidest.	Aqua bidestillata
ATCC	American Type Culture Collection
Bsp.	Beispiel
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
cDNA	copy Deoxyribonucleic acid
CK14	Cytokeratin 14
CK17	Cytokeratin 17
CK19	Cytokeratin 19
CK20	Cytokeratin 20
CK5	Cytokeratin 5
Cl	Chlorid
CLS	Cell Line Service
Cp-Wert	Crossing Point
CT	Computertomographie
Ct-Wert	Threshold Cycle
cTNM	klinisches TNM-Stadium
CTx	Chemotherapie
d.h.	das heißt
DNA	Deoxyribonucleic acid
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
EAU	European Association of Urology
EGF	Epidermal Growth Factor
engl.	englisch
et al.	et alii
F	Frauen
fam	Fluoreszenzfarbstoff 6-FAM-phosphoramidit
G	Grading
G0	G von gap Ruhephase im Zellzyklus
GAPDH	Gen der Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
ggü.	gegenüber

H0	Nullhypothese
H1	Alternativhypothese
HPA	Health Protection Agency
HPRT1	Gen der Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase 1
insg.	insgesamt
K	Template-Ausgangskonzentration
k	kein (kPCA = kein Prostatakarzinom)
LA	Lymphadenektomie
LDL	Low Density-Lipoprotein
LK	Lymphknoten
M	Männer
max.	maximal
Mg	Magnesium
min.	mindest
mRNA	messenger RNA Boten-RNA
MRT	Magnetresonanztomographie
Na	Natrium
neg	negativ
OD	Optische Dichte
OS	Overall survival
p-Wert	p von probability Überschreitungswahrscheinlichkeit
PBMC	Peripheral Blood Mononuclear Cells
PBS	phosphate buffered saline
PCA	Prostatakarzinom
PCR	Polymerasekettenreaktion
pos.	positiv
PSA	Prostata-spezifisches Antigen
PSTI	Pancreatic Secretory Trypsin Inhibitor
pTNM	pathologische Klassifikation Tumor Node Metastasis
qPCR	quantitative real-time Polymerasekettenreaktion
R	Resektionsstatus
RFS	Recurrence-free Survival
RNA	Ribonucleic acid
RNase	Ribonuklease
RNasin	Ribonuclease Inhibitor
RT-PCR	qualitative Reverse-Transkriptase Polymerasekettenreaktion
SPINK1	Serine Protease Inhibitor, Kazal Typ 1

System.	Systemisch
Taq	Thermus aquaticus
TATI	Tumor Associated Trypsin Inhibitor
TMPRSS2	Transmembrane Protease Serine 2
Todesf.	Todesfälle
Tumorbed.	Tumorbedingt
UPK2	Uroplakin 2
v.a.	vor allem
vic	Fluoreszenzfarbstoff Patent von ABI keine Angaben
vs.	versus
YWHAZ	Gen des 3-Monooxygenase/Tryptophan 5-Monooxygenase-Aktivierung Protein zeta/delta
z.B.	zum Beispiel

### **Verwendete Einheiten**

°C	Grad Celcius
a	Jahr
bp	Basenpaare
cm	Zentimeter
g	Beschleunigung als Vielfaches der mittleren Erdbeschleunigung g
g	Gramm
m <sup>2</sup>	Quadratmeter
mg	Milligramm
min	Minuten
ml	Milliliter
mm	Millimeter
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
rpm	revolutions per minute
sec	Sekunden
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter



# 4. Einleitung

## 4.1. Das Harnblasenkarzinom

### 4.1.1. Epidemiologie

#### Inzidenz und Mortalität

Das Harnblasenkarzinom ist die zweithäufigste urologische Krebserkrankung in Deutschland. Gemäß den Krebsregisterdaten 2013 des Robert Koch Instituts gab es 2010 in Deutschland etwa 15.500 Neuerkrankungen an invasivem Harnblasenkarzinom. Dies entspricht einer Inzidenz (altersstandardisierte Erkrankungsrate) von ca. 38/100.000 pro Jahr. Bei den Krebs-Neuerkrankungen liegt es damit bei den Männern mit 4,5% an vierter Stelle und bei den Frauen mit 1,8% an vierzehnter Stelle [1]. Rund 5.500 Todesfälle sind jährlich in Deutschland auf eine Erkrankung an invasivem Harnblasenkarzinom zurückzuführen, was einer Mortalität (altersstandardisierte Sterberate) von ca. 8/100.000 pro Jahr entspricht [1].

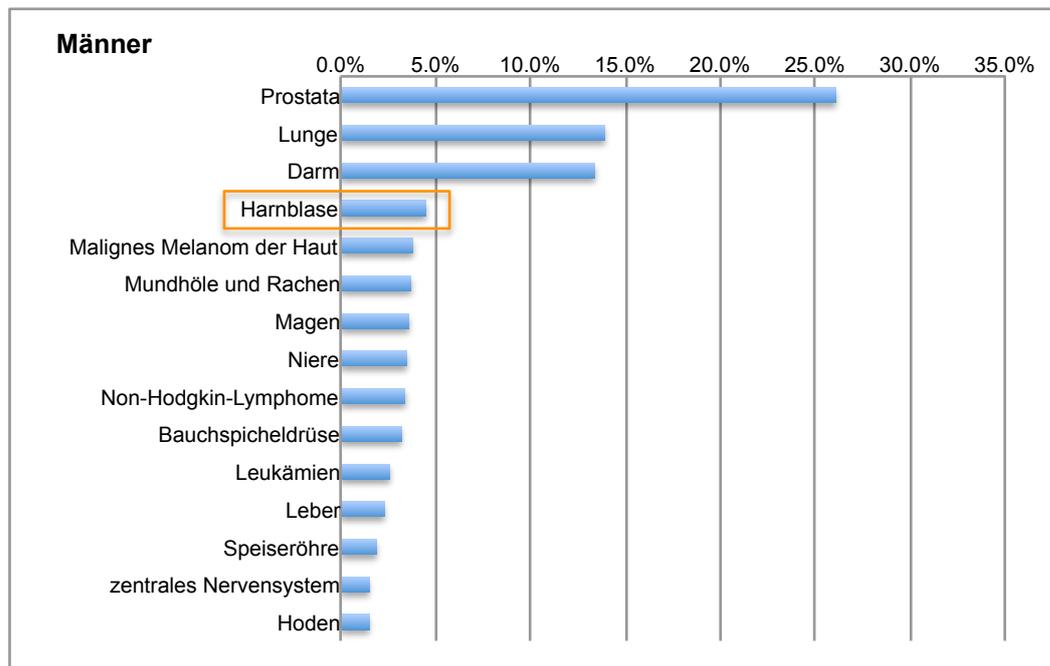
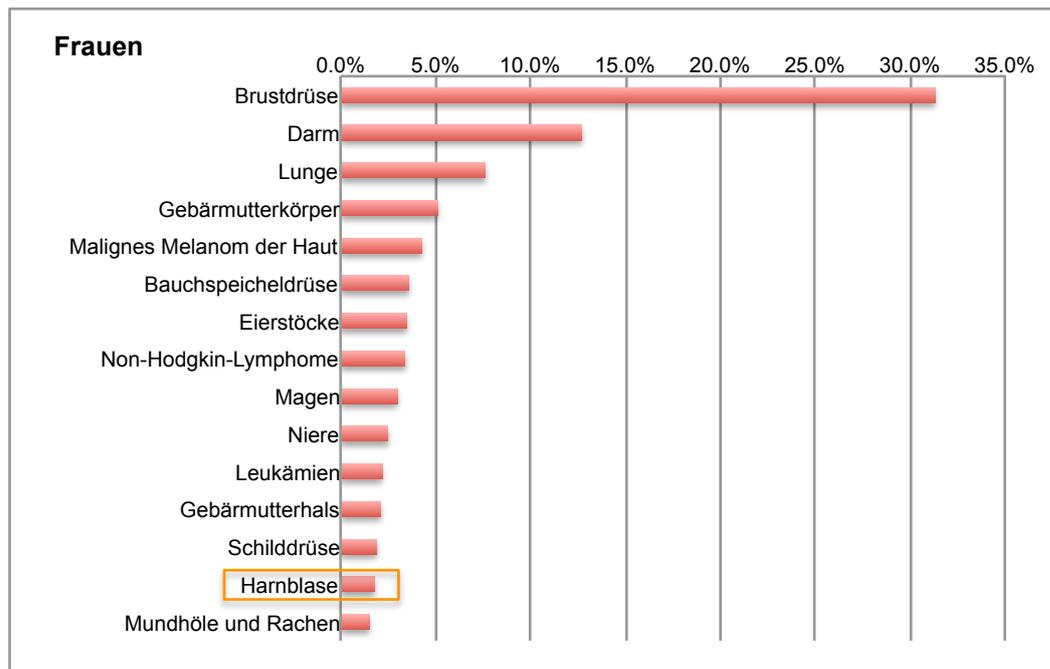


Abbildung 4.1: Krebsneuerkrankungen Männer 2010 [1]



**Abbildung 4.2: Krebsneuerkrankungen Frauen 2010 [1]**

### **Alters- und Geschlechtsunterschiede**

Das mittlere Erkrankungsalter von Männern liegt bei 73, das von Frauen bei 78 Jahren [1]. Die Erkrankungsrate steigt mit dem Alter. So liegt die Inzidenz beispielsweise mit 40 Jahren bei ca. 3/100.000, mit 80 Jahren hingegen bei 250 Neuerkrankungen/100.000 [2]. Circa 73% der Erkrankten sind Männer. Als Erklärung hierfür gilt, dass Männer lange Zeit mehr Kontakt zu Risikofaktoren wie Nikotin und beruflicher Schadstoffexposition hatten (siehe Kapitel Ätiologie und Pathogenese) [1]. Auch die unterschiedlichen Östrogen- und Androgenlevel spielen eine Rolle bei der Entstehung des Harnblasenkarzinoms. So scheint z.B. Östrogen ein protektiver Faktor zu sein [3, 4].

### **Entwicklung**

Die Zahl der Neuerkrankungen ist derzeit steigend. Dies liegt an dem zunehmend größeren Anteil älterer Menschen in unserer Gesellschaft und der mit dem Alter steigenden Inzidenz des Harnblasenkarzinoms bezogen auf die rohe (nicht altersstandardisierte) Erkrankungsrate [1].

## **4.1.2. Ätiologie und Pathogenese**

### **Rauchen**

Rauchen ist der bedeutendste Risikofaktor für das Harnblasenkarzinom [5]. Die Inzidenz des Harnblasenkarzinoms steigt signifikant mit der Zeitdauer des Zigaretten-

konsums und der Anzahl an Zigaretten pro Tag. Ca. 50% der Harnblasenkarzinomfälle sind auf das Rauchen zurückzuführen [6].

### **Berufliche Exposition**

An zweiter Stelle der Risikofaktoren, steht die berufsbedingte Exposition gegenüber kanzerogenen Schadstoffen. Zu diesen Substanzen zählen v.a. Aromatische Amine (Arylamine) und Benzolderivate. Ihnen ausgesetzt sind oder waren besonders die Berufsgruppen in der Metall-, Plastik-, Textil- und Lederverarbeitung, sowie Bergleute, Kraftwagenfahrer, Tankwarte und Friseure. Obwohl aufgrund strenger Arbeitsauflagen rückläufig, sind durch die jahrzehntelange Latenzzeit auch in Westeuropa noch immer 5-10% der Harnblasenkarzinome auf berufsbedingte Schadstoffexposition zurückzuführen [7, 8].

### **Weitere Risikofaktoren**

In vielen Ländern Asiens, Afrikas, Südamerikas und der Karibik ist die Blasenbilharziose (Schistosomiasis) die Hauptursache für Harnblasenkarzinome [9]. Auch einige Medikamente wie das frühere Analgetikum Phenacetin und das Zytostatikum Cyclophosphamid erhöhen dosisabhängig das Risiko für Blasenkrebs [10, 11]. Reizzustände wie sie bei einer lokalen Radiotherapie, bei chronischen Harnwegsinfekten oder Dauerkatheter-Anwendung auftreten, können ebenfalls einen Risikofaktor darstellen, speziell für die Entwicklung eines Plattenepithelkarzinoms [12-14].

### **Histologie des Harnblasenkarzinoms**

Bei über 90% der Harnblasentumore handelt es sich histologisch um Urothelkarzinome. Circa 5% der Harnblasenkarzinome entsprechen Plattenepithelkarzinomen und 1-2% Adenokarzinomen. Bei einem noch kleineren Anteil handelt es sich um andere Tumorentitäten, wie Sarkome, Phäochromozytome, Kleinzellige Karzinome und Karzinoide [15].

#### **4.1.3. Klassifikation des Harnblasenkarzinoms**

Die Einteilung des Harnblasenkarzinoms erfolgt anhand der 7. Edition der TNM (Tumor, Node, Metastasis) - Klassifikation der „International Union Against Cancer“ von 2010.

## TNM-Klassifikation

<b>pTNM</b>	P = Pathologisch Tumorstadium ist histologisch bestimmt worden
<b>cTNM</b>	C = Klinisch Tumorstadium ist z.B. durch Bildgebung bestimmt worden
<b>T</b>	Tumorstadium
<b>Tx</b>	Tumor kann nicht bewertet werden
<b>T0</b>	kein Hinweis für Tumor
<b>Ta</b>	Nicht-invasives papilläres Karzinom
<b>Tis</b>	= Carcinoma in situ, nicht-invasives Karzinom, Tumor überschreitet nicht die Basalmembran
<b>T1</b>	Tumor überschreitet Basalmembran, infiltriert subepitheliales Bindegewebe (Lamina submucosa)
<b>T2</b>	Tumor infiltriert die Muskelschicht (Lamina muscularis)
– <b>T2a</b>	– Tumor infiltriert die oberfl. Muskelschicht (Innere Hälfte der Lamina muscularis)
– <b>T2b</b>	– Tumor infiltriert die tiefe Muskelschicht (Äußere Hälfte der Lamina muscularis)
<b>T3</b>	Tumor infiltriert perivesikales Gewebe
– <b>T3a</b>	– Tumor infiltriert perivesikales Gewebe mikroskopisch
– <b>T3b</b>	– Tumor infiltriert perivesikales Gewebe makroskopisch
<b>T4</b>	Tumor infiltriert perivesikale Organe/Strukturen
– <b>T4a</b>	– Tumor infiltriert Prostata, Uterus oder Vagina
– <b>T4b</b>	– Tumor infiltriert Beckenwand oder Bauchwand
<b>N</b>	Lymphknotenstadium
<b>Nx</b>	regionale Lymphknoten können nicht bewertet werden
<b>N0</b>	kein Hinweis auf regionale Lymphknotenmetastasen
<b>N1</b>	solitäre LK-Metastase hypogastrisch, obturatorisch, extern iliakal, präsakral
<b>N2</b>	multiple LK-Metastasen hypogastrisch, obturatorisch, extern iliakal, präsakral
<b>N3</b>	Lymphknotenmetastasen entlang der Aa. iliacae communes
<b>M</b>	Metastasenstadium
<b>Mx</b>	Befunde zu Fernmetastasen können nicht bewertet werden
<b>M0</b>	kein Hinweis auf Fernmetastasen
<b>M1</b>	Fernmetastasen

**Tabelle 4.1: TNM-Klassifikation des Harnblasenkarzinoms**

<b>Einteilung Invasivität</b>	
<b>Nicht-invasive Tumore</b>	Ta, Tis
<b>Invasive Tumore</b>	T1, T2, T3, T4
<b>Nicht-muskelinvasive Tumore</b>	Ta, Tis, T1
<b>Muskelinvasive Tumore</b>	T2, T3, T4
<b>Organbegrenztes Harnblasenkarzinom</b>	Ta, Tis, T1, T2
<b>Organüberschreitendes Harnblasenkarzinom</b>	T3, T4

**Tabelle 4.2: Einteilung Invasivität des Harnblasenkarzinoms**

### **Verteilung der Tumorstadien**

Bei Erstdiagnose haben 70% der Patienten ein nicht-muskelinvasives und 30% ein muskelinvasives Harnblasenkarzinom [16]. Bei 10-15% der Patienten bestehen bei Erstdiagnose bereits Fernmetastasen [17]. Von den Patienten, die sich einer radikalen Zystektomie unterziehen, haben etwa 60% einen organbegrenzten Tumor und 40% einen organüberschreitenden Tumor. Bei ca. 25% werden im Rahmen der Zystektomie bereits Lymphknotenmetastasen festgestellt [18, 19]. Der Krankheitsverlauf der Patienten legt jedoch die Vermutung nahe, dass bei etwa einem Drittel der Patienten zum Zeitpunkt der Operation disseminierte Tumorzellen oder okkulte Mikrometastasen vorliegen [20].

#### **4.1.4. Diagnostik und präoperatives Staging**

Die Informationen zu Symptomen, Diagnostik und Staging basieren auf den aktuellen Leitlinien der European Association of Urology von 2012 und 2014 [16, 21, 22].

### **Symptome**

Verlässliche Frühsymptome gibt es beim Harnblasenkarzinom nicht. Häufigstes Symptom ist eine schmerzlose Hämaturie. Weitere Symptome können Dysurie, vermehrter Harndrang, erhöhte Miktionsfrequenz und Schmerzen in Unterbauch und Becken sein. Schmerzen sowie Symptome einer Harnwegsobstruktion finden sich in der Regel bei fortgeschrittenen Tumoren [16].

### **Diagnosestellung**

Eine Raumforderung der Harnblase kann mittels Sonographie, Intravenöser Urographie, Computer- oder Magnetresonanztomographie detektiert werden. Raumforderungen müssen jedoch immer histologisch abgeklärt werden. Die Zystoskopie mit Biopsie und histologischer Evaluation ist daher der Goldstandard zur Diagnostizie-

rung des Harnblasenkarzinoms und wird bei Verdacht initial durchgeführt. Hierbei wird eine transurethrale Resektion vorgenommen. Kleine Tumoren (<1cm) werden dabei en Bloc entfernt, bei größeren Tumoren wird eine Probe zur genauen histologischen Bestimmung von Tumorstadium, Invasivität, und Grading entnommen [16, 21].

### **Beurteilung von Tumorausdehnung und Lymphknoten**

Zur präoperativen Beurteilung der lokalen Tumorausbreitung ist das MRT mit seinem höheren Weichteilkontrast dem CT etwas überlegen. Realistisch ist es mittels CT oder MRT ein Tumorstadium T3b oder höher zu detektieren [21, 23]. Pelvine Lymphknoten >8-9mm sowie abdominelle LK >10-11mm sollten sowohl im CT als auch MRT als pathologisch vergrößert bewertet werden [24].

### **Detektion von Fernmetastasen**

Routinemäßig werden zur Detektion von Fernmetastasen ein Röntgen-Thorax durchgeführt, sowie Transaminasen und alkalische Phosphatase überprüft. Bei Auffälligkeiten oder fortgeschrittenem histologischen Tumorstadium wird ein Abdomen- und Thorax-CT zur Detektion von Leber- und Lungenmetastasen durchgeführt. Knochen- und Hirnmetastasen sind bei Erstdiagnose selten und werden daher nur bei konkretem Verdacht abgeklärt [16, 21, 23].

### **Grenzen der Bildgebung**

Sowohl Abdomen-CT als auch -MRT sind in ihrer Aussagekraft limitiert. Tumoren und Metastasen sind erst ab einem gewissen Volumen detektierbar, hier besteht die Gefahr eines therapielevanten Understaging. Zudem sind postoperative oder tumorbedingte Entzündungsreaktionen in Tumorumgebung und Lymphknoten schwer von malignen Raumforderungen zu unterscheiden. Dies führt dazu, dass sowohl die Sensitivität als auch die Spezifität der Ergebnisse sehr variabel und oft niedrig ist [23, 25].

## **4.1.5. Therapie und Nachsorge**

Die Informationen zu Therapiemöglichkeiten und Nachsorge basieren auf den aktuellen Leitlinien der European Association of Urology von 2012 und 2014 zum Harnblasenkarzinom [16, 21, 22].

### **Radikale Zystektomie und Lymphadenektomie**

Goldstandard beim muskelinvasiven Harnblasenkarzinom ist die radikale Zystektomie mit Lymphadenektomie. Indikation hierfür sind in der Regel die Tumorstadien T2a bis T4a und M0. Bei ungünstiger Risikokonstellation kann sie auch bei niedrige-

rem, mit palliativem Ansatz auch bei höherem Tumorstadium indiziert sein. Neben der Harnblase werden dabei auch die angrenzenden Organe (Prostata und Samenbläschen oder Uterus und Adnexe), die distalen Ureter und das perivesikale Fettgewebe mit den regionalen Lymphknoten entfernt [16, 21]. Das nötige Ausmaß der Lymphadenektomie ist derzeit strittig. Die Entfernung von mindestens 10-15 Lymphknoten wirkt sich jedoch positiv sowohl auf die Evaluation des Lymphknotenstatus als auch auf das Gesamtüberleben aus [26, 27]. In den letzten Jahren werden neben der offenen Radikalen Zystektomie zunehmend auch roboter-assistierte laparoskopische Zystektomien durchgeführt [28]. Zur Urinausleitung ist derzeit in den meisten Zentren die orthotope Neoblase, ein kontinentes Pouchsystem aus Colon oder Ileum mit Anschluss an die Urethra, das Verfahren der Wahl [16, 21, 29].

### **Chemotherapie**

Cisplatin-haltige Chemotherapiekombinationen sind die beim Harnblasenkarzinom am Besten untersuchten Zytostatika mit gutem Ansprechen (Response-Raten von 40-50%) und sind daher First-Line-Therapieschema. Neoadjuvante Cisplatin-haltige Chemotherapie-Kombinationen, können das 5-Jahres Gesamtüberleben um 5-8%-Punkte erhöhen. Die European Association of Urology empfiehlt in den aktuellen Leitlinien von 2014 bei Patienten mit T2 bis T4a- und N0/M0- Stadium eine neoadjuvante Chemotherapiekombination in Betracht zu ziehen [16, 21]. Patienten mit Lymphknotenstatus N1 sollten eine adjuvante Chemotherapie angeboten bekommen [21, 30, 31]. Vinflunide gelten als Second-Line-Chemotherapie [32]. Beim metastasierten Harnblasenkarzinom liegt das mittlere Überleben ohne Behandlung bei 3-6 Monaten [33]. Mit einer kombinierten Chemotherapie kann ein mittleres Überleben von 11-15,5 Monaten erreicht werden [21, 32].

### **Tumornachsorge**

Bei 5-15% der Patienten kommt es zu einer lokalen pelvinen Tumorrezidiv. Meistens manifestiert sie sich in den ersten 24 Monaten, häufig sogar in den ersten 6 Monaten, nach Zystektomie. Bis zu 50 % entwickeln im Krankheitsverlauf Fernmetastasen. Das Risiko für beides steigt mit dem Tumorstadium und einem positiven Lymphknoten-Status. [16, 21, 34]. Die allgemeinen Nachsorgeempfehlungen innerhalb der ersten 5 Jahre nach Zystektomie beinhalten Laborkontrollen, Urinzytologie sowie Thorax- und Abdomen- CT [21].

## 4.1.6. Prognose des Harnblasenkarzinoms

### **Überlebensraten**

Die absolute 5-Jahres Gesamtüberlebensrate für Patienten mit Harnblasenkarzinom beträgt für Männer 47% und für Frauen 41% [1]. Innerhalb des Patientenkollektivs sinkt diese mit steigendem pT-Stadium. Für Patienten mit organbegrenzten Tumoren (<T3) liegt sie zwischen 68-74%, für Patienten mit organüberschreitenden Tumoren (≥T3) zwischen 30-37%. Bei Lymphknoten-negativen Patienten beträgt die 5-Jahres Gesamtüberlebensrate 57-69%, bei Lymphknoten-positiven Patienten hingegen nur noch 25-30% [18, 19]. Dabei zeigen Patienten mit pN1-Status noch einmal deutlich bessere Überlebensraten als Patienten mit pN2-3-Status [35, 36]. Patienten, die einer radikalen Zystektomie mit kurativer Zielsetzung zugeführt werden, haben je nach Studie eine 5-Jahres Gesamtüberlebensrate zw. 58-66% [28, 34, 36]. Eine adjuvante Chemotherapie kann das 5-Jahres Gesamtüberleben von Patienten mit organüberschreitenden Tumoren oder positivem Lymphknotenstatus von ca. 30 auf 45% anheben [31]. Beim Vorhandensein von Fernmetastasen (M1), wird selbst mit Chemotherapie nur eine mittlere Überlebenszeit von 10-15,5 Monaten erreicht [32, 33].

## 4.2. Metastasierung

### 4.2.1. Fernmetastasen beim Harnblasenkarzinom

#### **Krankheitsprogress**

Nur etwa 10-15% der Patienten mit Harnblasenkarzinom haben bereits bei Erstdiagnose Fernmetastasen. Jedoch über 30%, je nach Studie sogar bis zu 50% entwickeln diese im Verlauf ihrer Erkrankung [16, 17, 34]. Selbst bei Patienten mit nicht-metastasierten, organbegrenzten Tumoren, negativem Lymphknotenstatus und radikaler chirurgischer Therapie liegt die 5-Jahres Gesamtüberlebensrate derzeit unter 70% [18, 19, 34]. Die Ursache für den Krankheitsprogress und die relativ schlechte Prognose dieser Patienten ist wesentlich häufiger die Entwicklung von Fernmetastasen als ein lokales Rezidiv [34]. Verantwortlich hierfür sind vermutlich disseminierte Tumorzellen oder okkulte Mikrometastasen, die zum Zeitpunkt der Diagnose und primären Therapie bereits vorliegen jedoch nicht detektiert werden konnten [37-39].

#### **Problematik der Therapieentscheidung**

Bei Patienten mit Harnblasenkarzinom ist es immer noch sehr schwierig das Risiko einer Entwicklung von Fernmetastasen oder eines Lokalrezidivs einzuschätzen. Hieraus ergibt sich die Schwierigkeit, das richtige Ausmaß der Therapie zu wählen. Aus diesem Grund wird weltweit nach neuen Verfahren und Markern gesucht, die über

Tumorstadium, Lymphknotenstatus und Grading hinaus noch genauere prognostische Informationen liefern und somit die Therapieentscheidung unterstützen können [40].

#### 4.2.2. Disseminierte Tumorzellen

##### **Definition disseminierte Tumorzellen, Mikrometastasen, Metastasen**

Disseminierte Tumorzellen sind definiert als einzelne Zellen oder kleine Zellcluster bei denen noch keine extravaskuläre Proliferation stattgefunden hat. Werden sie aus peripherem Blut isoliert nennt man sie zirkulierende Tumorzellen. Werden sie nach erfolgter Therapie detektiert, werden sie auch als „minimal residual disease“ bezeichnet. Disseminierte Tumorzellen werden als Repräsentanten frühester Tumorstreuung betrachtet [41]. Mikrometastasen sind dagegen Zellaggregate zwischen 0,2 und 2mm mit extravaskulärer Proliferation, die mikroskopisch nachgewiesen werden können, bildgebend jedoch nicht darzustellen sind. Sie werden auch als „okkulte Metastasen“ bezeichnet [42]. Makrometastasen sind dementsprechend Aggregate > 2mm, die histologisch bereits makroskopisch erkennbar sind und teilweise durch bildgebende Verfahren nachzuweisen sind.

##### **„Tumor Cell Dormancy“**

Einzelne vom Primärtumor abgelöste Tumorzellen gelangen zunächst in den Lymph- oder Blutstrom. Sie können im Kapillarbett hängen bleiben, ins umliegende Gewebe eindringen und dort Metastasen bilden oder jahrelang in einem inaktiven Stadium, welches auch „tumor cell dormancy“ genannt wird, überdauern. In Untersuchungen zeigten die meisten der disseminierten Tumorzellen (95%) dieses inaktive (schlafende) Verhalten, in dem weder Zellteilung noch Apoptose stattfindet. In diesem Ruhezustand (G0-Phase) proliferieren die Tumorzellen nicht. Dies bedeutet jedoch auch, dass sie einer Chemo- oder Strahlentherapie unter Umständen nicht gut zugänglich sind. Es ist zu befürchten, dass diese Zellen zu einem späteren Zeitpunkt wieder zur Proliferation aktiviert werden können [43]. Einige Studien untermauern die obige Theorie indem sie zeigen, dass disseminierte Tumorzellen im Knochenmark auch viele Jahre nach Operation und Radio- oder Chemotherapie noch existieren können und dass ihr Vorhandensein mit einem erhöhten Risiko für Metastasenbildung einhergeht [38].

##### **Lokalisation von disseminierten Tumorzellen**

Disseminierte Tumorzellen wurden bisher im Knochenmark, in Lymphknoten und im peripheren Blut detektiert [41]. Es ist möglich, dass sich disseminierte Tumorzellen in Geweben mit Filterfunktion, wie Lymphgewebe und Knochenmark besonders häufig

verfangen [44]. Beim Mamma- und Prostatakarzinom finden sich auch Makrometastasen vorwiegend im Knochenmark, dies gilt jedoch nicht für das Harnblasenkarzinom. Beim Harnblasenkarzinom machen Knochenmarksmetastasen einen wesentlich geringeren Anteil aus und andere Lokalisationen wie Lunge und Leber spielen eine größere Rolle [40]. Trotzdem stellt sich die Frage, ob disseminierte Tumorzellen im Knochenmark auch beim Harnblasenkarzinom eine relevante Aussagekraft bezüglich der allgemeinen Prognose besitzen.

#### 4.2.3. Prognostische Relevanz von Disseminierten Tumorzellen

##### **“Parallel Progression Model”**

Das „Parallel Progression Model“ vertritt die These, dass das Ablösen und Streuen von Tumorzellen schon zu einem sehr viel früheren Zeitpunkt und in wesentlich niedrigeren Tumorstadien geschieht, als lange angenommen wurde. Die abgelösten Tumorzellen entwickeln gemäß der Theorie ihr volles malignes Potential und die Fähigkeit zur Metastasenbildung unabhängig vom Primärtumor in der Ferne [40, 45]. Das „Parallel Progression Model“ impliziert, dass zirkulierende und disseminierte Tumorzellen daher einen weiteren, vom Tumorstadium unabhängigen, prognostischen Faktor darstellen [40, 45]. Klinische Befunde, die diese Theorie des „Parallel Progression Model“ bestärken, sind Metastasenbildung in frühen Tumorstadien (T1-2) beispielsweise beim Mammakarzinom sowie eine relative hohe Anzahl von „Cancer of unknown Primary“ (5-10% der Krebsdiagnosen in USA und Europa). Auch verschiedene Studien zum Harnblasenkarzinom, in denen das Auftreten von disseminierten Tumorzellen nicht mit dem Tumorstadium korreliert, stützen diese Theorie [37, 40, 46, 47].

##### **Bisherige Studienergebnisse**

Eine prognostische Relevanz für disseminierte Tumorzellen im Knochenmark ist für das Mammakarzinom belegt, zu welchem es diesbezüglich auch die meisten Studien und Daten gibt [38, 48]. Studien zum Melanom-, Brust- und Lungenkrebs zeigen, dass hohe Zahlen disseminierter Tumorzellen mit verstärktem Krankheitsprogress und niedrigeren Überlebensraten assoziiert sind [38, 45]. Die Arbeitsgruppe um Retz konnte 2011 zum ersten Mal auch für das Harnblasenkarzinom zeigen, dass der Nachweis von disseminierten Tumorzellen (mittels CK-20 RT-PCR) im Knochenmark prognostisch signifikant ist, besonders bei Patienten mit N0-Status [37, 40]. Experimentelle Studien mit in Mausmodelle injizierte Tumorzellen zeigen jedoch, dass nur aus einem winzigen Teil (die Angaben schwanken hierzu je nach Studie von < 0,01-0,05%) der zirkulierenden bzw. disseminierten Tumorzellen klinisch relevante Mak-

rometastasen entstehen [43, 44]. Auch in Brustkrebs-Studien entwickelt die Mehrheit der Patientinnen mit disseminierten Tumorzellen im Verlauf keine Fernmetastasen [49].

### **Potential disseminierter Tumorzellen**

Die Erkenntnisse über „tumor cell dormancy“, die Theorie des „Parallel Progression Model“, die aufgeführten Studienergebnisse sowie eine Metaanalyse von Nawroth et al. zu diesem Thema zeigen, dass disseminierte Tumorzellen im Knochenmark beim Harnblasenkarzinom sehr wahrscheinlich einen unabhängigen, prognostischen Risikofaktor darstellen. Die Detektion disseminierter Tumorzellen wird daher im klinischen Alltag immer mehr Bedeutung bekommen [50]. Dabei wird neben der reinen Detektion der Tumorzellen auch die quantitative Ermittlung der Tumorzellen sowie ihre detaillierte, molekularegenetische Charakterisierung eine Rolle spielen um einschätzen zu können, welche Patienten tatsächlich gefährdet sind Metastasen zu entwickeln [41].

#### **4.2.4. Detektion von disseminierten Tumorzellen**

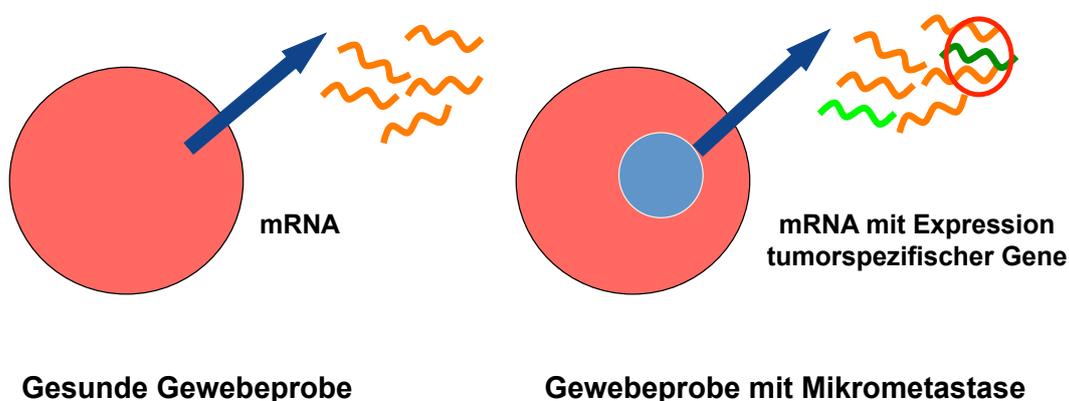
Die Detektion von disseminierten Tumorzellen ist eine große technische Herausforderung. Die Immunzytochemie und Reverse Transkriptase Polymerasekettenreaktion sind die zwei wichtigsten Methoden, die in den letzten Jahren hierfür angewandt wurden [41, 51].

### **Immunzytochemie**

Bei dieser Methode wird das Proteinexpressionsmuster beurteilt [38]. Gewebsspezifische Proteine (Markerproteine) werden hierfür mit markierten, monoklonalen Antikörpern sichtbar gemacht. Diese werden vom Ursprungsgewebe des Primärtumors und somit in der Regel vom Primärtumor und den disseminierten Tumorzellen exprimiert, nicht jedoch von den umgebenden Zellen. Durch ihre immunzytochemische Markierung kann man die Tumorzellen von normalen Körperzellen unterscheiden und detektieren [41]. Allgemein variieren die Detektionsraten hierbei sehr stark. Sie liegen bei Brustkrebspatientinnen zwischen 20-40 %, bei Prostatakarzinompatienten zwischen 20-50% [52]. Ursache hierfür sind die vielen verschiedenen Antikörper und ihre unterschiedlichen Affinitäten, Sensitivitäten und Spezifitäten, sowie die unterschiedlichen Verfahren zur Visualisierung und Auswertung [38]. Ein weiterer Nachteil ist, dass die Antikörper auch mit normalen Körperzellen kreuzreagieren und somit falsch positive Ergebnisse produziert werden [53, 54]. Auch die quantitative Auswertung stellt sich bei der Immunzytologischen Untersuchung schwierig dar [44].

## Molekulare Verfahren

Aus diesem Grund hat der molekulare Nachweis von disseminierten Tumorzellen mittels Polymerasekettenreaktion (PCR) seit den 1990 Jahren immer mehr an Bedeutung gewonnen. Das Verfahren der Polymerasekettenreaktion basiert auf der Amplifikation von Genabschnitten (Markergene), eine genaue Erläuterung des Verfahrens findet sich im Abschnitt 5. Material und Methoden. Es wird hierbei mRNA von Genabschnitten vervielfältigt und nachgewiesen, die vom Ursprungsgewebe des Primärtumors, und in der Regel vom Primärtumor und von disseminierten Tumorzellen produziert wird, nicht aber von den gesunden umgebenden Zellen. Der Nachweis dieser mRNA in Geweben, wo diese normalerweise nicht vorkommt, bedeutet das Vorhandensein von disseminierten Tumorzellen. Der Nachteil der PCR ist, dass bei der Isolierung der mRNA die Zelle oder das verwendete Gewebe vollständig solubiliert wird und man die Zellen anschließend nicht mehr morphologisch beurteilen kann [38]. Das Verfahren hat jedoch auch große Vorteile gegenüber dem Immunzytochemischen Proteinnachweis. Die molekularen Verfahren weisen eine wesentlich höhere Sensitivität auf, die bis zum Nachweis einzelner Tumorzellen reichen kann. Des Weiteren kann die mRNA teilweise auch noch bei stark entdifferenzierten Tumorzellen nachgewiesen werden, wohingegen die Expression des Proteins selbst bei diesen Tumorzellen oft nicht mehr nachgewiesen werden kann [53]. Eine Weiterentwicklung der qualitativen Reverse-Transkriptase Polymerasekettenreaktion (RT-PCR) ist die quantitative real-time Polymerasekettenreaktion (qPCR). Hierbei kann über kontinuierliche Messungen während der Reaktion z.B. über einen Fluoreszenzfarbstoff ein Rückschluss auf die vormals vorhandene mRNA-Menge erfolgen. Es ist eine quantitative Einschätzung der disseminierten Tumorzellen möglich [55].



**Abbildung 4.3: Mikrobiologischer Nachweis von Mikrometastasen**

### **Limitierung beider Verfahren**

Bei beiden Verfahren, der Immunhistochemie und der PCR, werden gewebsspezifische Marker (Protein oder mRNA) nachgewiesen, die vom Ursprungsgewebe des Primärtumors produziert werden. Häufig exprimieren die malignen Zellen Proteine oder zumindest mRNA ihres Ursprungsgewebes weiter. Die Expression dieser spezifischen Marker kann jedoch während der Karzinogenese und Entdifferenzierung der Tumorzellen auch gänzlich verloren gehen [53]. Dies bedeutet, dass manche Tumorzellen aufgrund ihres veränderten Genexpressionsmusters vor allem bei Verwendung eines einzelnen Markers nicht detektiert werden können, was zu falsch negativen Ergebnissen führt.

### **Zirkulierende Tumorzellen vs. Disseminierte Tumorzellen**

Der Nachweis disseminierter Tumorzellen erfolgt meist in peripherem Blut, Knochenmark oder regionalen Lymphknoten. Nur sehr wenige Studien haben bisher die prognostische Aussagekraft von disseminierten Tumorzellen im Knochenmark und zirkulierenden Tumorzellen im peripheren Blut im selben Patientenkollektiv miteinander verglichen. Bei Brustkrebspatientinnen in frühen Tumorstadien, ließ sich für die Detektion von disseminierten Tumorzellen im Knochenmark eine höhere prognostische Relevanz nachweisen als für zirkulierende Tumorzellen im peripheren Blut [49]. Einige Studien geben an, dass die Detektionsraten im Knochenmark höher sind als im peripheren Blut, da die Überlebensbedingungen für die Tumorzellen dort günstiger seien und/oder sich aufgrund der Filterfunktion des Knochenmarks dort mehr Tumorzellen befinden. Sie empfehlen daher die Untersuchung im Knochenmark oder in beiden Kompartimenten [47, 56].

## 4.3. Molekularer Marker

Verschiedene molekulare Marker wurden bislang beim Harnblasenkarzinom zur Detektion von Tumorzellen untersucht. Zu den typischen epithel- bzw. urothelspezifischen Markern zählen die Cytokeratine, die Muzine sowie die Uroplakine [57]. Im Folgenden werden die von uns in dieser Studie getesteten Marker vorgestellt. Bei der Beschreibung der Marker wird auch auf die Eigenschaften, die Funktion und das Vorkommen des Genprodukts (des Proteins) eingegangen. Gegenstand unserer Untersuchungen war jedoch ausschließlich die Genexpression der Marker, d.h. der Nachweis ihrer mRNA.

### 4.3.1. CK20

#### **Charakterisierung von Cytokeratin 20**

Cytokeratin 20 (CK20) ist der am häufigsten zur PCR-basierten Detektion von disseminierten Tumorzellen eingesetzte Marker beim Harnblasenkarzinom [58]. Das Protein CK20 gehört wie die anderen 19 Cytokeratine zu den Intermediärfilamenten. Als Stützproteine sind sie eine Hauptkomponente des Zytoskeletts eukaryotischer Zellen und tragen zur Stabilisierung der Zellstruktur und Zellform bei. Sie werden vorwiegend in Epithelzellen exprimiert und liegen je nach Zelltyp und Differenzierungsgrad in unterschiedlichen Anteilen vor [59, 60]. CK20 wird dabei relativ spezifisch in sekretorisch und resorbtiv aktiven, sowie lumenwärts gerichteten Epithelien [60] exprimiert. Bereits Anfang der 1990er Jahre, konnten Moll et al. immunhistochemisch eine starke CK20-Proteinexpression in Gastrointestinalem Epithel, in den Superficialzellen des Urothels, den Merkelzellen der Haut und den Geschmacksknospen der Zunge nachweisen. Eine geringe Expression wurde auch in retikulären Zellen des Thymus, in Gallenblasen- und Pankreasgangepithel, in Bronchialepithel und in einer kleinen Subpopulation von Drüsenzellen der Prostata gefunden. Auch Malignome, die diesen Geweben entstammen, wie kolorektale Karzinome, Merkelzellkarzinome und Urothelkarzinome, sowie einige Pankreas- und Gallenblasenkarzinome, zeigten eine konstante CK20-Proteinexpression. Das Urothelkarzinom zeigte dabei eine stabile und einheitliche CK20-Proteinfärbung [60, 61]. Neben der Proteinexpression wurde in den folgenden Jahren auch die Genexpression von CK20 untersucht. Die Untersuchungen mittels Reverse Transkriptase Polymerasekettenreaktion zeigten hierbei analog zu den immunhistochemischen Befunden eine konstante CK20-Expression in gesundem gastrointestinalem Epithel und Urothel, sowie in Kolorektalen Karzinomen und Urothelkarzinomen [47, 62, 63]. Zusammenfassend

findet sich eine konstante Gen- und Proteinexpression von CK20 in normalem Urothelgewebe sowie in Urothelkarzinomen und -metastasen. Zellen mesenchymalen Ursprungs exprimieren kein CK20. Es wurden konkret Blut und Knochenmark mittels RT-PCR [59] sowie immunhistochemisch Muskel-, Nerven- und Gefäßendothelzellen, Lymphknoten, Bindegewebe, Leber-, Nieren- und Pankreasparenchym, Speicheldrüsen- und Brustdrüsengewebe und Gewebe des weiblichen Genitaltrakts negativ auf CK20 getestet [61]. Eine Einschränkung stellen hierbei jedoch Granulozyten dar, die geringe Mengen an CK20-mRNA exprimieren können, was eine sogenannte Hintergrundtranskription bewirkt. Dies wurde bei Experimenten im peripheren Blut und Knochenmark relevant. Jung et al. modifizierten daher die bis dahin verwendete Methode noch einmal, indem sie die zu untersuchenden mononukleären Zellen dieser Medien über einen Ficoll-Gradienten von den Granulozyten trennten [56, 64, 65].

Für Kolon-, Magen- und Pankreaskarzinompatienten und Mammakarzinompatientinnen konnte bislang eine signifikant schlechtere Prognose bei PCR-Nachweis von CK20-positiven Zellen in Blut oder Knochenmark nachgewiesen werden [56, 66, 67].

#### **CK20 als Epithelmarker bei Patienten mit Harnblasenkarzinom**

Bei Patienten mit Harnblasenkarzinom wurde CK20 erstmals 1999 von Fujii et al. und 2000 von Gudemann et al. in peripherem venösen Blut getestet [68, 69]. Die Studien von Fujii und Gudemann enthielten jedoch noch keine Nachsorgedaten, sodass keine Aussage über die prognostische Relevanz der Ergebnisse getroffen werden konnte. In den letzten 10 Jahren wurden einige Studien durchgeführt, die CK20 mittels qualitativer oder quantitativer PCR in peripherem Blut, Knochenmark und auch in regionalen Lymphknoten untersuchten. Die meisten Studien gibt es dabei zu zirkulierenden Tumorzellen im peripherem Blut [37, 70]. Die Mehrheit der Studien sowie Reviews und Metaanalysen bewerten CK20 als potentiell geeigneten Marker, zusätzlich zu den klassischen Prognosefaktoren [37, 46, 47, 50, 58, 71]. Die beiden Reviews über CK20-gestützte Detektion von Tumorzellen im peripheren Blut [58] bzw. Lymphknoten [71] bemängelten jedoch die dürftige Datenlage über die prognostische Aussagekraft CK20-positiver Zellen im peripheren Blut bzw. Lymphknoten. Sie forderten weitere Studien, die die Korrelation dieser Ergebnisse mit dem Krankheitsverlauf bzw. den Überlebensraten der Patienten untersuchen. 2012 wurden diesbezüglich zwei Studien veröffentlicht. Gazquez et al. konnten hierbei einen klaren Trend zu schlechteren Tumorspezifischen- und Rezidivfreien Überlebensraten bei Patienten mit CK20-positiven Lymphknoten im Vergleich zu Patienten mit CK20-negativen Lymphknoten aufzeigen [72]. Marin-Aguilera et al. konnten hingegen für CK20-positive Zellen im peripheren Blut keine prognostische oder diagnostische Re-

levanz nachweisen. Sie hatten peripher venöses Blut von Blasenkarzinompatienten zu mehreren Zeitpunkten nach Zystektomie untersucht und nach einer Korrelation mit dem Auftreten von Fernmetastasen geschaut [73]. 2001 wurde CK20 erstmals als Marker für epitheliale Tumorzellen im Knochenmark von Blasenkarzinompatienten getestet. Retz et al. untersuchten hierfür 20 Knochenmarksproben und 20 Blutproben von Blasenkarzinompatienten mittels CK20-spezifischer RT-PCR. Sieben der 20 Knochenmarksproben (35%) und zwei der peripheren Blutproben waren dabei CK20-positiv. Die Blutproben der gesunden Probanden waren sämtlich CK20-negativ. Die CK20-Detektionsrate im Knochenmark der Blasenkarzinompatienten war unabhängig von den vorliegenden Tumorstadien [47]. 2011 veröffentlichten Retz und Rotering eine Studie über den Einfluss von CK20 positiven Tumorzellen im Knochenmark von Patienten mit Harnblasenkarzinom auf Krankheitsverlauf und Überlebensraten. Sie beobachteten 51 Patienten nach Zystektomie und verglichen die 5- und 7- Jahres Überlebensraten der Patienten mit und ohne CK-20 positiver Zellen im Knochenmark. Das Vorhandensein von CK20 positiven Zellen erwies sich für alle drei Endpunkte, Rezidivfreies Überleben, Tumorspezifisches Überleben und Gesamtüberleben, als ein vom Tumorstadium unabhängiger, signifikanter prognostischer Marker [37]. Die Ergebnisse von Retz und Rotering gilt es zunächst in einer größeren Patientenkohorte zu bestätigen. Bereits in dem Artikel von Retz und Rotering wird auf den Nachteil der damals verwendeten qualitativen PCR hingewiesen. In Zukunft sei eine quantitative real-time PCR anzustreben, die einen Rückschluss auf die Menge an disseminierten Tumorzellen oder zumindest die Menge des Markers im Knochenmark erlaubt [37, 40].

#### 4.3.2. Weitere Marker

##### **CK14**

Cytokeratin 14 gehört ebenfalls zur Familie der Cytokeratine. Man weiß jedoch deutlich weniger über seine Funktion, unter anderem weil CK14 Knock-out Mäuse sofort postnatal versterben. CK14 wird zusammen mit CK5 in der mitotisch aktiven Basalschicht von mehrschichtigen Epithelien exprimiert. Die beiden Cytokeratine dienen zum Einen der Aufrechterhaltung der Zellform. CK14 und CK5 modulieren aber vor allem die Zelldifferenzierung und induzieren bzw. erhalten die Proliferationsfähigkeit der Basalzellen. Es ist belegt, dass eine CK14-Downregulierung zu verminderter Tumorgenese führt [74]. Immunhistochemisch konnte gezeigt werden, dass dafür nahezu alle Plattenepithelkarzinome erhöhte Level an CK14 (und CK5) exprimieren. Hierzu zählen die Plattenepithelkarzinome von Ösophagus, Kopf/Hals, Lunge, Cervix, Genitale. Die CK14-Expression von allen anderen Tumorarten wie z.B. Adeno-

karzinomen ist deutlich geringer bzw. nicht vorhanden. Auch das Urothelkarzinom wies immunhistochemisch nur in etwa 20% der Fälle eine CK14-Expression auf [74-76]. Volmer et al. konnten jedoch zeigen, dass CK14-positive Harnblasenkarzinome mit einem sehr niedrigen Differenzierungsgrad und einer schlechten Prognose einhergehen verglichen mit CK14-negativen Harnblasenkarzinomen [77]. Der Nachweis disseminierter Tumorzellen bei Patienten mit Harnblasenkarzinom mittels CK14 wurde bislang nicht untersucht.

### **CK17**

Wir testeten noch einen weiteren Marker aus der Cytokeratin-Familie, das Cytokeratin 17. Das CK17-Protein wird lediglich von den Basalzellen komplexer Epithelien exprimiert. Hierzu zählen myoepitheliale Drüsenepithelzellen, Urothel und mehrreihiges Epithel des Respirationstrakts [78]. Aufgrund der topographischen Besonderheiten wird vermutet, dass CK17 in bestimmten epithelialen Stammzellen Einfluss auf deren Differenzierung zu komplexen Epithelien hat [79]. Des Weiteren spielt CK17 wahrscheinlich bei der Bildung und Anordnung der Hautanhangsgebilde (Haare, Nägel, Drüsen) eine Rolle [80]. Einige Tumorentitäten weisen eine CK17-Expression auf, hierzu zählen das Mamma-, Cervix-, Colon-, Magen- und Urothelkarzinom, sowie das orale Plattenepithelkarzinom. Beim Mamma- und Magenkarzinom erwies sich der immunhistochemische Nachweis von CK17 bereits als prognostisch relevant [81-85]. Guelstein et al. konnten 1993 in allen von ihnen untersuchten Urothelkarzinomproben CK17 immunhistochemisch nachweisen. Die CK17-Expression stieg dabei zunächst mit Entdifferenzierung der Tumorzellen an. Sehr stark entdifferenzierte Tumore, G3- und aplastische Urothelkarzinome, hatten jedoch wiederum eine sehr variable und teilweise stark reduzierte CK17-Expression [86]. He et al. identifizierten 2009 ein hoch kanzerogenes Zellkompartiment innerhalb des Urothelkarzinoms. Die Zellen dort ähnelten benignen basalen Urothelstammzellen und exprimierten wie diese unter anderem auch CK17 [87]. Zur Detektion disseminierter Tumorzellen bei Patienten mit Harnblasenkarzinom wurde CK17 bislang nicht verwendet.

### **UPK2**

Uroplakin 2 (UPK2) ist nach CK20 der am zweithäufigsten untersuchte Marker und hat eine hohe Sensitivität und Spezifität [58]. Uroplakine stellen die vier wichtigsten Transmembranproteine (UPK 1a, 1b, 2 und 3) der „Asymmetric Unit Membrane“ dar. Diese bildet mit den Deckzellen die oberflächlichste Schicht des Urothels und unterstützt dessen Dehnungsvermögen und Festigkeit [88]. Die Uroplakinexpression ist sehr spezifisch für das Urothel und seine Neoplasien. Anders als die anderen Ur-

oplakine, ist die Expression von UPK2 gewebsspezifisch auf das Urothel begrenzt. Auch während der Differenzierung von Tumoren bleibt die UPK2-Genexpression in der Regel erhalten [71, 89]. UPK2 ist daher in den letzten Jahren Gegenstand vieler Studien zum Blasenkarzinom gewesen und erwies sich darin als gut geeigneter epithelialer Marker zur Detektion von disseminierten Blasentumorzellen [90]. 2003 gelang es Yuasa et al. und Osman et al. mit Hilfe der RT-PCR Technik disseminierte Blasentumorzellen anhand von UPK2- Expression im peripheren Blut nachzuweisen [91, 92]. Copp et al. konnten wenig später erstmals eine deutlich schlechtere progressionsfreien Überlebenszeit bei Blasenkarzinompatienten mit UPK2-positiven Lymphknoten im Vergleich zur UPK2-negativen Patientengruppen nachweisen [93]. UPK2 positive Zellen in Lymphknoten haben sich auch in einer Multivariantanalyse als signifikanter Prognosefaktor für Krankheitsrekurrenz herausgestellt [71]. Für UPK2-positive Zellen im Blut konnten Marín-Aguilera et al. jedoch bezogen auf die Entwicklung von Fernmetastasen analog zu CK20 keine prognostische Signifikanz feststellen [73]. Studien, die UPK2 zur Detektion disseminierter Zellen im Knochenmark getestet haben, sind bislang keine erschienen.

### **SPINK1**

Der „Serine Protease Inhibitor, Kazal Typ 1“ (SPINK1), ist auch unter den Bezeichnungen „Pancreatic Secretory Trypsin Inhibitor“ (PSTI) oder „Tumor-Associated Trypsin Inhibitor“ (TATI) bekannt. Als Trypsin-Inhibitor ist seine Funktion die vorzeitige Trypsin-katalysierte Aktivierung von Pankreas-Proenzymen zu verhindern und wird in großen Mengen im Pankreas exprimiert. SPINK1 ist jedoch auch an inflammatorischen Prozessen und der Tumorgenese beteiligt und wird in diversen Tumorentitäten über- oder unterexprimiert. Auffällig ist dabei, dass bei einigen Tumorentitäten wie dem Ovarial-, Prostata- und Colorektalen Karzinom eine Überexpression mit einem ungünstigen Krankheitsverlauf assoziiert ist, hingegen beim Harnblasen- und Magenkarzinom eine verminderte SPINK1- Expression mit einer schlechten Prognose einhergeht. Dies lässt darauf schließen, dass v.a. ein Ungleichgewicht zwischen Trypsin und SPINK1 eine Rolle bei der Tumorprogression spielt. Bei einer Überexpression kann SPINK1 durch seine dem Epidermal Growth Factor (EGF) ähnelnde Struktur dessen Rezeptor und somit Wachstum stimulieren [94]. SPINK1 regt des Weiteren die Zellmigration an und führt hierüber zu Tumorinvasion und –dissemination [95]. Eine Unterexpression von SPINK1 führt zu einem Überwiegen von Trypsin. Trypsin aktiviert wiederum Matrix-Metalloproteinasen und Kollagenasen, was ebenso zu Tumorinvasion und -progression führt [94, 96]. 2006 untersuchten Hotakainen et al. die SPINK1-Genexpression in 10 gesunden Urothel- und 28 Blasenkarzinomproben mittels RT-PCR. In allen benignen Urothelproben sowie den pTa

und pT1-Tumoren wurde SPINK1-mRNA detektiert. Von den fünf muskelinvasiven Tumorspezimen war nur eines SPINK1-positiv [96]. Eine spätere Studie, die SPINK1 immunhistochemisch untersucht hatte, beschrieb analog eine starke SPINK1-Proteinexpression in allen Urothelproben. 71% der Tumorspezimen und 90% der untersuchten Lymphknotenmetastasen zeigten jedoch auch hier eine verminderte oder keine SPINK1-Proteinexpression [97]. In beiden Studien und auch bei Rink et al. korreliert der Verlust oder die Verminderung der SPINK1 Protein- oder Genexpression mit einem aggressiveren Tumorverhalten und kürzeren Rezidivfreien-Überlebenszeiten. Dies stellte allerdings in allen drei Studien keinen von den klassischen Prognosefaktoren unabhängigen Faktor dar [96-98]. Zur Detektion von disseminierten Tumorzellen wurde SPINK1 bislang nicht herangezogen. Bei der Auswahl des Markers für unsere Studie nahmen wir in Kauf, dass ein nicht unbedeutender Anteil der disseminierten Tumorzellen unter Umständen keine SPINK1-mRNA exprimiert.

## **TMPRSS2**

Die „Transmembrane Protease Serine 2 (TMPRSS2) ist wie der Name sagt eine transmembrane Serinprotease. Durch ihre Lage und Struktur dient sie vermutlich als Signalübermittler für spezifische Liganden, die extrazellulär an ihren Rezeptor binden. Ihre Expression ist androgenabhängig reguliert [99]. Mittels Northern Blot wurde eine Expression von TMPRSS2-mRNA in humanem intestinalem Epithel, Prostata-drüsenepithel sowie Speicheldrüsenepithel detektiert. Im Mausmodell wurde zusätzlich noch TMPRSS2-mRNA im Urothel und Epithel des Respirationstrakts nachgewiesen. Die Expression wurde als konstant beschrieben [100]. Bei der Untersuchung von benignem hyperplastischen Prostatagewebe und Prostatakarzinomgewebe fiel auf, dass die Karzinomzellen höhere Level an TMPRSS2 exprimierten. Dies galt insbesondere für stark entdifferenzierte und untherapierte Prostatakarzinome [99, 101]. Bi et al. untersuchten 2010 die TMPRSS2-Expression von Prostatakarzinomen mittels qPCR. Es bestand dabei eine signifikante Assoziation zwischen einer hohen TMPRSS2-Expression auf der einen und fortgeschrittenen, aggressiven Prostatakarzinomen mit niedrigen Überlebensraten auf der anderen Seite. TMPRSS2 wurde daher als neuer prognostischer Marker für das Prostatakarzinom vorgeschlagen [102]. Als Marker beim Harnblasenkarzinom wurde TMPRSS2 bislang weder zur Untersuchung von Primärtumoren noch zur Detektion von disseminierten Tumorzellen verwendet.

## 4.4. Fragestellung der Arbeit

### **Aktueller Standpunkt**

Tumorstadium, Lymphknotenstatus und Gefäßinvasion sind bislang die einzigen unabhängigen und klinisch angewandten Prognosemarker beim nichtmetastasierten Harnblasenkarzinom [103, 104]. Die jüngsten Entwicklungen erlauben uns mittlerweile die Detektion von disseminierten Tumorzellen, Jahre bevor Fernmetastasen auftreten und die Krankheit damit in ein unheilbares Stadium übergeht. Man hofft, diese Informationen zukünftig zusätzlich zu den bisherigen Prognoseparametern nutzen zu können, um das individuelle Risiko und die individuelle Prognose eines Patienten besser einschätzen und klinisches Understaging und Untertherapien vermeiden zu können [38, 58].

### **Ziel dieser Arbeit**

Ziel dieser Arbeit war es bei Patienten mit lokal infiltriertem Harnblasenkarzinom zum Zeitpunkt der primären Therapie, d.h. Zystektomie und Lymphadenektomie, disseminierte Tumorzellen im Knochenmark mittels einer quantitativen real-time PCR (qPCR) nachzuweisen. Hierzu wurden die Knochenmarksproben von 117 Patienten auf den Expressionsstatus der molekularen Marker CK20, CK14, CK17, UPK2, SPINK1 und TMPRSS2 untersucht. Anschließend wurden die Rezidivfreien-, und die Gesamtüberlebensraten von Marker-positiven und Marker-negativen Patienten miteinander verglichen. Es soll untersucht werden, ob der Nachweis von disseminierten Tumorzellen bzw. der Nachweis eines Markers einen unabhängigen Prognosefaktor darstellt.

### **Arbeitshypothese**

- Nullhypothese H0: Es besteht bezüglich der Überlebensraten kein Unterschied zwischen der Marker-positiven und den Marker-negativen Gruppe
- Alternativhypothese H1: Es besteht bezüglich der Überlebensraten ein Unterschied zwischen der Marker-positiven und den Marker-negativen Gruppe.

Die Alternativhypothese entsprach unserer Arbeitshypothese. Nullhypothese und Alternativhypothese galten für jeden einzelnen Marker in gleicher Form.

### **Erkenntnisgewinn gegenüber früheren Arbeiten**

In dieser Studie versuchten wir, die Ergebnisse von Retz und Rotering für CK20 in einem größeren Patientenkollektiv zu reproduzieren und zu bestätigen. Methodisch wurde jedoch statt einer qualitativen eine quantitative PCR angewendet. Damit verwendeten wir ein sensitiveres Verfahren, welches uns zusätzlich differenziertere In-

formationen lieferte. Außerdem wurde die Expression eines Multi-Marker Panels getestet, wobei neben zwei etablierten Markern auch vier zusätzliche molekulare Marker eingeschlossen wurden, die in diesem Kontext bislang noch nicht untersucht worden sind.

### **Ausblick für den klinischen Alltag**

Langfristiges Ziel wäre die Einführung und Etablierung einer molekularen Analyse in der klinischen Routinediagnostik. Disseminierte Tumorzellen und Mikrometastasen könnten so im Idealfall frühzeitig, bevor sie durch bildgebende Verfahren detektierbar sind, erkannt werden. Falls diese sich als prognostisch relevant erweisen, könnte diese Information herangezogen werden um die Notwendigkeit und den Nutzen einer adjuvanten Therapie zur Prävention von Fernmetastasen einzuschätzen [38, 58]. Es wäre natürlich in klinischen Studien zu testen, ob eine rechtzeitige adjuvante systemische Therapie bei Marker-positiven Patienten tatsächlich eine Heilung oder Lebensverlängerung erzielen kann. Da Radio- und Chemotherapie unter Umständen keine geeigneten Therapien gegen disseminierte Tumorzellen sind, ist auch die Wirksamkeit anderer Therapieansätze z.B. mit Antikörpern zu untersuchen.



# 5. Material und Methoden

## 5.1. Vorversuche

### 5.1.1. Referenzgene

#### **Ermittlung passender Referenzgene**

Bei Referenzgenen (Housekeeping Genes) handelt es sich im Gegensatz zu den Markergenen um Gene, die von jeder Zelle unabhängig vom Zellstadium und äußeren Einflüssen gleichmäßig exprimiert werden. Diese Referenzgene dienen uns bei der Auswertung aller qPCR-Ergebnisse als Referenzwert. Neben den sechs Markergenen CK14, CK17, CK20, UPK2, SPINK1 und TMPRSS2 wurden daher in jedem qPCR-Durchgang immer auch die folgenden Referenzgene YWHAZ, GAPDH und HPRT1 getestet. YWHAZ kodiert das 3-Monooxygenase/Tryptophan 5-Monooxygenase-Activation Protein zeta/delta. Dies ist eine bei allen eukaryotischen Zellen vorkommende hochkonservierte Aminosäuresequenz und spielt bei vielen zellulären Vorgängen eine Rolle, beispielsweise bei der Signaltransduktion [80]. Das GAPDH-Gen kodiert die Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase. Sie katalysiert bei der Glykolyse die Umwandlung von Glycerinaldehyd-3-Phosphat zu 1,3-Bisphosphoglycerat und ist für alle eukaryotischen Zellen essentiell. Das HPRT1-Gen kodiert die Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase 1 ein Enzym im Purinstoffwechsel eukaryotischer Zellen. Sie katalysiert durch die Übertragung eines Phosphoribosylrests auf die Purinbasen Adenin, Hypoxanthin, Xanthin und Guanin die Bildung von Nukleotiden.

#### **Expressionsstabilität**

Es ist wichtig Referenzgene zu verwenden, deren Ergebnisse eine möglichst geringe Variabilität zeigen. Hierfür analysierten wir mithilfe der "Bioinformatic GeNorm Analyse Software" die Expressionsstabilität der Referenzgene. Eine hohe Genexpressionsstabilität wird dabei durch einen niedrigen M-Wert (m-value) ausgedrückt. Der M-Wert stellt die durchschnittliche Abweichung der Ergebnisse eines Referenzgens dar und sollte  $\leq 0,5$  betragen. Die M-Werte lagen für YWHAZ bei 0,5075, für GAPDH bei 0,4103 und für HPRT1 bei 0,4023.

#### **Marker-Referenzgen-Kombinationen**

Bei der Auswahl passender Referenzgene ist es wichtig, dass sich die Polymerasekettenreaktionen der Referenzgene und die der Marker, wenn sie parallel im

gleichen Reaktionsgemisch stattfinden, nicht behindern. Durch eine vergleichende Analyse ermittelten wir günstige Marker-Referenzgen-Kombinationen. Hierfür wurde mit den einzelnen Markern und den einzelnen Referenzgenen jeweils separat eine qPCR durchgeführt (Mono-qPCR). Anschließend wurde eine qPCR durchgeführt, bei der im gleichen Reaktionsgemisch jeweils ein Marker und ein Referenzgen kombiniert getestet wurden (Dual-qPCR). Als cDNA wurden dabei jeweils 5ng cDNA der Blasenkarzinom-Zelllinie 647V eingesetzt. Nur wenn die Ergebnisse der Mono- und der Dual-qPCR-Durchgänge für den Marker und das Referenzgen kaum von einander abwichen, war die Kombination geeignet. Folgende Marker-Referenzgen-Kombinationen stellten sich hierbei als günstig heraus:

- CK14 – YWHAZ
- CK17 – GAPDH
- UPK2 – HPRT1

### **Primer-Limitierung**

Zur Primer-Limitierung werden die Referenzgen-Primer in wesentlich geringeren Konzentrationen eingesetzt als die Marker-Primer. Hierdurch wird die Amplifikation des Referenzgens reduziert und die Reaktionsreagenzien (beispielsweise Taq-Polymerase und dNTP's) stehen in ausreichender Menge für die Amplifikation des in viel geringeren Mengen vorkommenden Marker-Templates zur Verfügung. Dieses Prinzip wurde von uns sowohl in den Vorversuchen, als auch in den qPCR-Durchgängen mit den Patientenproben angewendet.

### **5.1.2. Versuche auf Blasenkarzinomzelllinien**

Die sechs Marker CK20, CK14, CK17, UPK2, SPINK1 und TMPRSS2 wurden zunächst mittels qPCR auf den 17 unten aufgeführten Blasenkarzinom-Zelllinien getestet. Dieser Versuch wurde von meiner Kollegin Kathrin Rathgeber durchgeführt. Die qPCR entspricht dem im Kapitel 2.3.5 Polymerasekettenreaktion aufgeführten Protokoll.

<b>Humane Blasenkarzinomzelllinien</b>			
<b>Zelllinie</b>	<b>Spezies</b>	<b>Tumorgewebe</b>	<b>Herkunft</b>
<b>S.D.</b>	human	Urothelkarzinom Primärtumor	Prof. W. Schulz
<b>VmCub1</b>	human	Urothelkarzinom Primärtumor	DSMZ: ACC-400
<b>MCHU4</b>	human	Urothelkarzinom Primärtumor	Prof. W. Schulz
<b>639V</b>	human	Urothelkarzinom Primärtumor	Prof. W. Schulz
<b>UMUC3</b>	human	Urothelkarzinom Primärtumor	ATCC: CRL-1749
<b>BFTC905</b>	human	Urothelkarzinom Primärtumor	DSMZ: ACC-361
<b>UMUC6</b>	human	Urothelkarzinom Primärtumor	HPA Catalogue No. 08090503
<b>SW1710</b>	human	Urothelkarzinom Primärtumor	DSMZ: ACC-426
<b>EJ28</b>	human	Urothelkarzinom Primärtumor	CLS
<b>486P</b>	human	Urothelkarzinom Lymphknoten-Metastase	Prof. G. Unteregger
<b>253J</b>	human	Urothelkarzinom Metastase	Prof. G. Unteregger
<b>J82</b>	human	Urothelkarzinom Primärtumor	ATCC: HTB-1
<b>RT4</b>	human	Urothelpapillom Primärtumor	DSMZ: ACC-412 ATCC: HTB-2
<b>RT112</b>	human	Urothelkarzinom Primärtumor	DSMZ: ACC-418
<b>T24</b>	human	Urothelkarzinom Primärtumor	DSMZ: ACC-376 ATCC: HTB-4
<b>H1376</b>	human	Urothelkarzinom Primärtumor	DSMZ: ACC-397 ATCC: CRL-1472
<b>647V</b>	human	Urothelkarzinom Primärtumor	DSMZ: ACC-414

**Tabelle 5.1: Humane Blasenkarzinomzelllinien**

### 5.1.3. Sensitivität

Zur Bestimmung der Sensitivität unserer qPCR wurde eine absolute Quantifizierung und eine Zellverdünnungsreihe durchgeführt. Auch diese beiden Versuche wurden von meiner Kollegin Kathrin Rathgeber durchgeführt und sind ausführlich in ihrer Dissertation „Detektion disseminierter Tumorzellen in Lymphknoten von Patienten mit invasivem Harnblasenkarzinom im Rahmen der operativen Therapie mittels radikaler Zystektomie und Lymphadenektomie“ beschrieben. Die durchgeführte qPCR entspricht ebenfalls dem im Kapitel 2.3.5 Polymerasekettenreaktion aufgeführten Protokoll.

#### **Absolute Quantifizierung**

Bei der absoluten Quantifizierung wird geprüft, wieviele Kopien der von uns gesuchten Sequenz im qPCR-Mix (20µl) vorliegen müssen, um nachgewiesen werden zu können. Die in der qPCR zu amplifizierenden Sequenzen unserer Markergene und Referenzgene wurden hierfür kloniert. In einer 10-er Potenzreihe wurden dann 0, 1, 10, 100, 1.000, 10.000 oder 100.000 Plasmidkopien in die qPCR eingesetzt. Insgesamt wurde die absolute Quantifizierung zweimal durchgeführt. Nachweisgrenze war die kleinste Plasmidanzahl, die in beiden qPCR-Durchgängen nachgewiesen werden konnte. Mit der absoluten Quantifizierung wurde eine weltweit reproduzierbare Standardisierung dieser qPCR vorgenommen. Die Ergebnisse können dabei einer exakten Anzahl an Plasmidkopien zugeordnet werden.

#### **Zellverdünnungsreihen**

Im Gegensatz zur absoluten Quantifizierung kann bei einer Zellverdünnungsreihe prinzipiell nicht auf eine genaue Anzahl an vorhandenen Templates geschlossen werden. Die Expressionsrate der Marker in den einzelnen Blasenkarzinomzelllinien ist nicht bekannt und schwankt zwischen den einzelnen Zelllinien. Die durch diese Methode ermittelte Sensitivität ist demnach von der verwendeten Blasenkarzinomzelllinie, in unserem Fall 647V, abhängig. Die Zellverdünnungsreihen entsprechen jedoch vom Versuchsaufbau wiederum genauer unseren späteren Versuchen an Knochenmarksmaterial. Hierbei müssen ebenfalls einzelne Tumorzellen, deren Markerexpression unbekannt ist, inmitten von mehreren Millionen Marker-negativen Zellen nachgewiesen werden. Zur Sensitivitätsbestimmung wurde daher für jeden Marker zusätzlich zur absoluten Quantifizierung eine Zellverdünnungsreihe erstellt. Hierfür wurden 0, 1, 10 und 100 Zellen der Blasenkarzinomzelllinie 647V auf  $10^6$  mononukleäre Zellen aus peripherem Blut (PBMCs = Peripheral Blood Mononuclear Cells)

gegeben. Es wurde eine qPCR durchgeführt und die kleinste detektierbare Zellzahl ermittelt. Die Zellverdünnungsreihe wurde insgesamt zwei Mal durchgeführt. Nachweisgrenze war die kleinste 647V Zellzahl, die in beiden qPCR-Durchgängen nachgewiesen werden konnte.

#### 5.1.4. Spezifität

##### **Kontrollgruppe**

Als Kontrollgruppe verwendeten wir 50 PBMC-Proben (PBMCs = Peripheral Blood Mononuclear Cells). Hierfür wurden von 50 gesunden Donatoren nach gründlicher Hautdesinfektion mit einem Butterfly-Punktionssystem Blutproben entnommen. Die ersten 9 ml wurden verworfen um das Risiko einer Kontamination mit Epithelzellen der Haut zu verringern. Weitere 9 ml Vollblut wurden in eine gerinnungshemmende Na-Citrat Blutmonovette abpunktiert. Aus diesen 9 ml wurden anschließend über einen Ficoll-Gradienten die mononukleären Zellen isoliert. Diese wurden identisch zu den mononukleären Zellen aus den Knochenmarksproben der Studienteilnehmer behandelt, nach der Aufarbeitung wurde mit ihnen eine qPCR für die sechs Marker durchgeführt. Diese PBMC-Proben sind nicht equivalent zu den Knochenmarksproben der Studienteilnehmer. Wir wählten dennoch diese Kontrollgruppe, da eine Knochenmarkspunktion ein deutlich invasiveres Verfahren darstellt und bei Gesunden ohne medizinische Indikation nicht einfach durchgeführt werden kann.

## 5.2. Patientenkollektiv

### 5.2.1. Studienprotokoll

#### **Einwilligung**

Das Studienprotokoll wurde von der Ethikkommission geprüft und positiv beschieden. Alle Patienten erhielten vor ihrer schriftlichen Einwilligung eine umfassende Aufklärung sowie ausreichend Bedenkzeit. Die Patienten konnten und können ihre Einwilligung jederzeit widerrufen, ohne dass dies Einfluss auf die Behandlung hatte und hat.

#### **Einschlusskriterien**

An der Studie konnten seit September 2007 alle Patienten der Abteilung für Urologie im Klinikum Rechts der Isar München teilnehmen, die an einem Harnblasenkarzinom erkrankt waren und bei welchen eine radikale Zystektomie mit Lymphadenektomie in Narkose geplant war. Ausgeschlossen waren minderjährige Patienten, Frauen im gebärfähigen Alter, sowie Patienten mit Notfall-Operationen.

## 5.2.2. Therapieplan

### Zystektomie und Lymphadenektomie

Bei allen Patienten war eine radikale Zystektomie mit Lymphadenektomie in Narkose geplant gewesen. Die Absetzungsränder von Urethra und Uretern wurden noch während der Operation mittels Schnellschnittverfahren auf Tumorzellen untersucht und gegebenenfalls nachreseziert. Die entfernten Organe und Gewebe selbst, wie Blase, Prostata, Lymphknoten- und Fettgewebe wurden nach der Operation dem Institut für Pathologie der Technischen Universität München übergeben und dort histologisch untersucht.

### Chemotherapie

Allen Patienten wurde, die von den EAU-Leitlinien empfohlene, neoadjuvante Chemotherapie angeboten. Den Patienten mit Tumorstadium pT3-4 und/oder Lymphknotenstatus pN1-3 sowie den Patienten mit Peritonealkarzinose oder R1-Status wurde zusätzlich eine adjuvante Chemotherapie angeboten. Je nach Allgemeinzustand und Wunsch der Patienten wurden diese durchgeführt oder davon abgesehen. Das Chemotherapie-Schema bestand in der Regel aus drei oder vier Zyklen Gemcitabin 1000mg/m<sup>2</sup> an Tag 1, 8 und 15 und Cisplatin 70 mg/m<sup>2</sup> an Tag 2.

### Nachsorge

Während der Nachbeobachtungs- oder Follow-up Phase wurden die Patienten bzw. der behandelnde Arzt in Abständen von etwa einem halben Jahr telefonisch kontaktiert. Dokumentiert wurden Todesfälle und jegliche Art von Krankheitsrezidiv. Hierzu wurden die im Intervall erhobenen Befunde sowie die im Intervall durchgeführten Therapien dokumentiert.

## 5.3. Molekularer Nachweis der Marker

### 5.3.1. Knochenmarkspunktion

#### Materialien

Verbrauchsmaterialien		
Verbrauchsmaterialien	Name	Firma
Na-Citrat Blutmonovette		Sarstedt, Nümbrecht
Knochenmark-Biopsienadel	Jamshidi®-Nadel	MD Tech Inc., USA

**Tabelle 5.2: Materialien Knochenmarkspunktion**

## **Durchführung**

Die Knochenmarkspunktion wurde mit der Jamshidi-Nadel beidseits im vorderen Beckenkamm durchgeführt. Nach einer gründlichen Hautdesinfektion wurde mit einem Skalpell eine kleine Hautinzision über dem Beckenkamm gesetzt und die Jamshidi-Nadel durch diese Inzision bis auf den Beckenkamm geführt. So konnte eine Kontamination der Knochenmarksproben mit Epithelzellen der Haut verringert werden. Mit der Jamshidi-Nadel wurde in den Beckenkamm gestochen und im Idealfall 9ml Knochenmark in eine gerinnungshemmende Na-Citrat Blutmonovette abpunktiert.

### **5.3.2. Separation und Lyse von kernhaltigen Zellen**

#### **Verfahren**

Die mononukleären Zellen des Knochenmarkpunktates wurden über eine Dichtegradientenzentrifugation isoliert. Wir verwendeten hierfür die Methode nach Boyum et al. mittels Ficoll-Gradienten [105]. Ficoll ist ein Saccharosepolymer, mit einer Dichte von 1.077 g/ml. Die mehrkernigen Granulozyten sowie die bei der Zentrifugation zerplatzten Erythrozytenfragmente haben eine höhere Dichte als Ficoll und sinken darin nach unten. Mononukleäre Zellen, wie Monozyten, Lymphozyten und Tumorzellen, aber auch Thrombozyten haben hingegen eine niedrigere Dichte und schwimmen in der Interphasenschicht der Ficoll-Trennlösung oben auf. Darüber befindet sich eine klare Plasmaschicht ohne Zellen. Die Interphasenschicht mit den mononukleären Zellen, Trombozyten und eventuellen disseminierten Tumorzellen wird für die weiteren Versuche verwendet. Dieses Verfahren erhöht durch die Entfernung von Erythrozyten und Granulozyten die Spezifität der Untersuchung. Granulozyten exprimieren in kleinen Mengen CK20 und könnten daher bei diesem Marker zu falsch positiven Ergebnissen führen. Im Anschluss werden die Zellen in Trizol lysiert. Trizol enthält Guanidiniumthiocyanat und Phenol. Das Guanidiniumthiocyanat lysiert die Zellen bzw. ihre Zellmembran, sodass die RNA frei im Reagenz vorliegt. Gleichzeitig inaktiviert es RNasen und andere Enzyme. Im Phenol lösen sich DNA und Proteine.

## Materialien

Reagenzien, Verbrauchsmaterialien, Geräte		
Reagenzien	Name	Firma
Ficoll	Biocoll separating solution	Biochrom AG, Berlin
Phosphate buffered saline	PBS Dulbecco	Biochrom AG, Berlin
Türksche Lösung		Fluka Analytical, Sigma-Aldrich GmbH, Buchs
Trizol	Trizol (LS Reagent)	Invitrogen, Life Technologies, CA, USA
Verbrauchsmaterialien	Name	Firma
Pipettenspitzen 10 ml steril mit Filter Tip	Serologische Pipette 10 ml	Falcon, Becton Dickinson and Company, NJ, USA
Pipettenspitzen 1000, 200, 100 und 10 µl mit Filter Tip	SafeSeal-Tips professional 1000, 200, 100, 10 µl	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf
Röhrchen 50ml	Konisches Röhrchen 50 ml	Falcon, Becton Dickinson and Company, NJ, USA
Reaktionsgefäße 1,5 ml	SLG ® Reaktionsgefäß 1,5 ml	Süd-Laborbedarf GmbH, Gauting
Deckgläser		Superior Marienfeld GmbH & Co. KG, Lauda-Königshofen
Geräte	Name	Firma
Pipettierhilfe 10-500 ml	PIPETBOY acu	IBS Integra Biosciences GmbH, Fernwald
Pipetten 1000, 200, 100, 10 und 2,5 µl	eppendorf Reference	Eppendorf AG, Hamburg
Tischzentrifuge	Eppendorf Centrifuge 5415R	Eppendorf AG, Hamburg
Standzentrifuge für 50ml Röhrchen	Rotina 35R	Hettich Lab Technology GmbH & Co.KG, Tuttlingen
Zählkammer 0,100 mm Tiefe, 0,0025 mm <sup>2</sup>		Blau Brand, Brand GmbH & Co. KG, Wertheim
Mikroskop	Axiovert 135	Zeiss GmbH, Oberkochen

**Tabelle 5.3: Materialien zur Separation und Lyse der kernhaltigen Zellen**

### Durchführung

Die Monovette mit dem Knochenmark wurde bei Raumtemperatur gelagert und innerhalb von vier Stunden mittels eines Ficoll-Gradienten weiterverarbeitet. Alle Mate-

rialien mussten hierfür eine Temperatur von 20-25°C haben, da der Ficoll-Dichtegradient temperaturabhängig ist. Die Knochenmarksprobe wurde gut gemischt, in ein 50 ml-Röhrchen überführt und anschließend mit 15 ml PBS im Verhältnis 1:1,5 verdünnt. Danach wurden die 25 ml der nun verdünnten Probe langsam in einem weiteren 50 ml-Röhrchen über 20 ml Ficoll geschichtet. Das Vermischen beider Phasen musste dabei vermieden werden. Anschließend wurden die beiden Phasen 20 Minuten bei 800 g und 25 °C Raumtemperatur zentrifugiert. Die Interphase mit den mononukleären Zellen und eventuellen Tumorzellen wurde abpipettiert und in ein weiteres 50 ml Röhrchen überführt. Dieses wurde mit 45 ml PBS aufgefüllt und erneut 10 min bei 500 g und 25 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgegossen und das Röhrchen mit dem verbliebenen Zellpellet über eine gerillte Oberfläche gezogen um durch die Erschütterung die Zellen im Pellet zu vereinzeln. Abschließend wurden die Zellen in 1 ml PBS resuspendiert und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. 10 µl dieser Suspension wurden mit 90 µl Türkscher Lösung vermischt, in eine Zählkammer gegeben und unter 100-facher Vergrößerung im Mikroskop ausgezählt. Aus dieser Zählung wurde die absolute Zahl der isolierten Zellen errechnet. Die restliche Zellsuspension wurde nochmals 10 min bei 500 g und 4 °C zentrifugiert, der Überstand anschließend vorsichtig abpipettiert. Dem Zellpellet wurde 1 ml Trizol hinzugegeben und das Pellet durch Auf- und Abpipettieren darin lysiert. Die in Trizol lysierten Zell-Proben wurden bis zur RNA-Extraktion entweder bei 4°C gekühlt und zeitnah weiterverarbeitet oder bei -80°C gelagert.

### 5.3.3. RNA-Extraktion und Konzentrationsmessung

#### **Verfahren**

Die RNA-Isolation nahmen wir nach der Methode nach Chomczynski und Sacchi vor [47, 106]. Die einzelnen Zellbestandteile liegen hierbei in Trizol gelöst vor. Zu dieser Trizollösung wird Chloroform gegeben. Chloroform ist dichter als Wasser und hydrophob, es löst sich in Wasser nicht. Durch Schütteln und anschließende Zentrifugation erhält man eine Auftrennung in zwei Phasen. Die obere wässrige Phase enthält die wasserlösliche RNA, in der unteren Chloroformphase befinden sich Lipide, Polysaccharide, Proteine und die weniger wasserlösliche DNA. Die RNA in der wässrigen Phase wird abpipettiert und durch Zugabe von Isopropanol eine Präzipitation der RNA vorgenommen. Die wasserlösliche RNA kann aufgrund des hohen Anteils an sekundärem Alkohol nicht mehr in gelöster Form vorliegen und fällt aus. Nach mehreren Wasch- und Trockenschritten wird die RNA in DNase/RNasefreiem Aqua bidest. gelöst und steht in dieser Form weiteren Anwendungen zur Verfügung.

Die Konzentration der RNA wird mittels Spektralphotometer bestimmt. Hierbei wird bei  $\lambda=260$  nm ( $OD_{260}$ ), dem Absorptionsmaximum der RNA die optische Dichte gemessen. Eine  $OD_{260}$  von 1 entspricht einer RNA-Konzentration von 40  $\mu\text{g/ml}$ . Die Reinheit der RNA kann an dem Quotienten aus  $OD_{260}$  und  $OD_{280}$  abgelesen werden, bei  $\lambda=280$  nm absorbieren v.a. Proteinen. Bei reiner RNA liegt ein Quotient aus  $OD_{260}$  und  $OD_{280}$  von etwa 2,0 vor. Ein Quotient deutlich unter 2, weist auf eine Verunreinigung z.B. mit Proteinen hin.

## Materialien

Reagenzien, Verbrauchsmaterialien, Geräte		
Reagenzien	Name	Firma
Chloroform		Fluka Analytical, Sigma-Aldrich GmbH, Buchs
Isopropanol		Apotheke Klinikum r.d.Isar, München
Äthanol 75%		Apotheke Klinikum r.d.Isar, München
RNase-Inhibitor 10000 U	RNasin Plus	Promega Corporation, WI, USA
Verbrauchsmaterialien	Name	Firma
Pipettenspitzen 1000, 200, 100 und 10 $\mu\text{l}$ mit Filter Tip	SafeSeal-Tips professional 1000, 200, 100, 10 $\mu\text{l}$	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf
Reaktionsgefäße 1,5 ml	SLG ® Reaktionsgefäß 1,5 ml	Süd-Laborbedarf GmbH, Gauting
Trockeneis		
Geräte	Name	Firma
Pipetten 1000, 200, 100, 10 und 2,5 $\mu\text{l}$	eppendorf Reference	Eppendorf AG, Hamburg
Minizentrifuge	Qik-Spin	Süd-Laborbedarf GmbH, Gauting
Tischzentrifuge	eppendorf Centrifuge 5415R	Eppendorf AG, Hamburg
Thermomixer	Thermomixer comfort eppendorf	Eppendorf AG, Hamburg
Glasexsikkator mit Anschluss an Vakuumpumpe		Firma unbekannt
Photometer	Nanodrop 2000c Spectrophotometer	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen

**Tabelle 5.4: Materialien für die RNA-Extraktion**

## **Durchführung**

Die Proben mit in Trizol gelöster RNA wurden 5 min bei 30 °C und 300 rp im Thermomixer inkubiert und aufgetaut. Es wurde je 200 µl Chloroform zugegeben und anschließend jede Probe geschüttelt bis eine milchige Trübung entstanden war. Nach einer Ruhezeit von 3 min bei 25°C, in der bereits eine erste Phasentrennung zu beobachten war, wurden die Proben 15 min bei 12.000 g und 4 °C abzentrifugiert. Nach Abschluss der Zentrifugation zeigten sich drei Phasen. Die obere, wässrig-klare Phase enthielt die gewünschte RNA und wurde in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß abpipettiert. Zum Fällern der RNA wurde dem 400-600 µl RNA-haltigem Überstand 500 µl Isopropanol zugegeben und durch Auf- und Abpipettieren gut vermischt. Das Gemisch wurde nun für 10 min bei 25°C ruhen gelassen und anschließend 10 min bei 12.000 g und 4 °C zentrifugiert. Die nun ausgefällte RNA bildete auf dem Boden ein weißes gelatinöses Pellet. Nach Entfernung des Überstands wurde dieses mit 1 ml 75%igem Ethanol gewaschen und erneut 5 min bei 7.600 g und 4 °C zentrifugiert. Nach kompletter Entfernung des Ethanolüberstandes wurde das gewaschene Pellet 5-10 min im Exsikkator vakuumgetrocknet. Anschließend wurde je nach Größe des Pellets 20-60 µl DNase/ RNasefreies Aqua bidest. zugegeben und zur Lösung des Pellets alles noch einmal 10 min bei 500 rpm und 55 °C im Thermomixer inkubiert. Danach erfolgte die Konzentrationsmessung im Spektrophotometer. Hierfür wurde 1 µl der nun gelösten RNA unverdünnt auf den Sensor des Spektrophotometers gegeben. Zur Stabilisierung der RNA wurde anschließend noch 1 µl RNasin hinzugefügt. Auf eine DNase-Behandlung über Silikatsäulchen musste aufgrund der teilweise sehr knappen Menge an RNA verzichtet werden. Die RNA-Proben wurden anschließend entweder bei 4 °C gekühlt und zeitnah weiterverarbeitet oder bei -80 °C gelagert.

### **5.3.4. Reverse Transkriptase Reaktion**

#### **Verfahren**

Ribonukleinsäure (RNA) ist als Untersuchungsmaterial sehr instabil, da sie schnell von ubiquitär vorkommenden RNasen abgebaut wird. Daher wurden pro Ansatz, eine bestimmte Menge RNA mittels Reverser Transkriptase in eine entsprechende doppelsträngige cDNA (copy DNA) umgeschrieben. Die Reverse Transkriptase synthetisiert von einem RNA-Einzelstrang ausgehend mittels ihrer RNA-abhängigen DNA-Polymerase-Aktivität einen RNA-DNA-Hybridstrang. Der RNA-Bestandteil des Hybridstrangs wird anschließend durch den RNase H-Anteil des Enzyms, einer unspezifischen Endoribonuklease hydrolysiert und entfernt. Der einzelne cDNA-Strang wird dann durch die DNA-abhängige DNA-Polymerase-Aktivität zu einem doppelsträngigen cDNA-Strang vervollständigt. Die so entstandene cDNA ist stabiler, unkompliz-

ierter aufzubewahren und somit besser als Ausgangsmaterial für die PCR geeignet als RNA.

## Materialien

Reagenzien, Verbrauchsmaterialien, Geräte		
Reagenzien	Name	Firma
cDNA-Synthese Kit	SuperScript® VILO™ cDNA Synthesis Kit - 5X VILO™ Reaction Mix - 10X SuperScript® III Enzyme - Blend	Invitrogen, Life Technologies, CA, USA
Aqua bidestillata		
Verbrauchsmaterialien	Name	Firma
Pipettenspitzen 1000, 200, 100 und 10 µl mit Filter Tip	SafeSeal-Tips professional 1000, 200, 100, 10 µl	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf
Reaktionsgefäße 1,5 ml	SLG® Reaktionsgefäß 1,5 ml	Süd-Laborbedarf GmbH, Gauting
Reaktionsgefäße 0,5 ml	PCR Softtubes 0,5 ml	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf
Eis		
Geräte	Name	Firma
Pipetten 1000, 200, 100, 10 und 2,5 µl	eppendorf Reference	Eppendorf AG, Hamburg
Minizentrifuge	Qik-Spin	Süd-Laborbedarf GmbH, Gauting
Thermocycler	MJ RESEARCH PTC-200 Pel-tier Thermal Cycler	Biozym Diagnostik GmbH, Hessisch Oldendorf

**Tabelle 5.5: Materialien für die Reverse Transkriptase Reaktion**

## Durchführung

Zur Durchführung der Reverse Transkriptase-Reaktion wurden die RNA-Proben auf Eis aufgetaut. Um eine cDNA Konzentration von 100 ng/µl zu erhalten, wurden in ein Reaktionsgemisch von 20 µl 2 µg RNA eingesetzt. Je RNA-Probe wurde dazu in einem DNase/RNasefreien 0,5 µl Reaktionsgefäß ein Reaktionsansatz von 20 µl erstellt.

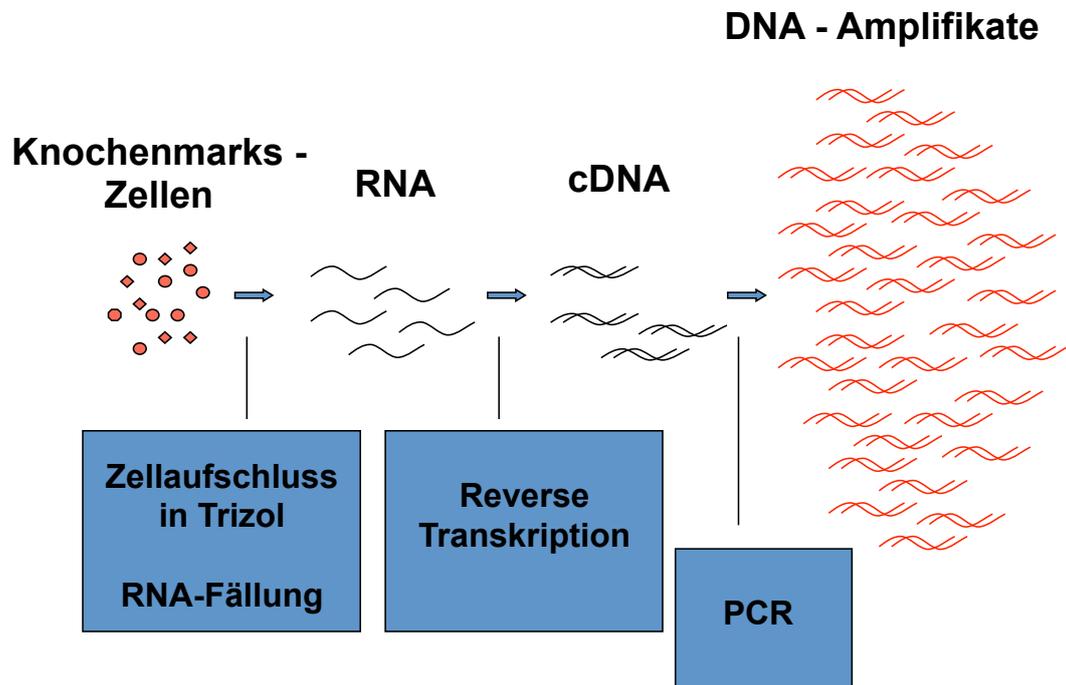
<b>Reaktionsgemisch:</b>		
<b>5X VILO™ Reaction Mix</b>		<b>4 µl</b>
- Random Primers		
- dNTPs (Desoxyribonukleosidtriphosphate)		
- MgCl <sub>2</sub> , Puffer		
<b>10X SuperScript® III Enzyme Blend</b>		<b>2 µl</b>
- Reverse Transkriptase (SuperScript® III)		
- Ribonuklease Inhibitor (RNaseOUT™)		
- Proprietary Helper Protein		
<b>RNA</b>	<b>2 µg</b>	<b>x µl</b>
<b>Aqua bidestillata</b>	<b>auf 20 µl ergänzt</b>	<b>x µl</b>
		<b>insg. 20 µl</b>

**Tabelle 5.6: Reaktionsgemisch für die Reverse Transkriptase Reaktion**

Diese Proben wurden nun für 10 min bei 25 °C und dann für 60 min bei 42 °C im Thermocycler inkubiert. Schließlich wurde die Reverse Transkriptase durch eine 5 minütige Erhitzung auf 85 °C inaktiviert und die Proben danach auf 10 °C abgekühlt. Die erhaltene cDNA wurde anschließend entweder bei 4 °C gekühlt und zeitnah weiterverarbeitet oder bei -20 °C gelagert. Vor dem Einsetzen in die qPCR wurde die cDNA noch einmal von 100 ng/µl auf 25 ng/µl verdünnt.

Alle bei der Reverse Transkriptase Reaktion verwendeten Enzyme wie die Ribonuklease Inhibitoren (RNasin plus und RNaseOUT™) und die Reverse Transkriptase (SuperScript® III) wurden stets in einer -20° Thermobox aufbewahrt.

### 5.3.5. Polymerasekettenreaktion



**Abbildung 5.1: Nachweisverfahren mittels Polymerasekettenreaktion**

#### **Verfahren**

Bei der Polymerasekettenreaktion handelt es sich um die eigentliche Nachweisreaktion der Marker. Dabei kopiert eine Polymerase in mehreren Zyklen eine bestimmte cDNA-Sequenz. Als DNA-Polymerase wurde die hitzebeständige Taq-Polymerase verwendet. Die cDNA-Sequenz wird von einem Primerpaar begrenzt, das der Taq-Polymerase als Startpunkt dient. Diese cDNA-Sequenz, auch Template genannt, ist ein kleiner Ausschnitt aus unserem Markergen und für dieses spezifisch. Sie liegt natürlich nur vor und kann kopiert werden, wenn unser Markergen zuvor im Knochenmark exprimiert worden ist. Der PCR-Nachweis dieser Sequenz wird daher dem Nachweis von Tumorzellen gleichgesetzt. Vor dem ersten Zyklus wird dabei eine allgemeine Denaturierungsphase bei etwa 95°C durchgeführt um die cDNA-Doppelstränge zu trennen, um alle Enzyme aus vorherigen Reaktionen zu zerstören und um die bei Raumtemperatur inhibierte Taq-Polymerase (hot-start Polymerase) zu aktivieren. Es schließen sich die Amplifikationszyklen selbst an, die aus drei Phasen bestehen:

- **Denaturierung** - Bei Temperaturen um 95°C werden die Wasserstoffbrücken zwischen den zwei kongruenten cDNA-Doppelsträngen aufgebrochen und diese von einander getrennt.
- **Annealing** - Die Marker-spezifischen Primer lagern sich an den zu ihnen komplementären Sequenzen der cDNA-Einzelstränge an. Die Schmelztemperatur der Primer entspricht dabei der Temperatur, die genug Energie liefert um die Bindungskräfte zwischen den Primern und den cDNA Einzelsträngen zu überwinden, sodass diese sich voneinander trennen.
- **Elongation** - Bei Temperaturen von ca. 70°C (die Temperatur hängt vom Arbeitsoptimum der verwendeten Polymerase ab) lagert sich die Taq-Polymerase an die Primer an und bildet, von ihnen ausgehend die PCR-Transkripte. Die cDNA-Stränge, an welche die Primer gebunden sind, dienen ihr dabei als Matrize. Die DNA-Polymerase reiht die zur Matrize komplementären Desoxyribonukleosidtriphosphate aneinander und kopiert somit den durch die Primer eingegrenzten Genabschnitt.

Der beschriebene Amplifikationszyklus wird anschließend viele Male wiederholt. Von Zyklus zu Zyklus ergibt sich so ein zeitweise exponentielle Vervielfältigung des ursprünglich vorliegenden Templates, bis man am Ende viele Millionen Kopien dieser Ausgangssequenz vorliegen hat.

### **Qualitative Reverse Transkriptase PCR (RT-PCR)**

In der klassischen Endpunkt-PCR oder qualitativen PCR wird die Messung der Amplifikate nach Abschluss des letzten Zykluses durchgeführt. Sie liegt daher bereits in der Plateauphase der Reaktion und es ist nicht möglich auf die exakte Ausgangsmenge an Templates zu schließen.

### **Quantitative real-time PCR (qPCR)**

Bei der von uns genutzten quantitativen PCR wird nach jedem Zyklus die Menge an synthetisierten PCR-Produkten gemessen, daher auch der Name Echtzeit- oder real-time PCR. Die Messung nach jedem Zyklus wird durch den Einbau eines Fluoreszenzmarkers in die neu synthetisierte DNA ermöglicht. Den von uns hierfür verwendeten Farbsonden war am 5' Ende ein Reporterfarbstoff und am 3' Ende ein Quencherfarbstoff angehängt. Der Quencherfarbstoff inhibiert bei intakter Sonde den Reporterfarbstoff, sodass kein Fluoreszenzsignal ausgesendet wird. Wie auch die Primer lagern sich die farbmarkierten Sonden in der Annealing-Phase an den für sie spezifischen Abschnitt im PCR-Produkt an. Trifft die Taq-Polymerase bei der Strangverlängerung in der Elongationsphase nun auf die Farbsonde wird diese durch die Exonucleaseaktivität der Taq-Polymerase hydrolysiert und zwischen Reporter-

und Quencherfarbstoff gespalten. Von einander getrennt, wird der Reporterfarbstoff nun nicht mehr vom Quencherfarbstoff unterdrückt und sendet ein Fluoreszenzsignal aus. Nach jeder Elongationsphase wird die emittierte Fluoreszenz gemessen. Das Fluoreszenzsignal verhält sich dabei direkt proportional zur Anzahl der PCR-Amplifikate. Aus den Ergebnissen der Fluoreszenzmessung kann eine Kurve erstellt werden, die die Menge an amplifizierter cDNA im Zeitverlauf widerspiegelt.

### Primer

Wir testeten in der qPCR sechs verschiedene Markergene CK20, CK14, CK17, UPK2, SPINK1, TMPRSS2 und drei verschiedene Referenzgene YWHAZ, GAPDH, HPRT1. Für unsere Marker und Referenzgene verwendeten wir von Applied Biosystems by Life Technology (Invitrogen) bereitgestellte, fertige Primerpaar-Kombinationen und Farbsonden. Die Marker-Sonden waren vic-markiert und die Referenzgen- (Housekeeping Gene) Sonden fam-markiert. Durch den unterschiedlichen Farbstoff der Sonden konnten die Fluoreszenzsignale von Markern und Referenzgenen, deren qPCR im gleichen Reaktionsmix ablief, von einander unterschieden werden. Die Amplifikatlänge lag zwischen 64-124 bp. Alle Primerpaare waren exonübergreifend designt worden, was bedeutet, die Bindestellen der einzelnen Primer eines Primerpaares befinden sich auf zwei unterschiedlichen Exons im spezifischen Gen. Im Gegensatz zur gespleißten mRNA (bzw. cDNA) begrenzen sie auf genomischer DNA einen Abschnitt, welcher mindestens ein nicht-kodierendes Intron eingeschlossen hat. Der Abschnitt auf genomischer DNA ist damit zu groß und nicht mehr amplifizierbar. Hierdurch können bei einer eventuellen Verunreinigung mit genomischer DNA falsch positive Ergebnisse verhindert werden.

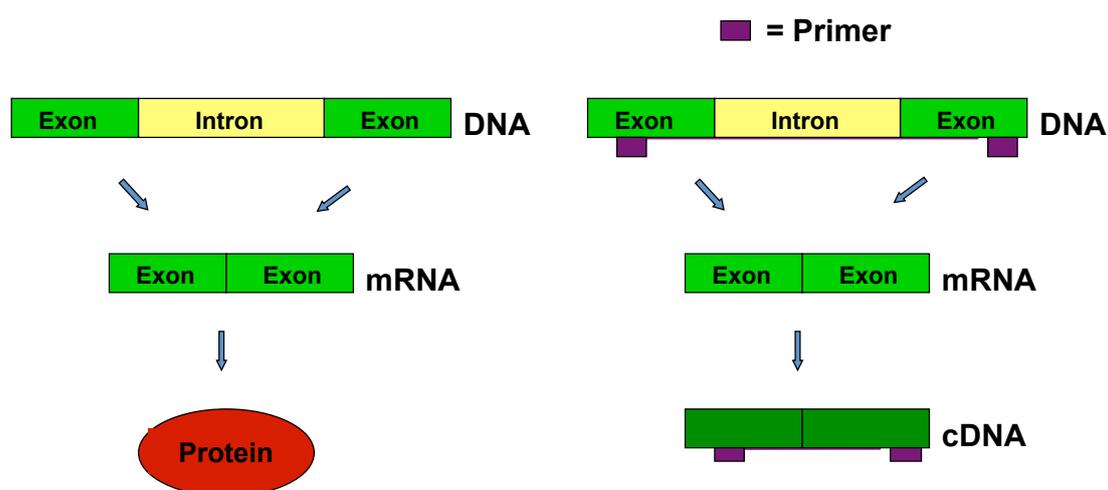


Abbildung 5.2: Prinzip exonübergreifender Primer

## Positiv- und Negativkontrolle

Als Positivkontrolle diente cDNA der humanen Blasenkarzinomzelllinie 647V. Als „non-template“ Negativkontrolle wurde DNase/RNasefreies Aqua bidest. anstelle von cDNA in die qPCR eingesetzt. Das Reaktionsgemisch der Kontrollproben entsprach sonst exakt dem der Patientenproben.

## Materialien

### Reagenzien, Verbrauchsmaterialien, Geräte

Reagenzien	Name	Firma
qPCR-Master Mix	2X TaqMan® Gene Expression Master Mix	Applied Biosystems, Life Technologies, CA, USA
Primer-/ Farbstoff-Sonden Mix	20X TaqMan® Gene Expression Assays	Applied Biosystems, Life Technologies, CA, USA
Marker	Bestell.-Nr.:	Amplifikat:
- Sonden für KRT20	Hs00300643_m1	75bp
- Sonden für KRT14	Hs00265033_m1	64bp
- Sonden für KRT17	Hs01588578_m1	93bp
- Sonden für UPK2	Hs00171854_m1	81bp
- Sonden für SPINK1	Hs00162154_m1	85bp
- Sonden für TMPRSS2	Hs00237175_m1	112bp
Referenzgen	Bestell.-Nr.:	Amplifikat:
- Sonden für YWHAZ	Hs00237047_m1	70bp
- Sonden für GAPDH	Hs99999905_m1	124bp
- Sonden für HPRT1	Hs01003267_m1	72bp
Aqua bidestillata		
Verbrauchsmaterialien	Name	Firma
Pipettenspitzen 1000, 200, 100 und 10 µl mit Filter Tip	SafeSeal-Tips professional 1000, 200, 100, 10 µl	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf
Reaktionsgefäße 1,5 ml	SLG ® Reaktionsgefäß 1,5 ml	Süd-Laborbedarf, Gauting
Reaktionsgefäße 0,5 ml	PCR Softtubes 0,5 ml	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf
qPCR-Seal	Microseal ® 'B' Adhesive Seals	Bio-Rad Laboratories Incorporation, CA, USA
qPCR-Platten à 96 Wells	Hard-Shell ® Thin-Wall 96-Well Skirted PCR Plates	Bio-Rad Laboratories Incorporation, CA, USA

Geräte	Name	Firma
Elektronische Pipette 5-100 µl	eppendorf Research pro PhysioCare concept	Eppendorf AG, Hamburg
Pipetten 1000, 200, 100, 10 und 2,5 µl	eppendorf Reference	Eppendorf AG, Hamburg
Minizentrifuge	Qik-Spin	Süd-Laborbedarf, Gauting
Standzentrifuge	Rotina 35R	Hettich Lab Technology GmbH & Co.KG, Tuttlingen
qPCR-Thermocycler	RealTime PCR Thermocycler CFX 96TM	Bio-Rad Laboratories Incorporation, CA, USA

**Tabelle 5.7: Materialien für die real-time PCR**

### Durchführung

Wir verwendeten zur Fluoreszenzmessung geeignete PCR-Platten à 96 Vertiefungen (Wells). In jedes Well wurde insgesamt ein Reaktionsgemisch von 20µl pipettiert.

<b>Reaktionsgemisch:</b>	
<b>2X TaqMan® Gene Expression Master Mix</b>	<b>10 µl</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>- Taq DNA Polymerase (AmpliTaq Gold® DNA Polymerase)</li> <li>- „Ultra Pure“ für hot start activation</li> <li>- Uracil-DNA Glycosylase</li> <li>- dNTPs (Desoxyribonukleosidtriphosphate)</li> <li>- Mg, Puffer</li> </ul>	
<b>20X TaqMan® Gene Expression Assays (Marker)</b>	<b>1 µl</b>
- Primer-Sonden und fam-Farbstoff-Sonden, Markerspezifisch	
<b>20X TaqMan® Gene Expression Assays (Referenzgen)</b>	<b>1 µl</b>
- Primer-Sonden und vic-Farbstoff-Sonden, Referenzgenspezifisch	
<b>Aqua bidestillata</b>	<b>4 µl</b>
<b>Patientenprobe:</b>	<b>4 µl ±100 ng</b>
cDNA-Knochenmark Konzentration: 25 ng/µl	

<b>oder</b>	<b>Positivkontrolle:</b>	4 $\mu$ l $\pm$ 10 ng
	cDNA- 647V-Zellen Konzentration: 2,5 ng/ $\mu$ l	
<b>oder</b>	<b>Negativkontrolle:</b>	4 $\mu$ l
	Aqua bidestillata	
		<b>insg. 20 <math>\mu</math>l</b>

**Tabelle 5.8: Reaktionsgemisch für die real-time PCR**

Von jeder aus Knochenmark gewonnenen cDNA-Probe wurden je Marker drei identische qPCR-Ansätze erstellt und jede Probe als Triplet getestet (Dreifachtestung). Für die Postitiv- und Negativkontrollen wurde je Marker ein einfacher Ansatz erstellt. Die Platten wurden anschließend mit einer Folie (Microseal) versiegelt, kurz abzentrifugiert und in den Thermocycler gegeben. Die Proben durchliefen nun das unten aufgeführte Programm, während am Ende jedes Zykluses im Thermocycler die Fluoreszenzmessung durch die qPCR-Platte und das Seal hindurch erfolgte.

<b>qPCR-Programm</b>
<b>Initiale Denaturierung</b>
<b>Denaturierung</b>
Temperatur 95 °C
Zeit 10:00 min
<b>Amplifikationszyklus 45X</b>
<b>Denaturierung</b>
Temperatur 95 °C
Zeit 15 sec
<b>Annealing + Elongation</b>
Temperatur 60 °C
Zeit 60 sec
<b>Fluoreszenzmessung</b>

**Tabelle 5.9: Programm für die real-time PCR Zyklen**

## 5.4. Auswertung der qPCR-Ergebnisse

### 5.4.1. Fluoreszenzsignal und Rohdaten

#### Transkriptmenge

In der frühen Phase der qPCR ändert sich die Transkriptmenge und somit das Fluoreszenzsignal langsam. Dies liegt daran, dass die zu Beginn vorliegende Templatemenge sehr gering und die Wahrscheinlichkeit, dass sich Template, Primer und Polymerase treffen und reagieren klein ist. In dieser Phase wird das Hintergrundsignal ermittelt. Es braucht einige Zyklen bis eine gewisse Anzahl an PCR-Transkripten und damit auch an PCR-Matrizen vorliegt. Ist dies der Fall steigt die Transkriptmenge exponentiell an, bis sie schließlich in ein lineares Wachstum übergeht. Die Vervielfältigung nimmt weiter ab bis sie schließlich gegen Null geht und die Anzahl an PCR-Transkripten in einem Plateau verläuft. Das Versiegen der Amplifikation ist auf den Verbrauch der PCR-Reagenzien im Reaktionsmix zurückzuführen. Das Fluoreszenzsignal, welches sich proportional zur Anzahl der PCR-Amplifikate verhält, spiegelt diesen Reaktionsverlauf wieder.

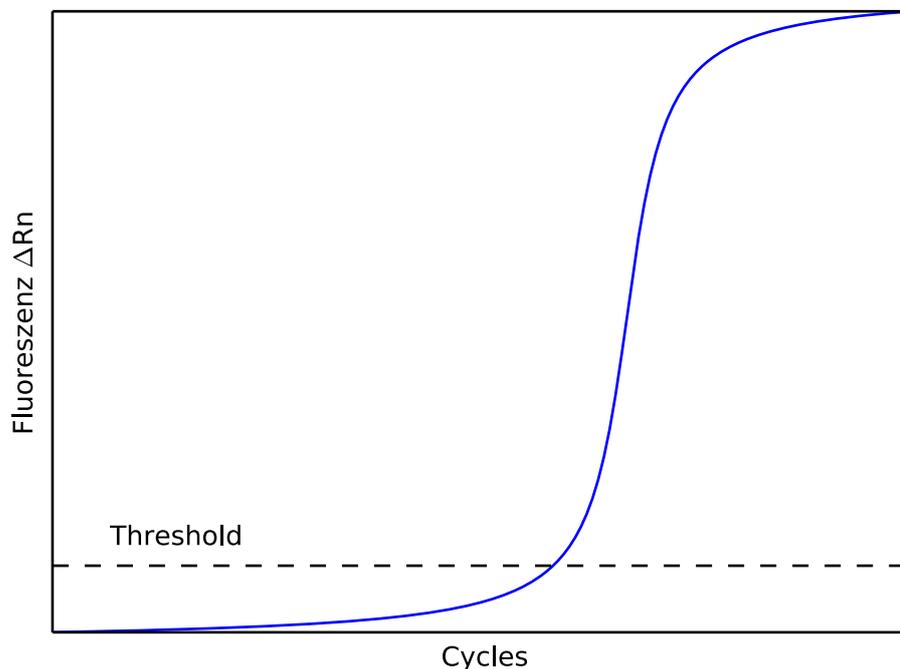


Abbildung 5.3: Entwicklung des Fluoreszenzsignals während der qPCR

### **Threshold und Ct-Wert**

Die Quantifizierung der qPCR basiert auf der Berechnung eines Fluoreszenz-Schwellenwertes oder Threshold. Die Zyklenzahl, bei der das Fluoreszenzsignal diesen Schwellenwert übersteigt bzw. kreuzt, nennt man Threshold Cycle (Ct -Wert). Der Schwellenwert wird so gewählt, dass er den 10-fachen Wert der Standardabweichung des Hintergrundsignals beträgt und am Anfang der exponentiellen Phase der Amplifikation liegt. Der Ct -Wert entspricht somit derjenigen Zyklenzahl, an der die Fluoreszenz erstmals signifikant das Hintergrundsignal übersteigt. Je höher die Ausgangskonzentration der Marker- oder Referenzgenesequenz zu Beginn der qPCR ist, desto früher wird der Schwellenwert erreicht und desto niedriger ist der Ct-Wert. Übersteigt das Fluoreszenzsignal einer Probe den Schwellenwert vor Beendigung des letzten qPCR-Zyklus (bei uns Zyklus 45) nicht, ist die Probe für diesen Marker negativ. Die Ct-Werte sind die sogenannten Rohdaten der qPCR, sie können zu weiteren Analysen herangezogen werden.

### **5.4.2. Quantifizierung**

Für die PBMC-Proben (Kontrollgruppe) sowie die Knochenmarksproben (Patienten) wurde eine relative Quantifizierung nach der  $\Delta\Delta$ -Ct – Methode vorgenommen. Bei dieser Analyseform wird die Expression der Markergene relativ zur Expression von mehreren Referenzgenen bestimmt und anschließend in Relation zu einem Kalibrator gesetzt. Für die Berechnung verwendeten wir die Bio Rad CFX Manager 2.0 Software.

### **Relative Quantifizierung ( $\Delta$ Ct )**

Alle PBMC- und Knochenmarksproben sind in der qPCR als Triplets getestet worden. Aus den drei Ct-Werten der Marker sowie aus den Ct-Werten der drei Referenzgene wurde das arithmetische Mittel gebildet und die beiden Ct-Mittelwerte von einander subtrahiert. Diese Differenz wird als  $\Delta$ Ct bezeichnet.

$$\text{Mittelwert-Ct (Marker)} - \text{Mittelwert-Ct (Referenzgene)} = \Delta\text{Ct (Marker)}$$

Ergebnisschwankungen aufgrund etwas unterschiedlicher Reaktionsbedingungen, die sowohl die Amplifikation der Marker als auch der Referenzgene betreffen, werden dadurch herausgerechnet. Je höher die Ausgangskonzentration des Markergens in der qPCR war, umso näher liegen die Ct-Werte von Marker und Referenzgenen beieinander und desto niedriger ist  $\Delta$ Ct.

### Komparativer Quantifizierungs-Algorithmus mittels Kalibrator ( $\Delta\Delta Ct$ )

Anschließend wurde dieser  $\Delta Ct$ -Wert in Relation zu einem Kalibrator gesetzt. Als Kalibrator verwendeten wir eine PBMC-Kontrollprobe, die für alle sechs Marker positiv war. Der  $\Delta Ct$ -Wert dieser Kalibratorprobe wurde für jeden Marker gleich 1 gesetzt. Der Kalibrator entspricht damit einer „1 x Probe“ und die Expression der anderen Kontroll- und Patientenproben können als n-facher Unterschied relativ zum Kalibrator angegeben werden.

$$\Delta Ct_{\text{(Kalibrator)}} = 1$$

$$\Delta Ct_{\text{(Marker-kalibriert)}} = n \times \Delta Ct_{\text{(Kalibrator)}}$$

Der  $\Delta Ct$ -Wert des Kalibrators wurde nun nochmal vom kalibrierten  $\Delta Ct$ -Wert des Markers abgezogen. Diese Differenz wird als  $\Delta\Delta Ct$  bezeichnet.

$$\Delta Ct_{\text{(Marker-kalibriert)}} - \Delta Ct_{\text{(Kalibrator)}} = \Delta\Delta Ct_{\text{(Marker)}}$$

$$\Delta Ct_{\text{(Marker-kalibriert)}} - 1 = \Delta\Delta Ct_{\text{(Marker)}}$$

### Exponentielle Darstellung

Die relative Template-Ausgangskonzentration (K) des Markers wird letztlich als negativer  $\Delta\Delta Ct$ -Wert des Markers exponentiell zur Zahl 2 angegeben.

$$2^{-\Delta\Delta Ct_{\text{(Marker)}}} = K_{\text{(Marker)}}$$

Durch die exponentielle Angabe stellt sich jeder Zyklusunterschied als eine Verdoppelung bzw. Halbierung der Template-Ausgangskonzentration dar. Je kleiner der  $\Delta\Delta Ct$ -Wert ist, desto höher war prinzipiell die Template-Ausgangskonzentration. Das umgekehrt proportionale Verhalten von K zu  $\Delta\Delta Ct$ , drückt sich in dem negativen Vorzeichen vor  $\Delta\Delta Ct$  aus.

$\Delta\Delta Ct_{\text{(Marker)}} = 1$	$2^{-1} = 0,5$	$K_{\text{(Marker)}} = 0,5$
$\Delta\Delta Ct_{\text{(Marker)}} = 2$	$2^{-2} = 0,25$	$K_{\text{(Marker)}} = 0,25$
$\Delta\Delta Ct_{\text{(Marker)}} = 3$	$2^{-3} = 0,125$	$K_{\text{(Marker)}} = 0,125$
$\Delta\Delta Ct_{\text{(Marker)}} = 4$	$2^{-4} = 0,0625$	$K_{\text{(Marker)}} = 0,0625$

Durch die Verwendung des  $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Wertes im Exponenten ergibt sich, dass eine Probe mit der gleichen Template-Ausgangskonzentration wie der Kalibrator, den Wert 1 hat.

$$\Delta\text{Ct (Marker-kalibriert)} = 1$$

$$\Delta\Delta\text{Ct (Marker)} = \Delta\text{Ct (Marker-kalibriert)} - \Delta\text{Ct (Kalibrator)} = 1 - 1 = 0$$

$$2^{-\Delta\Delta\text{Ct (Marker)}} = 2^0 = 1$$

$$K_{\text{(Marker)}} = 1$$

## 5.5. Statistische Auswertung der Ergebnisse

### 5.5.1. Auswertungskriterien

#### **Endpunkte**

Als Endpunkte für die Datenanalyse wurde die Entwicklung eines Rezidivs oder der Todesfall gewählt.

- Rezidiv: Lokoregionale Rezidive, Lymphknoten- und Fernmetastasen
- Todesfall: Tod jedweder Ursache, tumorabhängig oder -unabhängig

#### **1- und 2-Jahres Überlebensraten**

Es wurden 1- und 2-Jahres Überlebensraten für Rezidivfreies Überleben (Recurrence-free Survival = RFS) sowie für Gesamtüberleben (Overall Survival = OS) bestimmt. Die Zeiträume mussten aufgrund der relativ kurzen Nachbeobachtungsdauer so gewählt werden. Die Raten geben die Patientenzahlen in Prozent an, bei denen nach einem bzw. zwei Jahren noch kein Ereignis d.h. Rezidiv (RFS) oder Todesfall (OS) eingetreten war. Patienten deren Follow-up weniger als ein bzw. zwei Jahre betrug, mussten aus der Berechnung der 1- bzw. 2-Jahres Überlebensraten herausgelassen werden.

### 5.5.2. Statistische Methoden

Unsere statistischen Analysen wurden in Kooperation mit dem Institut für Medizinische Statistik und Epidemiologie der Technischen Universität München durchgeführt. Es wurde die Software SPSS (Softwarepaket 20.0.0. IBM, Chicago, IL, USA) verwendet.

## Kaplan-Meier-Methode

Mithilfe der Kaplan-Meier-Methode werden Überlebensraten geschätzt. Hierbei werden anhand von Kurven die Überlebensraten für mindestens zwei Gruppen dargestellt und gegenübergestellt, in unserem Fall z.B. Marker-positive Patienten vs. Marker-negative Patienten. Die Kaplan-Meier-Kurven (= Überlebensfunktionen) beschreiben dabei wie viele Patienten in % (y-Achse) zu einem bestimmten Zeitpunkt (x-Achse) ohne Ereignis sind. Tritt in einer Gruppe ein Ereignis, wie in unserem Fall eine Rezidivdiagnose oder der Todesfall ein, wird zu diesem Zeitpunkt die Kurve dieser Gruppe nach unten abknicken, der Anteil an Patienten ohne Ereignis wird kleiner. Von diesem Zeitpunkt an steht auch ein Patient weniger unter Risiko. Ist das Follow-up für einen Patienten beendet, wird der Patient nach Ablauf dieses Zeitraumes zensuriert und ein Zensurkreuz auf der Kurve angebracht. Auch ab diesem Zeitpunkt steht ein Patient weniger unter Risiko. Durch die Zensuren wird gewährleistet, dass in der Analyse jeder Patient nur für den Zeitraum bewertet wird, in dem er auch tatsächlich unter Beobachtung stand.

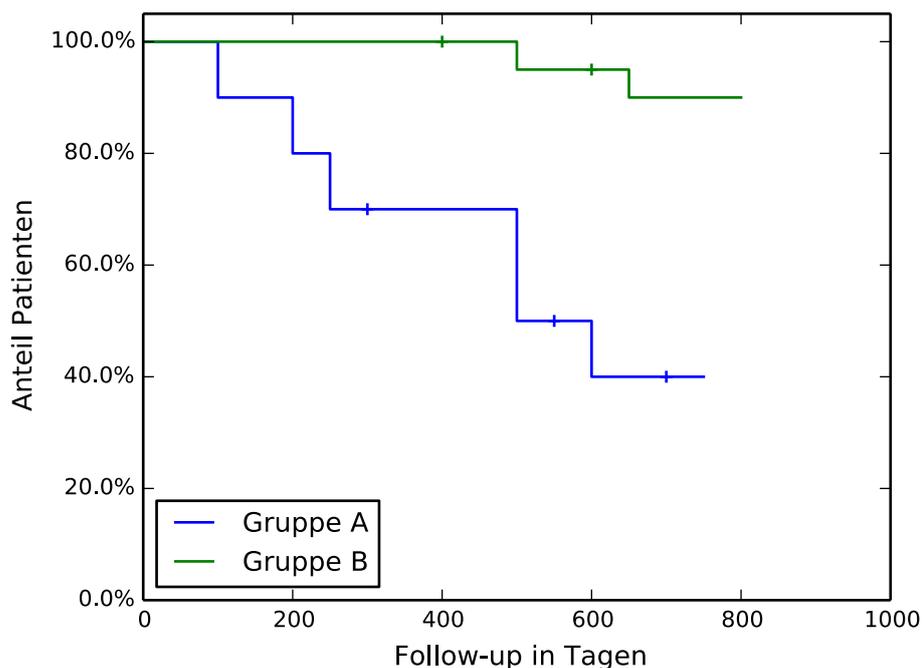


Abbildung 5.4: Beispiel für Kaplan-Meier-Kurve

## Log-Rang-Test

Der Log-Rang-Test, englisch auch Log-Rank-Test oder Mantel-Cox-Test genannt, ist ein nichtparametrisches Verfahren und vergleicht die Überlebensraten unterschiedlicher Gruppen kontinuierlich über den gesamten Beobachtungszeitraum miteinander. Mithilfe des Log-Rang-Tests wurden unsere Ergebnisse auf Signifikanz überprüft. Es

wurde geprüft, ob unsere Nullhypothese verworfen und unsere Alternativhypothese und Arbeitshypothese angenommen werden kann (Nullhypothese = Zwischen der Marker-positiven und der Marker-negativen Gruppe besteht kein Unterschied; Alternativhypothese = zwischen der Marker-positiven und der Marker-negativen Gruppe besteht ein Unterschied). Der p-Wert ist die Überschreitungswahrscheinlichkeit (p von engl. Probability) oder auch der Signifikanzwert. Er gibt mit einem Wert zwischen 0-1 die Wahrscheinlichkeit an, dass die Nullhypothese wahr ist. Bei einem Signifikanzniveau  $\alpha = 5\%$  muss  $p < 0,05$  sein, dass die Nullhypothese mit einer Wahrscheinlichkeit  $< 5\%$  wahr ist und verworfen werden kann. Die Alternativhypothese ist dann wiederum mit einer Wahrscheinlichkeit  $> 95\%$  richtig und wird angenommen. Bei einem  $p < 0,05$  ist der Unterschied zwischen zwei Gruppen signifikant, bei einem  $p < 0,001$  hochsignifikant.

### **Cut-off Werte**

In der Auswertung der Ergebnisse wurden verschiedene Grenzwerte oder Cut-off Werte angewendet. Dabei wurden Patienten, deren  $2^{-\Delta\Delta Ct \text{ (Marker)}}$  Wert über dem Cut-off Wert lag als positiv und Patienten deren  $2^{-\Delta\Delta Ct \text{ (Marker)}}$  Wert kleiner oder gleich dem Cut-off Wert lag als negativ für einen Marker gewertet. Der Cut-off Wert orientierte sich zunächst an dem höchsten Wert, der für den einzelnen Marker in der gesunden Kontrollgruppe erzielt wurde. Wir ließen unabhängig davon vom Institut für Medizinische Statistik und Epidemiologie der Technischen Universität München Berechnungen durchführen ob es bessere Cut-off Werte gibt, was die Signifikanz der Ergebnisse betrifft. Mithilfe des Log-Rang-Tests wurden dabei kontinuierlich alle Cut-off Werte durchgerechnet und der Cut-off Wert mit der höchsten Signifikanz (kleinstem p-Wert) ermittelt.



# 6. Ergebnisse

## 6.1. Vorversuche

### 6.1.1. Blasenkarzinomzelllinien

Die Ct-Werte (Rohdaten) für CK20, CK14, CK17, UPK2, SPINK1 und TMPRSS2 schwankten deutlich zwischen den einzelnen Blasenkarzinomzelllinien. Bei einigen Zelllinien konnten ein oder zwei Marker nicht nachgewiesen werden.

Ergebnisse Blasenkarzinomzelllinien CT-Werte						
Zelllinien	CK20	CK14	CK17	UPK2	SPINK1	TMPRSS2
S.D.	27,3	29,37	22,305	24,385	36,39	33,11
VmCub1	32,895	25,27	19,025	26,995	37,86	-
MCHU4	37,97	24,13	22,24	23,66	32,78	32,74
639V	41,12	34,68	35,075	39,055	36,97	-
UMUC3	-	37,35	38,615	20,115	35,84	-
BFTC905	40,085	25,53	19,91	28,38	32,91	43
UMUC6	41,185	23,45	18,405	32,72	36,37	44,07
SW1710	42,815	38,28	40,055	39,02	38,95	38,5
EJ28	42,695	40,81	42,065	40,55	38,68	21,9
486P	41,235	39,66	38,195	37,34	37,47	44,21
253J	42,26	38,04	44,225	38,5	32,43	-
J82	41,02	40,09	-	38,485	39,3	-
RT4	24,14	30,77	19,06	20,38	30,13	30,265
RT112	35,17	30,57	23,295	23,805	38,72	38,92
T24	39,725	37,14	35,825	39,44	40,46	-
HT1376	39,4	19,25	22,25	29,1	29,4	37,275
647V	19,775	26,59	18,245	21,17	24,25	22,23

**Tabelle 6.1: Ergebnisse humane Blasenkarzinomzelllinien**

## 6.1.2. Sensitivität

### Absolute Quantifizierung

Bei der absoluten Quantifizierung wurden in einer Verdünnungsreihe 0-10<sup>5</sup> Plasmidkopien der klonierten Markersequenz eingesetzt. Die minimale Nachweisgrenze d.h. Sensitivität lag dabei für alle sechs Marker bei 10 Plasmidkopien auf 20 µl Reaktionsmix.

### Zellverdünnungsreihe

In der Zellverdünnungsreihe befanden sich 0, 1, 10 und 100 647V-Zellen (Blasenkarzinomzellen) auf je 10<sup>6</sup> PBMC (Peripheral Blood Mononuclear Cells). Die minimale Nachweisgrenze d.h. Sensitivität lag je nach Marker zwischen einer und zehn 647V-Zellen auf 10<sup>6</sup> PBMC.

Nachweisgrenzen		
Marker	absolute Quantifizierung	Zellverdünnungsreihe
CK20	10 Plasmidkopien	10 647V -Zellen
CK14	10 Plasmidkopien	10 647V -Zellen
CK17	10 Plasmidkopien	1 647V -Zelle
UPK2	10 Plasmidkopien	10 647V -Zellen
SPINK1	10 Plasmidkopien	1 647V -Zelle
TMPRSS2	10 Plasmidkopien	10 647V -Zellen

**Tabelle 6.2: Ergebnisse absolute Quantifizierung und Zellverdünnungsreihe**

## 6.1.3. Spezifität

Um die Spezifität der Marker zu bestimmen, wurden 50 PBMC-Proben von gesunden Donatoren mittels qPCR auf die sechs Marker getestet. Hier zeigten sich für alle Marker zumindest bei einem Teil der PBMC-Proben  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  Werte > 0, womit diese Proben zunächst als Marker-positiv zu werten sind. Die Spezifität der einzelnen Marker (ohne Cut-off Wert) ist in der Tabelle unten aufgeführt.

Gesunde Kontrollgruppe						
Marker	Wert = 0	Wert > 0	min.	max.	Mittelwert	Spezifität
	insg. 50 Proben					
<b>CK20</b>	36 (72%)	14 (28%)	0	1,74752	1,04266	72%
<b>CK14</b>	32 (64%)	18 (36%)	0	3,49831	0,37641	64%
<b>CK17</b>	0 (0%)	50 (100%)	0,03273	4,22955	0,76363	0%
<b>UPK2</b>	10 (20%)	40 (80%)	0	1,00117	0,40015	20%
<b>SPINK1</b>	0 (0%)	50 (100%)	0,14844	2,37327	0,99557	0%
<b>TMPRSS2</b>	36 (72%)	14 (28%)	0	4,06846	1,28935	36%

**Tabelle 6.3: Ergebnisse PBMC-Proben der gesunden Kontrollgruppe**

#### 6.1.4. Knochenmarksproben

Die entnommenen Knochenmarksvolumina lagen zwischen 1 und 9 ml. Bei einigen Patienten wurde aufgrund geringer Knochenmarksmengen die Proben von rechter und linker Seite zusammengegeben und gemeinsam weiterverarbeitet. Am Ende lagen bei 48 Patienten Material von zwei und bei 71 Patienten von lediglich einer Knochenmarksprobe zur weiteren Aufarbeitung vor. Wenn bei den Patienten genügend Material vorgelegen hatte, existierten bis zum Schluss zwei Proben, die auch getrennt die qPCR durchliefen. Es wurde hier für jeden Marker das höhere der beiden Ergebnisse, d.h. im Zweifel die positive Probe gewertet.

## 6.2. Patientenkollektiv

### 6.2.1. Allgemeine und klinische Parameter im Gesamtpatientenkollektiv

#### **Patientenkollektiv Zusammensetzung**

In einem Zeitraum von 61 Monaten wurden insgesamt 117 Patienten in die Studie eingeschlossen. Alle Patienten waren an einem Harnblasenkarzinom erkrankt und es war eine Zystektomie mit Lymphadenektomie in Narkose geplant. Die allgemeinen Parameter unseres Patientenkollektivs wie Geschlechterverteilung, Alter, Follow-Up und Therapie sind in der folgenden Tabelle aufgeführt.

## Zystektomie

Bei allen 117 Patienten handelte es sich histologisch gesichert um ein Urothelkarzinom. Bei 115 Patienten wurde wie geplant eine Zystektomie durchgeführt. Bei einer Patientin wurde wegen Anästhesiekomplikationen, bei einem anderen Patienten wegen einer intraoperativ sichtbaren, ausgeprägten Peritonealkarzinose die Zystektomie unterlassen.

## Lymphadenektomie

Bei den beiden Patienten, bei denen keine Zystektomie durchgeführt wurde, sowie bei einem weiteren Patienten mit Peritonealkarzinose ist keine Lymphadenektomie erfolgt. Die Anzahl an entnommenen Lymphknoten variierte von 0-119, im Schnitt wurden 34 Lymphknoten entfernt. Die Rate an entfernten Lymphknoten lag in der Regel deutlich über der Mindestanzahl an Lymphknoten von 10 - 15 Stück, die derzeit zu entfernen empfohlen wird [16].

## Chemotherapie

Vier Patienten erhielten präoperativ eine neoadjuvante und 24 Patienten postoperativ eine adjuvante Chemotherapie. Zwei Patienten erhielten beides, eine neoadjuvante und adjuvante Chemotherapie.

Patientenkollektiv - allgemeine und klinische Parameter			
<b>Patientenzahl</b>	<b>Studienzeitraum</b>	<b>Follow-Up Range</b>	<b>Follow-Up Median</b>
117	09/2007 – 08/2012	1,5 – 55,5 Monate	18,5 Monate
<b>Männer</b>	<b>Frauen</b>	<b>Alters Range</b>	<b>Alter Mittel/Median</b>
92 (78,6%)	25 (21,4%)	39 – 85 a	66 a / 67 a
<b>Urothelkarzinom</b>	<b>Zystektomie</b>	<b>Lymphadenektomie</b>	<b>Chemotherapie</b>
117	115	114	29 (24,8%)

**Tabelle 6.4: Allgemeine und klinische Parameter im Patientenkollektiv**

## Tumorstadien und Resektionsstatus

Die Verteilung von pTNM-Status, Grading und Resektionsstatus sind in den folgenden zwei Tabellen aufgeführt. Der pT-Status war uns von 116 und der pN-Status von 114 Patienten bekannt. Informationen zu Grading lagen uns von 100 und zum R-Status von 114 Patienten vor. Das mediane Tumorstadium in unserem Patientenkollektiv betrug pT2.

## Prostatakarzinom

Von 88 der 92 männlichen Patienten war die Prostata mitentfernt und histologisch untersucht worden. Bei 26 von ihnen fand sich ein inzidentelles Prostatakarzinom, was bis zu diesem Zeitpunkt undetektiert und klinisch inapparent war. Bei drei Patienten handelte sich es um ein pT3a- Stadium bei den anderen 23 um ein pT2- Stadium. Der Gleasonscore lag bei allen Patienten unter 8 und der PSA-Wert lag außer bei einem Patienten (15 ng/ml) bei allen unter 4 ng/ml.

Patientenkollektiv klinische Parameter								
	pT	pN1	pM1	G	R1	M/F	PCA	CTx
<b>Status bekannt</b>	117	114	117	100	114	117	88 (Männer)	109
<b>Fälle</b>		30 (26,3%)	2 (1,7%)	G2 12 (12%) G3 88 (88%)	7 (6,1%)	M 92 (78,6%) F 25 (21,4%)	26 (29,5%)	29 (26,7%)

**Tabelle 6.5: Klinische Parameter im Gesamtpatientenkollektiv**

Verteilung nach pTNM-Stadium							
pT	pN1-3	pM1	G	R1	M/F	PCA	CTx
<b>pTis/T1</b>		0	G2 2 (8%) G3 23 (92%)	1/33 (3,0%)	F 5 (15,2%) M 28 (84,8%)	6/26 (23,1%)	5/33 (15,2%)
33 (28,2%)	5/33 (15,2%)						
<b>pT2</b>		1 (2,7%)	G2 7 (20,6%) G3 27 (79,4%)	0/36	F 10 (27,0%) M 27 (73,0%)	7/24 (29,2%)	9/37 (24,3 %)
37 (31,6%)	5/36 (13,8%)						
<b>pT3</b>		0	G2 2 (6,1%) G3 31 (93,9%)	1/37 (2,7%)	F 8 (21,6%) M 29 (78,4%)	12/29 (41,4%)	12/31 (38,7%)
37 (31,6%)	15/37 (40,5%)						
<b>pT4</b>		1 (11,1%)	G2 1 (12,5%) G3 7 (87,5%)	5/8 (55,5%)	F 1 (11,1%) M 8 (88,9%)	1/8 (12,5%)	3/7 (42,9%)
9 (7,8%)	5/8 (62,5%)						
<b>pTx</b>		0			F 1		
1 (0,9%)							

**Tabelle 6.6: Allgemeine und klinische Parameter nach pTNM-Stadium**

## 6.2.2. Ereignisse und Überlebensraten im Gesamtpatientenkollektiv

### **Nachsorge**

Die zeitlichen Abstände und die angewandte Diagnostik bei der Nachsorge variierten innerhalb des Patientenkollektivs. Dies lag unter anderem daran ob die Nachsorge bei uns im Haus oder ambulant durchgeführt wurde. Bei lediglich 113 Patienten lagen uns zuletzt Befunde zur Rezidivnachsorge vor. Bei allen Patienten war zum Zeitpunkt des letzten Follow-ups bekannt ob sie lebten oder verstorben waren.

### **Ereignis Rezidivdiagnose und Todesfall**

Als Rezidiv wurden Lokalrezidive, Lymphknoten- und Fernmetastasen gewertet. Die Lokalisation der Fernmetastasen war von der Häufigkeit wie folgt verteilt: pulmonal > ossär > hepatisch > renal > peritoneal. Bei acht Patienten waren mehrere Kompartimente betroffen. Der Zeitraum zwischen Radikaler Zystektomie und Rezidivdiagnose dauerte im Mittel 8 Monate. Als Todesfall wurden alle Todesfälle aufgrund des Harnblasenkarzinoms oder anderer Ursache gewertet. Der Zeitraum zwischen Radikaler Zystektomie und dem Versterben betrug im Mittel 14,5 Monate. In der folgenden Tabelle sind die Ereignisse Rezidivdiagnose und Todesfall im gesamten Patientenkollektiv und in den einzelnen Untergruppen (pT1-4, pN0-1, G2-3, R0-1, Frauen/Männer, Prostatakarzinom/kein Prostatakarzinom) aufgeschlüsselt.

### **Rezidivfreies Überleben und Gesamtüberleben**

Im Weiteren werden die 1- und 2-Jahresraten für Rezidivfreies Überleben und Gesamtüberleben in Prozent sowie das Überleben in Kaplan-Meier-Kurven dargestellt. Das rezidivfreie Überleben wird in den Tabellen mit RFS (Recurrence-free Survival), das Gesamtüberleben mit OS (Overall Survival) abgekürzt.

Ereignisse - allgemein und nach Untergruppen								
	Rezidiv	Lokal	System.	Ossär		Todesfall	Tumor- bed.	and. Urs.
<b>Fälle insg.</b>	29/113 (25,7%)	10 (8,8%)	18 (15,9%)	7 (6,2%)	<b>Fälle insg.</b>	28/117 (23,9%)	24 (20,5%)	4 (3,4%)
<b>Untergruppen</b>					<b>Untergruppen</b>			
<b>pT1</b> 32	2 (6,3%)	1 (3,1%)	1 (3,1%)	0	<b>pT1</b> 33	2 (6,1%)	2 (6,1%)	0
<b>pT2</b> 36	4 (11,1%)	1 (2,8%)	3 (8,3%)	0	<b>pT2</b> 37	5 (13,5%)	3 (8,1%)	2 (5,4%)
<b>pT3</b> 36	14 (38,9%)	4 (11,1%)	9 (25,0%)	5 (13,9%)	<b>pT3</b> 37	12 (32,4%)	10 (27,0%)	2 (5,4%)
<b>pT4</b> 8	8 (100%)	4 (50,0%)	4 (50,0%)	1 (12,5%)	<b>pT4</b> 9	8 (88,9)	8 (88,9)	0
<b>pTx</b> 1	1 (100%)	0	1 (100%)	1 (100%)	<b>pTx</b> 1	1 (100%)	1 (100%)	0
<b>pN0</b> 84	12 (14,3%)	4 (4,8%)	7 (8,3%)	4 (4,8%)	<b>pN0</b> 84	10 (11,9%)	8 (9,5%)	2 (2,4%)
<b>pN1</b> 28	16 (57,1%)	6 (21,4%)	10 (35,7%)	2 (7,1%)	<b>pN1</b> 30	15 (50,0%)	13 (34,3%)	2 (6,7%)
<b>pNx</b> 1	1 (100%)	0	1 (100%)	1 (100%)	<b>pNx</b> 3	3 (100%)	3 (100%)	0
<b>G2</b> 12	2 (16,7%)	1 (8,3%)	1 (8,3%)	0	<b>G2</b> 12	2 (16,7%)	2 (16,7%)	0
<b>G3</b> 85	22 (25,9%)	8 (9,4%)	13 (15,3%)	4 (4,7%)	<b>G3</b> 88	20 (22,7%)	16 (18,2%)	4 (4,5%)
<b>Gx</b> 13	5 (38,5%)	1 (7,7%)	4 (30,8%)	3 (23,1%)	<b>Gx</b> 17	6 (35,3%)	6 (35,3%)	0
<b>R0</b> 106	22 (20,8%)	7 (6,6%)	14 (13,2%)	5 (4,7%)	<b>R0</b> 107	19 (17,8%)	15 (14,0%)	4 (3,7%)
<b>R1</b> 5	5 (100%)	2 (40,0%)	3 (60,0%)	1 (20,0%)	<b>R1</b> 7	6 (85,7%)	6 (85,7%)	0
<b>Rx</b> 2	2 (100%)	1 (50,0%)	1 (50,0%)	1 (50,0%)	<b>Rx</b> 3	3 (100%)	3 (100%)	0
<b>M</b> 90	24 (26,7%)	9 (10,0%)	14 (15,6%)	6 (6,7%)	<b>M</b> 92	23 (25,0%)	19 (20,7%)	4 (4,3%)
<b>F</b> 23	5 (21,7%)	1 (4,3%)	4 (17,4%)	1 (4,3%)	<b>F</b> 25	5 (20,0%)	5 (20,0%)	0
<b>kPCA</b> 84	22 (26,2%)	9 (10,7%)	11 (13,1%)	5 (6,0%)	<b>kPCA</b> 87	20 (23,0%)	17 (19,5%)	3 (3,4%)
<b>PCA</b> 26	7 (26,9%)	1 (3,8%)	7 (26,9%)	2 (7,7%)	<b>PCA</b> 26	7 (26,9%)	6 (23,1%)	1 (3,8%)
<b>PCAx</b> 3	0	0	0	0	<b>PCAx</b> 4	1 (25,0%)	1 (25,0%)	0

**Tabelle 6.7: Rezidiv- und Todesfälle in den einzelnen Untergruppen**

## 6.3. Standardrisikofaktoren

### 6.3.1. Tumorstadium

#### Tumorstadium - Rezidivfreies Überleben und Gesamtüberleben

In den folgenden zwei Tabellen und Kaplan-Meier-Kurven wird das Rezidivfreie Überleben und Gesamtüberleben in unserem Patientenkollektiv in Abhängigkeit vom pT-Stadium dargestellt.

pT-Stadium und Rezidivfreies Überleben (RFS)				
Patienten	Rezidive	1-Jahres RFS-Raten	2-Jahres RFS-Raten	Log-Rang-Test p-Wert
<b>Gesamt</b>	29/112 (25,9%)	75%	60%	
<b>pTis/T1</b>	2/32 (6,3%)	93%	93%	p < 0,001
<b>pT2</b>	4/36 (11,1%)	88%	88%	
<b>pT3</b>	14/36 (38,9%)	70%	56%	
<b>pT4</b>	8/8 (100,0%)	13%	0%	

Tabelle 6.8: Rezidivfreies Überleben nach pT-Stadium

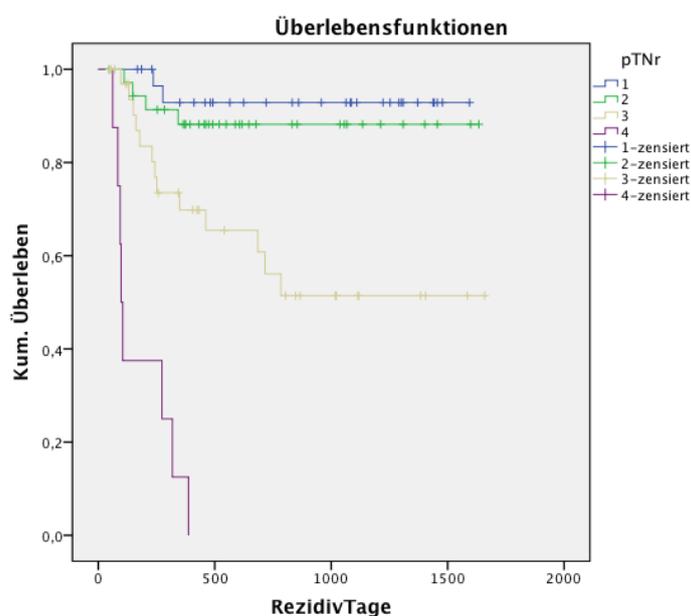
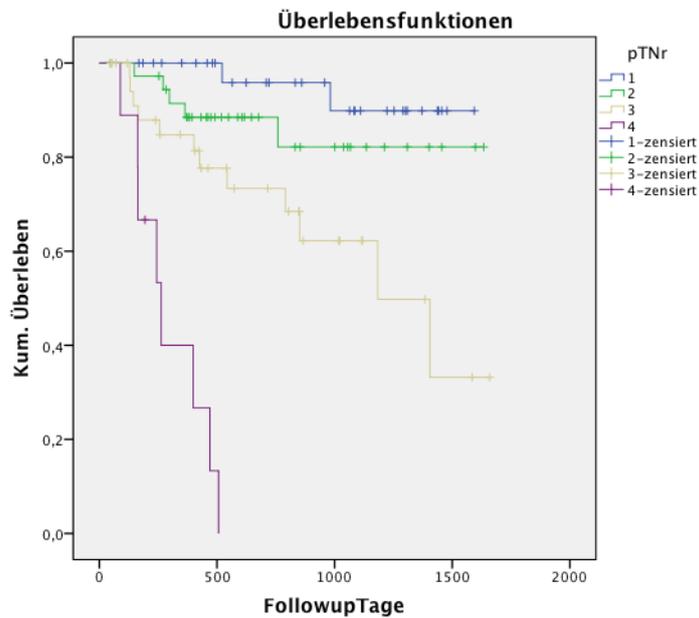


Abbildung 6.1: Rezidivfreies Überleben nach pT-Stadium

pT-Stadium und Gesamtüberleben (OS)				
Patienten	Todesfälle	1-Jahres	2-Jahres	Log-Rang-Test p-Wert
		OS-Raten	OS-Raten	
<b>Gesamt</b>	27/116 (23,3%)	84%	69%	p < 0,001
pTis/T1	2/33 (6,1%)	100%	96%	
pT2	5/37 (13,5%)	88%	88%	
pT3	12/37 (32,4%)	85%	73%	
pT4	8/9 (88,9%)	40%	0%	

**Tabelle 6.9: Gesamtüberleben nach pT-Stadium**



**Abbildung 6.2: Gesamtüberleben nach pT-Stadium**

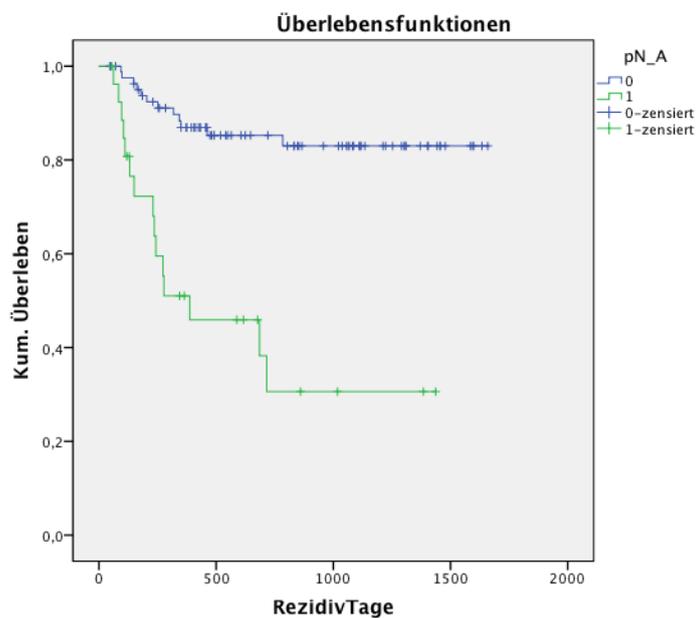
### 6.3.2. Lymphknotenstatus

#### Lymphknotenstatus - Rezidivfreies Überleben und Gesamtüberleben

In den folgenden zwei Tabellen und Kaplan-Meier-Kurven wird das Rezidivfreie Überleben und Gesamtüberleben in unserem Patientenkollektiv in Abhängigkeit vom pN-Status dargestellt.

pN-Stadium und Rezidivfreies Überleben (RFS)				
Patienten	Rezidive	1-Jahres	2-Jahres	Log-Rang-Test p-Wert
		RFS-Raten	RFS-Raten	
<b>Gesamt</b>	28/112 (25,0%)	75%	60%	
<b>pN0</b>	12/84 (14,3%)	87%	85%	p < 0,001
<b>pN1-3</b>	16/28 (57,1%)	51%	31%	

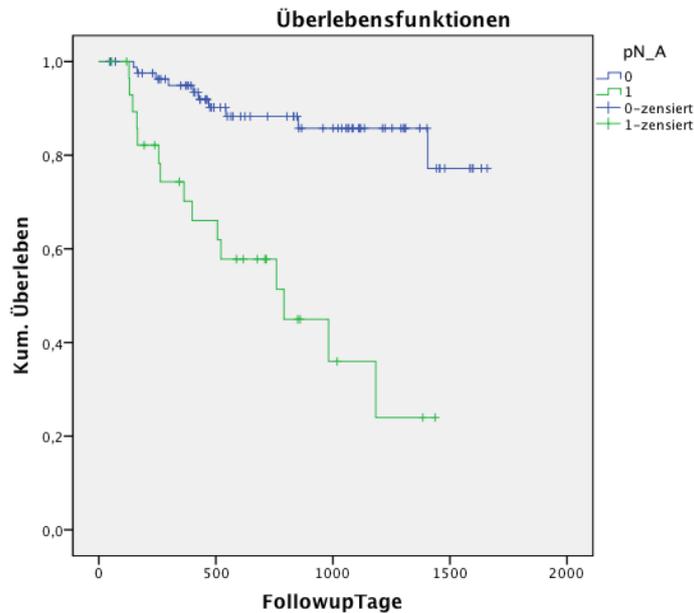
**Tabelle 6.10: Rezidivfreies Überleben nach pN-Status**



**Abbildung 6.3: Rezidivfreies Überleben nach pN-Status**

pN-Stadium und Gesamtüberleben (OS)				
Patienten	Todesfälle	1-Jahres	2-Jahres	Log-Rang-Test p-Wert
		OS-Raten	OS-Raten	
<b>Gesamt</b>	25/114 (21,9%)	84,3%	68,6%	
<b>pN0</b>	10/84 (11,9%)	94,5%	83,0%	p < 0,001
<b>pN1-3</b>	15/30 (50,0%)	65,4%	45,0%	

**Tabelle 6.11: Gesamtüberleben nach pN-Status**



**Abbildung 6.4: Gesamtüberleben nach pN-Status**

### Signifikanz Tumorstadium und Lymphknotenstatus

Im Log-Rang-Test wurden die Überlebensraten der verschiedenen Gruppen mit unterschiedlichen pT- bzw. pN-Status auf Gleichheit getestet. Die Nullhypothese, welche besagt dass kein Unterschied zwischen den verschiedenen Gruppen besteht, konnte verworfen werden. Die Unterschiede in den verschiedenen Gruppen sowohl beim Rezidivfreien Überleben als auch beim Gesamtüberleben, waren mit  $p < 0,001$  sowohl für den pT- als auch den pN-Status (RFS und OS), bei einem vorgegeben Signifikanzniveau von  $\alpha = 5\%$  ( $p = 0,05$ ), hochsignifikant. In unserem Patientenkollektiv korrelierten die klassischen Risikofaktoren des Harnblasenkarzinoms, ein erhöhtes pT-Stadium sowie ein positiver pN-Status erwartungsgemäß hochsignifikant mit verminderten 1- und 2-Jahres Raten für Rezidivfreies Überleben und Gesamtüberleben.

### 6.3.3. Weitere relevante Faktoren

#### Patienten ohne Therapie

Die drei Patienten, die keine Zystektomie und/oder Lymphadenektomie erhalten hatten waren alle (100%) innerhalb von drei bis neun Monaten nach Diagnosestellung tumorbedingt verstorben. Das mittlere Überleben betrug 5 Monate.

#### Chemotherapie

Von den 29 Patienten die eine Chemotherapie erhalten hatten, hatten 10 ein Rezidiv entwickelt (34,5%) und 9 waren verstorben (31,0%).

## **R1-Status und Prostatakarzinom**

Die Berechnung der 1- und 2-Jahres Überlebensraten wurde einmal für das Gesamtpatientenkollektiv berechnet und ein weiteres Mal ohne die Patienten mit R1-Status und/oder Prostatakarzinom um Fehlerquellen, die sich hieraus für die Ergebnisse ergeben können, zu vermeiden. Diese Gruppen werden als R0, kPCA und R0 + kPCA bezeichnet, die Ergebnisse für diese Gruppen sind im Verlauf noch einmal getrennt aufgeführt.

## **6.4. Molekulare Marker**

Im Folgenden werden die Rezidiv- und Todesfälle sowie die 1- und 2-Jahresraten für Rezidivfreies Überleben und Gesamtüberleben der jeweils Marker-negativen und der Marker-positiven Gruppe gegenübergestellt und aufgeführt.

### **6.4.1. CK20**

#### **Verwendung eines Cut-off Wertes**

88 von 117 Patientenproben (75%) hatten für CK20 einen  $2^{-\Delta\Delta Ct \text{ (Marker)}}$  Wert  $> 0$  und waren primär als positiv zu werten. Auch in der Kontrollgruppe mit gesunden Probanden hatten für CK20 14 von den 50 Proben (28%) positive Werte. Aus diesem Grund war es vor ersten Bewertungen notwendig einen Schwellenwert oder Cut-off Wert festzulegen.

### **6.4.2. CK20 Cut-off Wert 1,74752**

#### **Cut-off Wert 1,74752 - orientiert an der Kontrollgruppe**

Der höchste in der Kontrollgruppe mit gesunden Probanden für CK20 detektierte  $2^{-\Delta\Delta Ct \text{ (Marker)}}$  Wert lag bei 1,74752. Für die folgenden Ergebnisse wurde dieser Wert von 1,74752 als Cut-off Wert verwendet. Alle Patientenproben, die über diesem Cut-off Wert von 1,74752 lagen wurden damit als positiv und die unter oder auf diesem Wert lagen als negativ gewertet.

#### **CK20-Status (Cut-off Wert 1,74752) - Rezidivfreies Überleben und Gesamtüberleben**

In den folgenden zwei Tabellen und Kaplan-Meier-Kurven wird das Rezidivfreie Überleben und Gesamtüberleben in unserem Patientenkollektiv in Abhängigkeit vom CK20-Status bei einem Cut-off Wert von 1,74752 dargestellt.

CK20-Expression und Rezidivfreies Überleben (RFS), Cut-off 1,74752						
Patienten	Cut-off 1,74752	Anzahl	Rezidive	1-Jahres RFS-Raten	2-Jahres RFS-Raten	Log-Rang-Test p-Wert
Gesamt- kollektiv	CK20 neg	86/113 (76,1%)	22/113 (25,6%)	76%	74%	p = 0,699
	CK20 pos	27/113 (23,9%)	7/113 (25,9%)	82%	58%	

Tabelle 6.12: Rezidivfreies Überleben nach CK20-Status (Cut-off 1,74752)

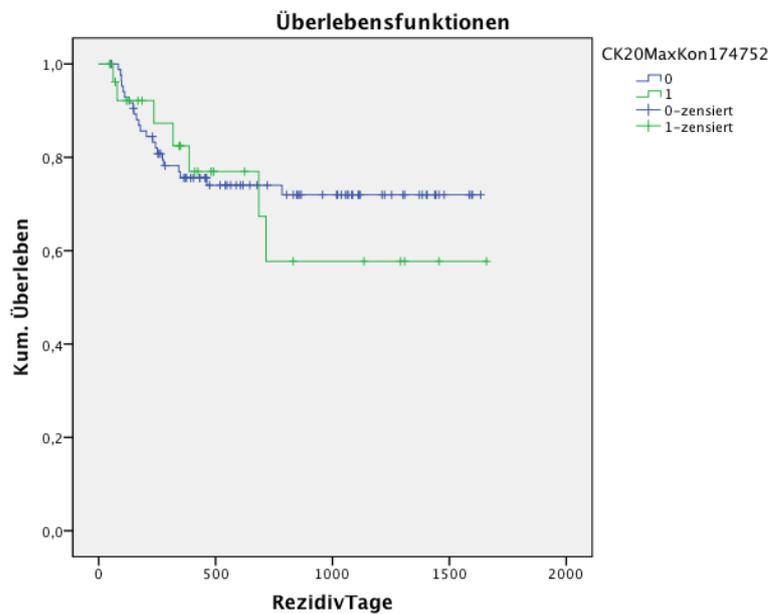
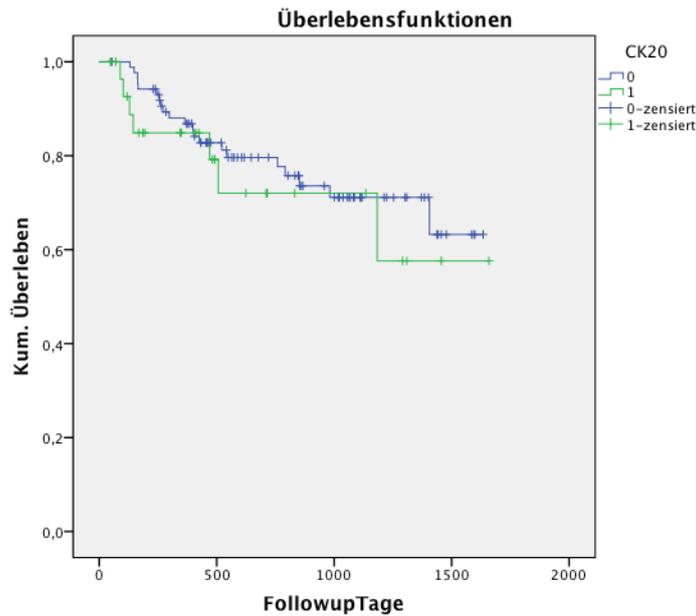


Abbildung 6.5: Rezidivfreies Überleben nach CK20-Status (Cut-off 1,74752)

CK20-Expression und Gesamtüberleben (OS), Cut-off 1,74752						
Patienten	Cut-off 1,74752	Anzahl	Todesfälle	1-Jahres OS-Raten	2-Jahres OS-Raten	Log-Rang-Test p-Wert
Gesamt- kollektiv	CK20 neg	88/117 (75,2%)	21/117 (23,9%)	87%	76%	p = 0,471
	CK20 pos	29/117 (24,8%)	7/117 (24,1%)	85%	72%	

Tabelle 6.13: Gesamtüberleben nach CK20-Status (Cut-off 1,74752)



**Abbildung 6.6: Gesamtüberleben nach CK20-Status (Cut-off 1,7475)**

#### **Signifikanz CK20 (Cut-off Wert 1,74752)**

Für die Auswertung bei einem Cut-off Wert von 1,74752 bestanden in der CK20-positiven Gruppe meist niedrigere Überlebensraten (RFS und OS) als in der CK20-negativen Gruppe. Zu einigen Zeitpunkten war dies jedoch entgegen unseren Erwartungen auch umgekehrt der Fall (siehe Kaplan-Meier-Kurve). Mit  $p = 0,699$  für das Rezidivfreie Überleben und  $p = 0,471$  für das Gesamtüberleben, unterschieden sich die Ergebnisse zwischen den beiden Gruppen, bei einem vorgegeben Signifikanzniveau von  $\alpha = 5\%$  ( $p = 0,05$ ), nicht signifikant voneinander.

#### **6.4.3. CK20 Cut-off Wert 0,96108**

##### **Cut-off Wert 0,96108 - berechnet durch den Log-Rang-Test**

In Zusammenarbeit mit dem Lehrstuhl für medizinische Statistik und Epidemiologie der technischen Universität München wurden verschiedene andere Cut-off Werte getestet und mithilfe des Log-Rang-Tests auf Signifikanz geprüft. Es erfolgte noch einmal eine Berechnung und Bewertung unserer Ergebnisse mit dem, am weitesten an das Signifikanzniveau heranreichenden Cut-off Wert. Dieser theoretische Cut-off Wert lag für CK20 bei 0,96108. Alle Patientenproben die über diesem Wert von 0,96108 lagen wurden damit als positiv und alle die auf oder unter diesem Wert lagen als negativ gewertet. Mit 0,96108 war dieser Cut-off Wert niedriger als der in der Kontrollgruppe erzielte  $2^{-\Delta\Delta Ct(\text{Marker})}$  Höchstwert von 1,74752. Entsprechend waren bei diesem Cut-off Wert mehr Patientenproben CK20-positiv als bei einem Cut-off Wert von 1,74752. Bei einem Cut-off Wert von 0,96108 waren aber auch 14% der

Proben aus der gesunden Kontrollgruppe positiv. Dies war ein geringerer Anteil als bei der Berechnung ohne Cut-off Wert, dennoch würden hier 14% als falsch positiv gewertet werden. Die Spezifität bei einem Cut-off Wert von 0,96108 liegt daher nur bei 86%.

### CK20-Status (Cut-off Wert 0,96108) - Rezidivfreies Überleben und Gesamtüberleben

In den folgenden zwei Tabellen und Kaplan-Meier-Kurven wird das Rezidivfreie Überleben und Gesamtüberleben in unserem Patientenkollektiv in Abhängigkeit vom CK20-Status bei einem Cut-off Wert von 0,96108 dargestellt.

CK20-Expression und Rezidivfreies Überleben (RFS), Cut-off 0,96108						
Patienten	Cut-off 0,96108	Anzahl	Rezidive	1-Jahres RFS-Raten	2-Jahres RFS-Raten	Log-Rang-Test p-Wert
Gesamt- kollektiv	CK20 neg	63/113 (55,8%)	14/113 (22,2%)	80%	78%	p = 0,265
	CK20 pos	50/113 (44,2%)	15/113 (30,0%)	73%	62%	

Tabelle 6.14: Rezidivfreies Überleben nach CK20-Status (Cut-off 0,96108)

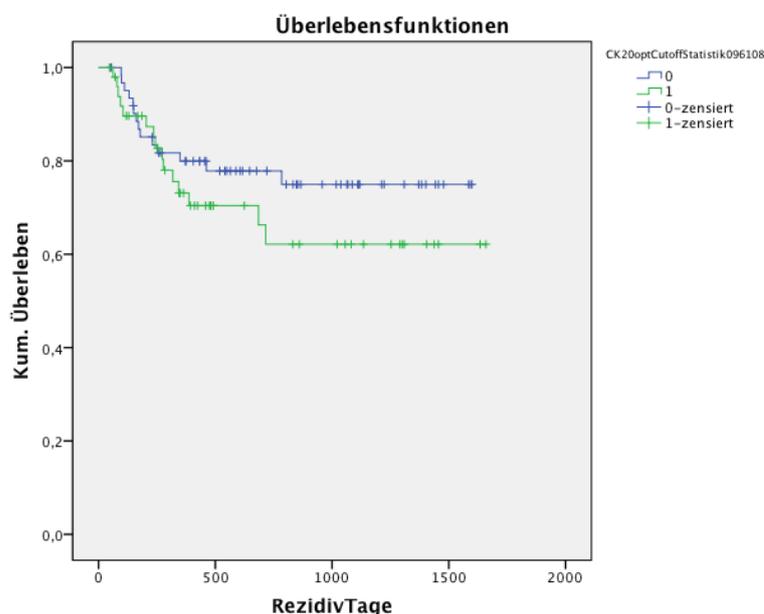
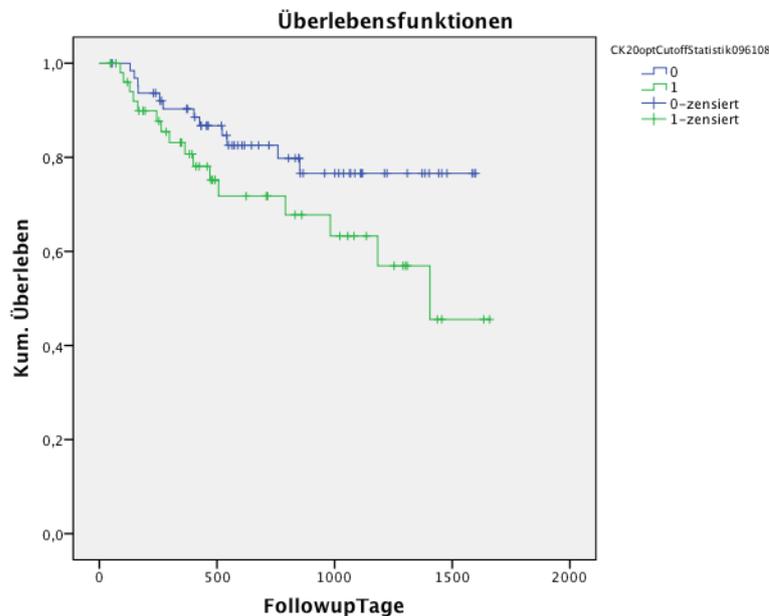


Abbildung 6.7: Rezidivfreies Überleben nach CK20-Status (Cut-off 0,96108)

CK20-Expression und Gesamtüberleben (OS), Cut-off 0,9610						
Patienten	Cut-off 0,96108	Anzahl	Todesfälle	1-Jahres OS-Raten	2-Jahres OS-Raten	Log-Rang-Test p-Wert
Gesamt- kollektiv	CK20 neg	65/117 (55,6%)	12/117 (18,5%)	90%	83%	P= 0,069
	CK20 pos	52/117 (44,4%)	16/117 (30,8%)	81%	72%	

**Tabelle 6.15: Gesamtüberleben nach CK20-Status (Cut-off 0,96108)**



**Abbildung 6.8: Gesamtüberleben nach CK20-Status (Cut-off 0,96108)**

### Signifikanz CK20 (Cut-off Wert 0,96108)

Für die Auswertung bei einem Cut-off Wert von 0,96108 waren die Überlebensraten (RFS und OS) in der CK20-positiven Gruppe durchgehend niedriger als in der CK20-negativen Gruppe. Mit  $p = 0,265$  für das Rezidivfreie Überleben und  $p = 0,069$  für das Gesamtüberleben unterschieden sich die Ergebnisse zwischen den beiden Gruppen, bei einem vorgegebenen Signifikanzniveau von  $\alpha = 5\%$  ( $p = 0,05$ ), jedoch ebenfalls nicht signifikant voneinander. Es zeichnete sich dennoch ein Trend ab, der für das Gesamtüberleben nahe an das Signifikanzniveau heranreicht.

### CK20-Expression nach pT-Stadium und pN-Status (Cut-off Wert 0,96108)

In der folgenden Tabelle sind die CK20-Expression (bei einem Cut-off Wert von 0,96108) sowie die Ereignisse Rezidiv und Todesfall in Abhängigkeit vom pT-Stadium und pN-Status dargestellt.

CK20-Expression nach pT-Stadium und pN-Status, Cut-off 0,96108			
Patienten	CK20	Rezidiv	Todesfall
pT1	33	2 (6,1%)	2 (6,1%)
	CK20 neg 16 (48%)	0 (0%)	0 (0%)
	CK20 pos 17 (52%)	2 (11,8%)	2 (11,8%)
pT2	37	4 (10,8%)	5 (13,5%)
	CK20 neg 22 (59%)	2 (9,1%)	3 (13,6%)
	CK20 pos 15 (41%)	2 (13,3%)	2 (13,3%)
pT3	37	14 (37,8%)	12 (32,4%)
	CK20 neg 24 (65%)	9 (37,5%)	7 (29,2%)
	CK20 pos 13 (35%)	3 (23,1%)	5 (38,5%)
pT4	9	8 (88,9%)	8 (88,9%)
	CK20 neg 1 (11%)	1 (100%)	1 (100%)
	CK20 pos 8 (89%)	7 (87,5%)	7 (87,5%)
pN0	84	12 (14,3%)	10 (11,9%)
	CK20 neg 50 (60%)	8 (16,0%)	6 (12,0%)
	CK20 pos 34 (40%)	4 (11,8%)	4 (11,8%)
pN1	30	16 (53,3%)	15 (53,3%)
	CK20 neg 13 (43%)	6 (46,2%)	5 (38,5%)
	CK20 pos 17 (57%)	10 (58,9%)	10 (58,9%)

**Tabelle 6.16: CK20-Expression nach pT-Stadium und pN-Status**

#### 6.4.4. SPINK1

##### **Verwendung eines Cut-off Wertes**

113 von 117 Patientenproben (97%) hatten für SPINK1 einen  $2^{-\Delta\Delta Ct (\text{Marker})}$  Wert  $> 0$  und waren primär als positiv zu werten. In der Kontrollgruppe mit gesunden Probanden hatten für SPINK1 sogar alle 50 Proben (100%) positive Werte. Aus diesem Grund war es insbesondere hier vor ersten Bewertungen notwendig einen Schwellenwert oder Cut-off Wert festzulegen.

##### **Cut-off Wert 2,37327 - orientiert an der Kontrollgruppe**

Der höchste in der Kontrollgruppe mit gesunden Probanden für SPINK1 detektierte  $2^{-\Delta\Delta Ct (\text{Marker})}$  Wert lag bei 2,37327. Für die folgenden Ergebnisse wurde dieser Wert von 2,37327 als Cut-off Wert verwendet. Alle Patientenproben, die über diesem Cut-off Wert von 2,37327 lagen wurden als positiv und die, die unter oder auf diesem Wert lagen als negativ gewertet. Bei Verwendung eines Cut-off Wertes von 2,37327 waren lediglich 6,0% der Patientenproben positiv. Die Suche nach einem besseren Cut-off Wert über den Log-Rang-Test verlief im Falle von SPINK1 ergebnislos, weshalb nur Ergebnisse für den oben erwähnten Cut-off Wert berechnet wurden.

##### **SPINK1-Status (Cut-off Wert 2,37327) - Rezidivfreies Überleben und Gesamtüberleben**

In den folgenden zwei Tabellen und Kaplan-Meier-Kurven wird das Rezidivfreie Überleben und Gesamtüberleben in unserem Patientenkollektiv in Abhängigkeit vom SPINK1-Status bei einem Cut-off Wert von 2,37327 dargestellt.

SPINK1-Expression und Rezidivfreies Überleben (RFS), Cut-off 2,37327						
Patienten	Cut-off 2,37327	Anzahl	Rezidive	1-Jahres RFS-Raten	2-Jahres RFS-Raten	Log-Rang-Test p-Wert
Gesamt- kollektiv	SPINK1 neg	106/113 (93,8%)	25/113 (23,6%)	80%	74%	P= 0,001
	SPINK1 pos	7/113 (6,2%)	4/113 (57,1%)	33%	33%	

Tabelle 6.17: Rezidivfreies Überleben nach SPINK1-Status (Cut-off 2,37327)

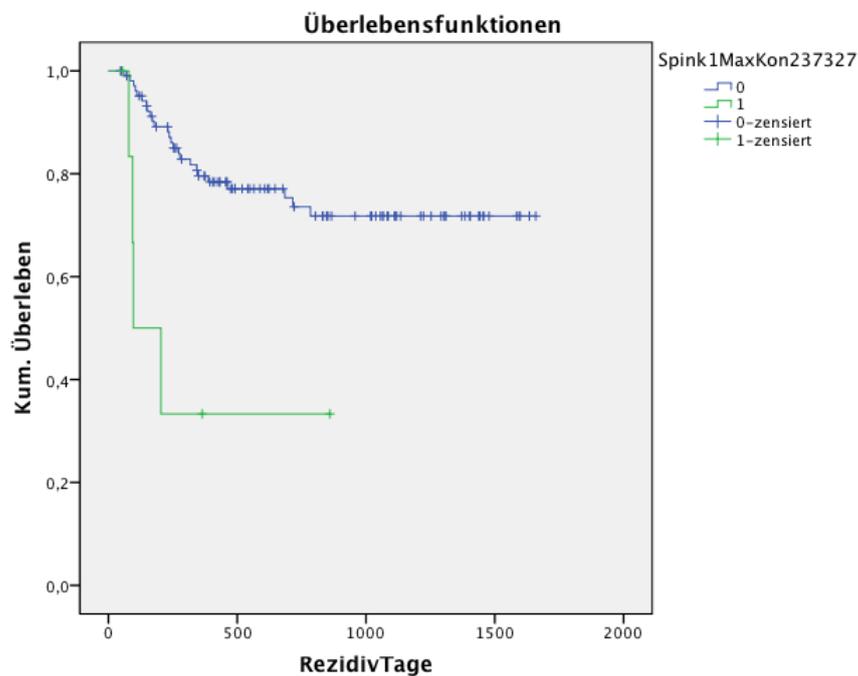
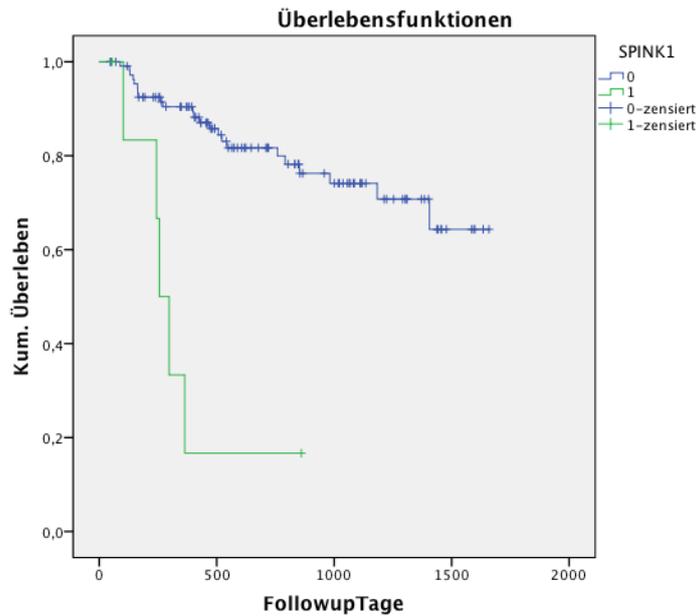


Abbildung 6.9: Rezidivfreies Überleben nach SPINK1-Status (Cut-off 2,37327)

SPINK1-Expression und Gesamtüberleben (OS), Cut-off 2,37327						
Patienten	Cut-off 2,37327	Anzahl	Todesfälle	1-Jahres OS-Raten	2-Jahres OS-Raten	Log-Rang-Test p-Wert
Gesamt- kollektiv	SPINK1 neg	110/117 (94,0%)	23/117 (20,9%)	90%	82%	p < 0,001
	SPINK1 pos	7/117 (6,0%)	5/117 (71,4%)	17%	17%	

Tabelle 6.18: Gesamtüberleben nach SPINK1-Status (Cut-off 2,37327)



**Abbildung 6.10: Gesamtüberleben nach SPINK1-Status (Cut-off 2,37327)**

#### **Signifikanz SPINK1 (Cut-off Wert 2,37327)**

Für diese Auswertung konnte im Log-Rang-Test die Nullhypothese welche besagt, dass die Überlebensraten in der SPINK1-positiven und in der SPINK1-negativen Gruppe gleich sind, verworfen werden. Mit  $p = 0,001$  beim Rezidivfreien Überleben und  $p < 0,001$  beim Gesamtüberleben unterschieden sich die Ergebnisse in den beiden Gruppen, bei einem vorgegebenen Signifikanzniveau von  $\alpha = 5\%$  ( $p = 0,05$ ), hochsignifikant. In unserem Patientenkollektiv korrelierten ein positiver SPINK1-Status hochsignifikant mit einem verminderten Rezidivfreien Überleben sowie verminderten Gesamtüberleben.

#### **Auswertung der Gruppen R0, kPCA, R0 + kPCA**

In der folgenden Tabelle werden die Ergebnisse in den Untergruppen R0, kPCA und R0 + kPCA für die beiden Marker CK20 und SPINK1 dargestellt. Es werden Rezidivfreies Überleben und Gesamtüberleben von Marker-positiver und Marker-negativer Gruppe verglichen. In diesen Untergruppen lagen die p-Werte für CK20 in der Regel höher, die p-Werte für SPINK1 waren etwa vergleichbar. Durch die Aufschlüsselung konnte keine Verbesserung der Signifikanz erzielt werden.

Untergruppen R0, kPCA, R0 + kPCA							
Patienten	Marker	1-Jahres	2-Jahres	Log-Rang-Test	1-Jahres	2-Jahres	Log-Rang-Test
		RFS-Raten	RFS-Raten	p-Wert RFS	OS-Raten	OS-Raten	p-Wert OS
<b>CK20 Cut-off 1,74752</b>							
<b>R0</b>	<b>CK20 neg</b>	79%	78%	p = 0,784	90%	87%	p = 0,841
	<b>CK20 pos</b>	89%	67%		91%	84%	
<b>kPCA</b>	<b>CK20 neg</b>	77%	75%	p = 0,972	87%	79%	p = 0,387
	<b>CK20 pos</b>	80%	71%		84%	65%	
<b>R0 + kPCA</b>	<b>CK20 neg</b>	84%	80%	p = 0,662	89%	88%	p = 0,559
	<b>CK20 pos</b>	83%	83%		88%	78%	
<b>CK20 Cut-off 0,96108</b>							
<b>R0</b>	<b>CK20 neg</b>	83%	81%	p = 0,641	93%	89%	P = 0,125
	<b>CK20 pos</b>	79%	70%		85%	82%	
<b>kPCA</b>	<b>CK20 neg</b>	80%	77%	p = 0,657	91%	83%	P = 0,075
	<b>CK20 pos</b>	74%	70%		79%	66%	
<b>R0 + kPCA</b>	<b>CK20 neg</b>	83%	81%	p = 0,810	93%	91%	P = 0,161
	<b>CK20 pos</b>	81%	81%		82%	77%	
<b>SPINK1 Cut-off 2,37327</b>							
<b>R0</b>	<b>SPINK1 neg</b>	84%	78%	P = 0,133	94%	90%	p < 0,001
	<b>SPINK1 pos</b>	61%	61%		20%	20%	
<b>kPCA</b>	<b>SPINK1 neg</b>	79%	75%	P = 0,137	90%	79%	P = 0,005
	<b>SPINK1 pos</b>	50%	50%		25%	25%	
<b>R0 + kPCA</b>	<b>SPINK1 neg</b>	85%	83%	P = 0,046	93%	89%	p < 0,001
	<b>SPINK1 pos</b>	50%	50%		25%	25%	

**Tabelle 6.19: Auswertung R0, kPCA, R0 + kPCA**

#### 6.4.5. Weitere Marker

Bei allen vier Markern waren in der Kontrollgruppe mit gesunden Probanden ebenfalls Proben mit  $2^{-\Delta\Delta Ct(\text{Marker})}$  Werten  $> 0$  aufgetreten. Als Cut-off Wert war bei der Auswertung wieder für jeden Marker zunächst der Höchstwert aus der gesunden Kontrollgruppe verwendet worden. Hierbei trat das Problem auf, dass für alle vier weiteren Marker jeweils nur ein einzelner Patient Marker-positiv (vs. Gesamtpatientenkollektiv Marker-negativ) oder Marker-negativ (vs. Gesamtpatientenkollektiv Marker-positiv) war. Aus diesem Grund erhielt man keine vergleichbaren und aussagekräftigen Gruppen (Marker-positiv vs. Marker-negativ).

##### **CK14**

Nur ein Patient im gesamten Patientenkollektiv war für CK14 positiv (0,9%). Bei diesem Patienten war jedoch weder ein Rezidiv noch der Todesfall eingetreten. Mit  $p = 0,550$  für das Rezidivfreie Überleben und  $p = 0,573$  für das Gesamtüberleben, bestand zwischen der CK14-positiven und der CK14-negativen Gruppe kein signifikanter Unterschied.

##### **CK17**

Alle Patienten bis auf einen waren für CK17 positiv (99,1%). Bei dem einen CK17-negativen Patienten war weder ein Rezidiv noch der Todesfall eingetreten. Mit  $p = 0,550$  für das Rezidivfreie Überleben und  $p = 0,530$  für das Gesamtüberleben, bestand zwischen der CK17-positiven und der CK17-negativen Gruppe kein signifikanter Unterschied.

##### **UPK2**

Ein Patient im gesamten Patientenkollektiv war für UPK2 positiv (0,9%). Bei diesem Patienten war ein Rezidiv diagnostiziert worden und der Patient ist tumorbedingt verstorben. Mit  $p < 0,001$  für das Rezidivfreie Überleben sowie das Gesamtüberleben, war zwischen der UPK2-positiven und der UPK2-negativen Gruppe hiermit ein hochsignifikanter Unterschied gegeben, der sich jedoch nur auf einen Patienten und ein einzelnes Ereignis bezog.

##### **TMPRSS2**

Derselbe Patient, der für UPK2 positiv war, war auch für TMPRSS2 positiv (0,9%). Auch für TMPRSS2 ergab sich damit ein  $p < 0,001$  für das Rezidivfreie Überleben sowie das Gesamtüberleben und damit ein hochsignifikanter Unterschied zwischen der TMPRSS2-positiven und der TMPRSS2-negativen Gruppe. Dieser bezog sich jedoch ebenfalls nur auf einen Patienten und ein einzelnes Ereignis.

### **Cut-off Werte - optimiert durch den Log-Rang-Test**

Neben den an der Kontrollgruppe orientierten Cut-off Werten wurde auch für CK14, CK17, UPK2 und TMRSS2 versucht über den Log-Rang-Test einen „optimalen“ Cut-off Wert zu ermitteln, d.h. einen Cut-off Wert, mit dem die Ergebnisse das Signifikanzniveau erreichen oder diesem nahe kommen. Für die Marker CK14, UPK2 und TMRSS2 fand sich jedoch kein Cut-off Wert mit einem  $p$  nahe oder  $< 0,05$ , der nicht so niedrig lag, dass ein Großteil (je nach Marker 28-78%) der PBMC-Kontrollproben positiv gewesen wären. Für CK17 konnte überhaupt kein Cut-off Wert gefunden werden, der eine bedeutsame Unterscheidung der Überlebensraten zwischen der CK17-positiven und der CK17-negativen Gruppe ergeben hätte.



# 7. Diskussion

## 7.1. Studiendesign

### 7.1.1. Motivation dieser Arbeit

Dies ist die erste Studie, die den Nachweis von disseminierten Tumorzellen im Knochenmark beim Blasenkarzinom mittels quantitativer real-time PCR und der Marker CK20, CK14, CK17, UPK2, SPINK1 und TMPRSS2 untersucht hat. Unserer Studie voraus ging die Arbeit von Retz und Roterling „Long-term follow-up of bladder cancer patients with disseminated tumour cells in bone marrow“ aus dem Jahre 2011. Retz und Roterling hatten mittels qualitativer RT-PCR Knochenmark von Blasenkarzinompatienten auf CK20 untersucht und hierbei einen signifikanten prognostischen Unterschied festgestellt. CK20-positive Patienten hatten ein schlechteres Outcome bezüglich Rezidivfreiem Überleben, Tumorspezifischem Überleben und Gesamtüberleben gezeigt [37]. Diese Ergebnisse von Retz und Roterling waren für uns Anreiz die Studie in dieser Form durchzuführen. Zusätzlich testeten wir neben CK20 im gleichen Durchgang fünf weitere bislang in diesem Zusammenhang noch nicht untersuchte Marker. Unsere Studienbedingungen, Daten und Ergebnisse werden auch im Kontext der Arbeit von Retz und Roterling diskutiert.

### 7.1.2. Vergleichbarkeit Patientenkollektiv

#### **Allgemeine Daten**

Das Patientenkollektiv war mit 117 Patienten relativ klein, allerdings waren es etwas mehr als doppelt so viele Patienten wie in der Studie von Retz und Roterling, die 51 Patienten untersucht hatten [37]. Es fiel ein etwas größerer Männeranteil von 78,6% auf, als dies allgemein beim Harnblasenkarzinom mit 73% der Fall ist. Das mittlere Erkrankungsalter unserer Patienten lag mit 66 Jahren deutlich unter dem allgemeinen mittleren Erkrankungsalter beim Harnblasenkarzinom (Männer 73 Jahre und Frauen 77 Jahre). Dies liegt daran, dass tendentiell jüngere Patienten für eine radikale Zystektomie in Frage kommen und hierdurch eine das Alter betreffende Vorauslese getroffen wurde. Auch bei Retz und Roterling lag das mittlere Erkrankungsalter mit 68,9 Jahre unter dem allgemeinen mittleren Erkrankungsalter [37].

## **Tumorstadien und Lymphknotenstatus**

Eine Teilnahme an unserer Studie wurde nur Patienten angeboten, bei denen eine radikale Zystektomie mit Lymphadenektomie geplant war. Aus diesem Grund sind mit 63,6% besonders Patienten mit Stadium pT2 und pT3 in unserer Studie vertreten, für die diese Therapie vorrangig in Frage kommt. Patienten mit organüberschreitenden Tumoren pT4 machten mit 7,8% einen kleinen Anteil aus. Häufig sind pT4-Tumoren soweit fortgeschritten, dass eine Zystektomie nicht mehr in Frage kommt. Die Patienten mit nicht-muskelinvasivem Tumorwachstum d.h. Stadium pTis oder pT1 machten 28,2% unserer Patienten aus. Grund für eine Zystektomie in den niedrigen Tumorstadien waren ein G3-Stadium in der Biopsie oder suspekter Lymphknoten im Staging. In der Arbeit von Retz und Roterling bestand eine vergleichbare Verteilung der Tumorstadien wie in unserer Studie [37]. Bei 26,3% der Patienten die eine Lymphadenektomie erhalten hatten wurden histologisch Lymphknotenmetastasen nachgewiesen. Die Rate an Lymphknotenmetastasen bei Erstdiagnose wird in der Literatur ähnlich mit ca. 25% angegeben [18, 19]. Ein positiver Lymphknotenstatus stieg in unserem Patientenkollektiv wie erwartet bei höheren pT-Stadien an. Die Fallzahlen bezüglich des pM-Status sind sehr gering (zwei Patienten M1) und nicht repräsentativ.

### **7.1.3. Methoden**

#### **Blasenkarzinomzelllinien**

Von den getesteten Markergenen ließen sich einige bereits bei den Vorversuchen nicht auf allen Blasenkarzinomzelllinien nachweisen. Es gab jedoch keine Zelllinie bei der alle Marker negativ waren. Es ist bekannt, dass unterschiedliche Tumorzellen verschiedene Gene unterschiedlich stark oder auch nicht exprimieren. Aufgrund dieser Tests mussten wir davon ausgehen, dass Tumore in vivo ebenfalls einzelne Marker nicht exprimieren. Bei diesen Patienten würde bei einem Testverfahren mit einem einzigen Marker von einem falsch negativen Ergebnis ausgegangen werden. Dies stützt unsere Annahme, dass für ein klinisches Testverfahren ein Marker alleine nicht in Frage kommt, sondern nur eine Kombination aus verschiedenen Markern.

#### **Gewinnung und Aufarbeitung der Knochenmarksproben**

Vor Knochenmarkspunktion wurde ein Hautschnitt gesetzt um eine Kontamination der Knochenmarksprobe mit Zellen aus Haut, Fett- und Muskelgewebe zu verringern. Dennoch kann eine Kontamination mit anderen Gewebezellen weder in unseren Versuchen noch in einem späteren klinischen Routineverfahren völlig ausgeschlossen werden. Die Wahrscheinlichkeit, dass hierdurch eine Verunreinigung mit

einem Marker entsteht, ist trotzdem gering. Lediglich die Cytokeratine unter unseren Markern werden in bestimmten Zellen der Haut und der Hautanhangsgebilde exprimiert (CK20 - Merkelzellen der Haut, CK14 - Basalzellen mehrschichtiger Epithelien, CK17 - Haarwurzel, Nagelwall). Für die anderen Marker ist nicht bekannt, dass sie überhaupt in Haut-, Muskel- oder Bindegewebe exprimiert werden (UPK2 - spezifisch für Urothel, SPINK1 - Pankreas und andere Drüsenepithelien, TMPRSS2 - Intestinales Epithel und andere Drüsenepithelien).

### **RNA-Gewinnung**

Auf eine DNase-Behandlung über Silikatsäulchen musste aufgrund der geringen Materialmenge verzichtet werden. Hierdurch sind Verunreinigungen mit kleineren Mengen genomischer DNA möglich, was später prinzipiell zu falsch positiven Ergebnissen führen kann. Um dies zu verhindern, wurden in der anschließenden qPCR exonübergreifende Primer verwendet.

### **Quantitative real-time PCR**

Vorteil der Polymerasekettenreaktion allgemein ist, dass durch die phasenweise exponentiell verlaufende Amplifikation bereits sehr kleine Mengen eines exprimierten Gens nachgewiesen werden können. Die RT-PCR ist ein qualitatives Nachweisverfahren, es ist nur die Unterscheidung zwischen positiv und negativ, d.h. das Gen wird exprimiert oder nicht, möglich. Bei der qPCR hingegen kann exakt angegeben werden, ab welchem Amplifikationszyklus das Amplifikationsprodukt detektierbar war, sie liefert damit insgesamt viel mehr Informationen. Hierdurch kann eine ungefähre Abschätzung erfolgen wie hoch die ursprüngliche Genexpression in den untersuchten Zellen bzw. im untersuchten Gewebe war. Es ist damit möglich (teilweise ist es auch notwendig) Cut-off Werte festzulegen, die unterschiedliche Einteilungen in Marker-positiv und -negativ vornehmen. Somit erweitern sich die Möglichkeiten und Aspekte unter denen man die vorhandenen Ergebnisse auswerten kann. Die qPCR bietet eine größere Flexibilität bezüglich der Datenauswertung und ermöglicht eine genaue Einschätzung, ab wann ein Signal relevant ist. Einen weiteren Vorteil stellt prinzipiell die höhere Sensitivität der qPCR dar. Die häufig bei der RT-PCR zur Sensitivitätssteigerung angewandte nested-PCR ist hierbei nicht mehr notwendig, womit Kontaminationsrisiko und Zeitaufwand verringert werden können. Ein weiterer Arbeitsschritt, die Separation des PCR-Produkts über eine Gelelektrophorese, fällt bei der qPCR weg. Die Ergebnisse werden parallel während der Amplifikationszyklen über einen Farbstoff gemessen. Um einen sicheren, homogenen und reproduzierbaren Reaktionsablauf zu haben, verwendeten wir fertige Primerpaarkombinationen und Farbstoffe. Durch die Positiv- und Negativkontrolle konnte bei jedem Durchgang

kontrolliert werden, ob die Reaktion regulär abgelaufen war. Über die Referenzgene wurden Qualitätsschwankungen von RNA und cDNA erkannt und falsch negative Ergebnisse aufgrund schlechter RNA- oder cDNA-Qualität verhindert.

### **Sensitivität**

Die Nachweisgrenze lag bei unseren Vorversuchen mit Zellverdünnungsreihen bei 10 Blasenkarzinomzellen auf  $10^6$  PBMC (Peripheral Blood Mononuclear Cells). Bei den Markern SPINK1 und CK17 lag die Nachweisgrenze sogar bei 1 Blasenkarzinomzelle auf  $10^6$  PBMCs. Für eine RT-PCR mit dem Marker CK20 wird die Nachweisgrenze bei 100 oder mehr Karzinomzellen in 3ml Vollblut angegeben, was etwa  $2-5 \times 10^6$  PBMC entspricht [67]. Für die qPCR werden in der Literatur Nachweisgrenzen von 1-10 Karzinomzellen auf  $10^6$ -  $10^7$  PBMC angegeben [54, 67]. Die in einer Zellverdünnungsreihe verwendete Blasenkarzinomzelllinie exprimiert das Markergen jedoch zuverlässig auf einem bestimmten Level. Diese Voraussetzung ist bei „normalen“ Tumorzellen nicht gegeben, da unterschiedliche Tumore der gleichen Tumorentität ein unterschiedliches Genexpressionsmuster haben können und unterschiedliche Gene stärker, schwächer oder überhaupt nicht exprimieren. Daher lässt sich das Model der Zellverdünnungsreihe nicht direkt auf die Realität übertragen. Es ist davon auszugehen, dass die Sensitivität im Patientenkollektiv und an Tumorgewebe wahrscheinlich niedriger ist und auch von Patient zu Patient bzw. von Tumor zu Tumor variiert. Ein quantitativer Rückschluss von der Markerexpression auf eine bestimmte Anzahl an Tumorzellen ist daher ebenfalls nicht genau. Für den klinischen Alltag steht jedoch auch nicht die Frage nach einer exakten Anzahl an nachgewiesenen Tumorzellen im Vordergrund sondern vielmehr die Frage ob ein hohes Expressionslevel eines bestimmten Markers mit hoher Tumoraggressivität und einer schlechten Prognose einhergeht.

### **Spezifität**

Die Hintergrundtranskription der Marker lag bei einem großen Anteil der PBMC-Proben von Gesunden in unseren Vorversuchen im messbaren Bereich. Ursache für die Hintergrundtranskription können prinzipiell Granulozyten innerhalb der PBMC-Fraktion sein. Zumindest für CK20 wurde beschrieben, dass es in geringen Mengen von Granulozyten exprimiert wird [65]. Aus diesem Grund waren die zu untersuchenden mononukleären Zellen zuvor noch einmal über einen Ficoll-Dichtegradienten von den Granulozyten getrennten worden. Nichts desto trotz kam es bei den PBMC-Proben von Gesunden für CK20 und alle anderen Marker zu positiven Ergebnissen (Werte > 0). Für CK17 und SPINK1 waren sogar alle Proben der gesunden Kontrollgruppe positiv. In der Arbeitsgruppe um Retz waren 2001 die Blutproben der gesun-

den Probanden allesamt für CK20 negativ gewesen [47]. Den Grund hierfür sehen wir in der höheren Sensitivität der qPCR gegenüber der bei Retz et al. verwendeten RT-PCR. In der qPCR können bereits so kleine Mengen detektiert werden, dass geringste nicht vermeidbare Verunreinigungen z.B. mit Granulozyten sowohl bei Gesunden als auch bei Erkrankten zu einem positiven Signal führen. Dies wäre bei der weniger sensitiven RT-PCR nicht relevant geworden. Würden in einem klinischen Test alle Proben mit Werten  $> 0$  als positiv gewertet werden, wäre die Spezifität der Methode je nach Marker mit 0 - 72% sehr schlecht. Der Umstand, dass bei Gesunden positive Werte auftreten schließt die Verwendung eines Markers prinzipiell nicht aus und ist im klinischen Alltag sogar häufig der Fall. Es macht jedoch notwendig einen Cut-off Wert festzulegen, anhand dessen eine unspezifische Hintergrundtranskription von einem relevant positiven Ergebnis unterschieden werden kann. Durch Einführung bzw. Erhöhung des Cut-off Wertes kann eine Verbesserung der Spezifität erzielt werden, sie führt jedoch gleichzeitig zur Verringerung der Sensitivität. Eine hohe Spezifität ist in jedem Fall wichtig. Eine hohe Sensitivität ist ebenfalls wünschenswert, wobei eine zu hohe Sensitivität wiederum zum Nachteil gereichen kann. Zum Beispiel wenn der Nachweis einer sehr geringen Menge des Markers bei Erkrankten ohne klinische Relevanz ist. Durch das Festlegen eines Cut-off Wertes sind die beiden Größen Spezifität und Sensitivität zu beeinflussen. Es ist daher gerade im Hinblick auf einen späteren klinischen Einsatz der Marker wichtig, wie hoch man den Cut-off Wert legt. Er ist so zu wählen, dass Spezifität und Sensitivität möglichst hoch sind, das heißt dass durch die Anwendung eines oder mehrerer Marker möglichst viele therapiebedürftige Kranke als krank (Sensitivität) und möglichst viele Gesunde als gesund (Spezifität) erkannt werden.

## 7.2. Patientenkollektiv

### 7.2.1. Klinische Parameter im Gesamtpatientenkollektiv

#### **Rezidiv- und Todesfälle, Rezidivfreies Überleben und Gesamtüberleben**

Am Ende des Studienzeitraumes hatten 25,7% der Patienten ein Rezidiv entwickelt und 23,9% aller Patienten waren verstorben. Der Großteil von ihnen mit 85,7% verstarb an den Folgen des Harnblasenkarzinoms. In der Arbeit von Retz und Rotering gab es wesentlich mehr Ereignisse zu verzeichnen, bei 43,7 % war ein Rezidiv aufgetreten und 43,4 % waren verstorben. Diese Zahlen entstanden jedoch in einem deutlich längeren Zeitraum von 7 Jahren [37]. Unser längstes Follow-up hingegen lag bei 4,5 Jahren, das mediane Follow-up bei lediglich 18,5 Monaten. Aufgrund des kurzen Follow-up Zeitraumes konnten wir zum aktuellen Zeitpunkt bei unseren Pati-

enten nur eine repräsentative 1-Jahres Überlebensrate angeben, hierbei waren 86 der insgesamt 117 Patienten (74%) in die Berechnung einbezogen gewesen. Es wurden auch 2-Jahres Überlebensraten berechnet, da zu diesem Zeitpunkt jedoch nur bei 48 Patienten ein Follow-up von >24 Monaten bestand, konnten hier mit 41% weniger als die Hälfte der Patienten in die Berechnung eingeschlossen werden. Leider ist der Vergleich mit anderen Studien hierdurch eingeschränkt, da meist 5- und 10-Jahres Überlebensraten (bei Retz und Rotering 5- und 7-Jahres Überlebensraten) angegeben werden. Die meisten Rezidive und tumorbedingten Todesfälle treten jedoch innerhalb der ersten 1-2 Jahre auf, häufig bereits sogar in den ersten 6 Monaten [16]. In unserem eigenen Patientenkollektiv, lag der Zeitraum zwischen Zystektomie und Rezidivdiagnose im Mittel beispielsweise bei 8,1 Monaten. Die angegebenen 1- und 2-Jahres Überlebensraten haben daher trotz des kurzen Follow-up Zeitraumes bereits eine recht gute Aussagekraft. Insgesamt ereignen sich über einen längeren Zeitraum dennoch mehr Ereignisse, was sich am Ende auf die Signifikanz der Ergebnisse auswirken kann.

### **Ossäre Metastasen**

Beim Nachweis disseminierter Tumorzellen im Knochenmark war neben dem Todesfall und dem Rezidiv allgemein vor allem die ossäre Metastasierung von Interesse. Es stellt sich die Frage ob die mithilfe der Marker im Knochenmark nachgewiesenen Tumorzellen im Zusammenhang mit späterer ossärer Metastasierung stehen. Knochenmetastasen fanden sich im Verlauf bei sieben (6,2%) unserer Patienten. Die ossäre Metastasierung kam in unserem Patientenkollektiv damit bei den Fernmetastasen nach der pulmonalen Metastasierung an zweiter Stelle. Von lediglich drei Patienten mit ossären Metastasen (42,9%) waren die Knochenmarksproben sowohl für CK20 als auch für SPINK1 positiv. Weniger als die Hälfte der Patienten nur, die im Verlauf ossäre Metastasen entwickelt hatten, hätten mithilfe der beiden Marker CK20 und SPINK1 detektiert werden können. Wiederum interessant sind die prognostischen Unterschiede zwischen der Marker-positiven und der Marker-negativen Gruppe. Alle drei CK20- und SPINK1-positiven Patienten waren im Follow-up Zeitraum verstorben (100%). Von den vier CK20- und SPINK1-negativen Patienten waren zwei verstorben (50%). Die Zeit bis zur Rezidivbildung betrug bei den CK20- und SPINK1-positiven Patienten im Schnitt 139 Tage bei den CK20- und SPINK1-negativen Patienten mit 271 Tagen etwa doppelt so lang. Es handelt sich hierbei nur um eine sehr kleine Anzahl an Patienten, Rezidiven und Todesfällen. In dieser kleinen Untergruppe zeichnete sich jedoch insgesamt ab, dass ein positiver CK20- und SPINK1-Status mit einer schlechteren Prognose einhergeht.

## 7.2.2. Marker-unabhängige prognostische Faktoren

### **Tumorstadium und Lymphknotenstatus**

Höheres Tumorstadium und positiver Lymphknotenstatus korrelierten wie erwartet signifikant mit einer schlechteren Prognose [18, 34]. Höheres Tumorstadium und positiver Lymphknotenstatus gingen als bekannte prognostische Risikofaktoren einher mit höheren Rezidiv- und Sterberaten bzw. niedrigeren 1- und 2-Jahres-Überlebensraten.

### **Patienten ohne Therapie**

Bei zwei Patienten war im Anschluss an die Knochenmarkspunktion keine Zystektomie durchgeführt worden. Beide Patienten verstarben innerhalb kurzer Zeit tumorbedingt. Ihre Knochenmarksproben waren getestet und mit ausgewertet worden. Von diesen beiden Patienten war einer für CK20 und SPINK1 positiv, der andere für beide Marker negativ. Die Auswirkung dieser Patienten auf die Ergebnisse der beiden wichtigsten Marker hebt sich damit auf.

### **Chemotherapie**

Adjuvante und neoadjuvante Chemotherapie wurden leitliniengerecht und patientenorientiert durchgeführt und betraf 24,8% der Patienten. Die Leitlinien bezüglich der Chemotherapieindikation haben sich in den letzten Jahren dahingehend geändert, dass sie mittlerweile bereits ab niedrigeren Tumorstadien empfohlen werden. Vor einigen Jahren war die Datenlage hierzu noch nicht ausreichend und die Patienten hatten Chemotherapien meist im Rahmen von Studien erhalten. Von den Patienten, die eine Chemotherapie erhalten hatten, hatten 34,5% ein Rezidiv entwickelt und 31,0% waren verstorben. Bei ihnen waren hiermit deutlich mehr Ereignisse aufgetreten als im Gesamtpatientenkollektiv. Dies erklärt sich dadurch, dass eine adjuvante Chemotherapie Patienten mit Tumorstadium pT3-4, Lymphknotenstatus pN1-3, M1 und R1 empfohlen wurde. Hierbei handelt es sich um eine Patientengruppe mit fortgeschrittenen Tumorstadien und einer generell schlechten Prognose. Die 5-Jahres Gesamtüberlebensrate für Patienten mit organüberschreitenden Tumoren (>pT3) lag vor 2003 bei 30-37%, innerhalb der ersten fünf Jahre verstarben somit in der Regel 63-70%. Für Patienten mit positivem Lymphknoten-Status lag die 5-Jahres Gesamtüberlebensrate bei 25-31%, das heißt 69-75% verstarben in den ersten fünf Jahren [18, 19]. Von unseren Patienten mit Tumorstadium pT3-4 und Lymphknotenstatus pN1-3, M1 und R1, welche eine Chemotherapie erhalten hatten, sind (bei kürzerem Beobachtungszeitraum) nur etwa halb so viele Patienten verstorben. Dies lässt auf eine Prognoseverbesserung durch die Chemotherapie schließen. Es lässt hoffen,

dass auch Patienten mit Mikrometastasen eventuell von einer Chemotherapie profitieren können, wenn denn die betroffene Risikogruppe durch einen Marker detektiert werden könnte.

### **R1-Status**

Nach Radikaler Zystektomie bestand bei einigen Patienten ein R1-Status, diese Patienten konnten somit nie als tumorfrei bezeichnet werden. Um auszuschließen, dass durch diese Gruppe Fehler in unseren Berechnungen entstanden sind, wurde die Signifikanz der Daten noch einmal für das Patientenkollektiv R0 berechnet. Die p-Werte lagen für CK20 in der Regel höher, die p-Werte für SPINK1 waren vergleichbar. Von den sieben Patienten mit R1-Status hatten fünf ein T4-, einer ein T3- und einer ein T1N1-Stadium, es waren Patienten mit einer allgemein schlechteren Prognose. Sechs der sieben Patienten mit R1-Status waren während des Studienzeitraumes verstorben. Da 71% der R1-Patienten CK20-positiv waren, verringerte sich durch das Herausfallen dieser Patienten die Anzahl an Ereignissen (Rezidive und Todesfälle) in der Gruppe der CK20-positiven Patienten deutlich, womit auch die Signifikanz der Ergebnisse sank. Die Aussagekraft von CK20 hatte sich durch das Herausrechnen der R1-Patienten sogar etwas verschlechtert. Für SPINK1 ergaben sich kaum Veränderungen, da die R1-Patienten allesamt SPINK1-negativ waren, bei insgesamt nur sieben SPINK1-positiven Patienten im Gesamtkollektiv.

### **Prostatakarzinom**

Bei 26 der männlichen Patienten wurde nach Entfernung und histologischer Untersuchung der Prostata ein inzidentelles Prostatakarzinom detektiert. Einige der von uns getesteten Marker wie SPINK1 und TMPRSS2 werden auch von Prostatakarzinomzellen (über-) exprimiert [94, 102]. Da das Prostatakarzinom häufig ossär metastasiert mussten wir bei dieser Patientengruppe falsch positive Ergebnisse in Betracht ziehen. Aus diesem Grund wurden alle Daten noch einmal für das Patientenkollektiv ohne die Patienten mit Prostatakarzinom (kPCA) berechnet. Die Gruppe kPCA zeigte vergleichbare Rezidivfreie- und Gesamtüberlebensraten wie das Gesamtpatientenkollektiv, die Patienten mit Prostatakarzinom hatten keinen relevanten Einfluss auf die Signifikanz unserer Ergebnisse. Dies liegt vermutlich daran, dass es sich bei allen Patienten außer einem bzgl. des Prostatakarzinoms um eine prognostisch günstige Situation handelte. Keiner der Patienten ist an dem Prostatakarzinom verstorben, das Prostatakarzinom war klinisch und auch für unsere Auswertung nicht relevant. Da sich durch die Aufschlüsselung in die Gruppen R0, kPCA und R0 + kPCA keine Verbesserung der Signifikanz ergab, werden im Folgenden die Ergebnisse im Gesamtpatientenkollektiv diskutiert.

## 7.3. Ergebnisse molekulare Marker

### 7.3.1. CK20

#### **Cut-off Werte bei CK20**

Obwohl in der Zellverdünnungsreihe eine ähnliche Sensitivität wie in anderen Arbeiten bestanden hatte, lag die Nachweisrate von CK20 im unserem Patientenkollektiv ohne Cut-off Wert mit 75% deutlich höher. Durch die Verwendung von Cut-off Werten wurde die Anzahl an positiven Patientenproben von 75% (kein Cut-off) auf 44,2% (0,96108) und 24,8% (1,74752) reduziert. In der Arbeit von Retz und Rotering lag der Anteil CK20-positiver Patienten im Gesamtpatientenkollektiv bei 31,4% [37]. Die Nachweisraten von CK20 mittels qPCR im peripheren Blut von Mammakarzinompatientinnen und Colonkarzinompatienten sind mit 22-29% angegeben [67]. Ohne Cut-off waren insgesamt 75% der Patientenproben und 28% der gesunden Probanden für CK20 positiv. Bei Verwendung eines Cut-off Wertes von 1,74752, der höchste in der gesunden Kontrollgruppe vorkommende Wert, waren 24,8% der Patientenproben positiv und alle gesunden Probanden negativ. Bei einem Cut-off Wert von 0,96108, berechnet durch den Log-Rang-Test, waren 44,2% der Patientenproben und 14% der gesunden Probanden CK20-positiv. Durch die Cut-off Werte wurden die Nachweisraten in einen Bereich gesenkt, der gleich und leicht höher als in den anderen Arbeiten lag. Dies spricht dafür, dass eine sinnvolle Trennung zwischen relevanter und nicht-relevanter CK20 Expression erfolgt ist.

#### **Ergebnisse für die unterschiedlichen Cut-off Werte**

Bei einem Cut-off Wert von 1,74752 bestand mit p-Werten von 0,699 für RFS und 0,471 für OS kein nennenswerter Unterschied zwischen den Überlebensraten der CK20-positiven und der CK20-negativen Gruppe. Dies steht im Gegensatz zu dem signifikanten Unterschied mit  $p = 0,007$  für RFS und  $p = 0,006$  für OS, der von der Arbeitsgruppe Retz und Rotering festgestellt wurde [37]. Bei der Berechnung mit dem „optimierten“ Cut-off Wert von 0,96108 waren die erwarteten Unterschiede zwischen der CK20-positiven und der CK20-negativen Gruppe zu verzeichnen. RFS- und vor allem OS-Raten waren in der CK20-positiven Gruppe deutlich niedriger. Mit p-Werten von 0,265 für RFS und 0,069 für OS wurde das vorgegebene Signifikanzniveau jedoch wiederum nicht ganz erreicht.

## **Bewertung der Ergebnisse für CK20**

Die Ergebnisse von Retz und Rotering von 2011, die zwischen der CK20-positiven und der CK20-negativen Gruppe signifikante Unterschiede für RFS und OS festgestellt hatten [37] konnten von uns nicht vollständig reproduziert werden. Unsere Ergebnisse zeigten zwar einen übereinstimmenden Trend, der signifikante Unterschied zwischen der CK20-positiven und der CK20-negativen Gruppe konnte in unserem Beobachtungszeitraum jedoch nicht bestätigt werden. Hier stellt sich die Frage, was die bedeutenden Unterschiede zwischen unserer Studie und der von Retz und Rotering sind, die zu diesen unterschiedlichen Ergebnissen geführt haben. Zunächst war das Patientenkollektiv bei Retz und Rotering mit 51 Patienten kleiner, wodurch einzelne Ereignisse (Rezidiv- und Todesfälle) mehr Gewicht bekamen. Durch das längere Follow-up von über 9 Jahren waren zudem mehr Ereignisse aufgetreten als in unserem Beobachtungszeitraum. Die Anzahl an Ereignissen kann sich stark auf die Signifikanz auswirken, wenige Ereignisse schränken die Aussagekraft der Ergebnisse insgesamt ein. Der wichtigste Unterschied in der Methodik ist die von uns verwendete quantitative real-time PCR mit einer deutlich höherer Sensitivität gegenüber der von Retz und Rotering verwendeten qualitativen RT-PCR. Durch die hohe Sensitivität kam es in unserer Studie zu positiven gesunden Kontrollproben und zu einer niedrigeren Spezifität. Bei der von uns verwendeten Methode der qPCR konnte und musste daher mit Cut-off Werten gearbeitet werden. Dies war bei der von Retz und Rotering angewandten qualitativen RT-PCR nicht der Fall und nicht notwendig. Obwohl über den Log-Rang-Test alle Cut-off Werte getestet wurden und ein für unser Patientenkollektiv optimierter Wert gefunden wurde, bleibt die Diskussion über den optimalen Cut-off Wert bestehen. Grenzwerte die in klinischen Routinetests zwischen einem physiologischen und einem pathologischen Wert unterscheiden, können nur in großen Kollektiven ermittelt werden, hierfür sind die 117 in unserer Studie eingeschlossenen Patienten und die 50 gesunden Probanden nicht ausreichend. Der bei uns ermittelte Cut-off Wert von 0,96108 muss daher in weiteren größeren Studien überprüft und eventuell angepasst werden. Unsere Ergebnisse stehen mit den Ergebnissen von Retz und Rotering nicht im Widerspruch. Zum aktuellen Zeitpunkt können wir bestätigend angeben, dass bei einem Cut-off Wert von 0,96108 ein Trend besteht, dass CK20-positive Patienten schlechtere Überlebensraten haben als CK20-negative Patienten. Ob bei diesem oder einem anderen Cut-off Wert, in größeren Patientenkollektiven und über längere Beobachtungszeiträume erneut das Signifikanzniveau erreicht werden kann, müssen weitere Studien zeigen. Auch die in dieser Arbeit beschriebene Studie läuft weiter, es wurden weitere Patienten eingeschlossen und ihr Knochenmark auf CK20 getestet. Es wird weiterhin ein Follow-up

bei den teilnehmenden Patienten durchgeführt und der Zusammenhang zwischen CK20-Status und Überleben untersucht. In einigen Jahren können die Ergebnisse bezogen auf ein größeres Patientenkollektiv, mit einem längeren Follow-up und mehr Ereignissen untersucht werden und die derzeit offenen Fragen beantworten.

### **CK20 - ein unabhängiger prognostischer Marker**

Bei Retz und Rotering hatte sich das Vorhandensein von CK20-positiven Zellen für alle drei Endpunkte, Rezidivfreies Überleben, Tumorspezifisches Überleben und Gesamtüberleben, als vom Tumorstadium unabhängiger, signifikanter prognostischer Marker erwiesen [37]. Bei uns korrelierte die CK20-Expression (Berechnung mit einem Cut-off Wert von 0,96108) ebenfalls nicht mit dem Tumorstadium. Die CK20-Expression stieg nicht kontinuierlich mit dem Tumorstadium an. Es fiel allerdings eine sehr hohe CK20-Expressionsrate (89%) bei den Patienten mit pT4-Stadium auf, acht von neun Patienten waren hier CK20-positiv. Bei den pT1- und pT2-Patienten gab es in der Gruppe der CK20-positiven Patienten mehr Rezidiv- und Todesfälle als in der CK20-negativen Gruppe. Bei den pT3- und pT4-Patienten war es umgekehrt, hier gab es weniger Rezidiv- und Todesfälle in der CK20-positiven als in der CK20-negativen Gruppe. Dies bedeutet, dass CK20 vor allem bei niedrigeren Tumorstadien als prognostischer Marker in Frage kommt. Genau in dieser Gruppe wäre es relevant einen Marker zu haben, der Patienten mit einem höheren Risiko aufzeigt und deren Prognose durch eine adjuvante Therapie eventuell verbessert werden könnte. Bei Vorhandensein von organüberschreitenden Tumoren (pT3 und pT4), Lymphknoten- oder sogar Fernmetastasen verliert der Nachweis von Mikrometastasen an Bedeutung. Diese Patienten erhalten bei kurativer Intention bereits eine maximal aggressive Tumorthherapie.

### 7.3.2. SPINK1

#### **Bewertung der Ergebnisse für SPINK1**

In unserer Studie bestand ein klarer Zusammenhang zwischen erhöhter SPINK1-Expression im Knochenmark und einer schlechteren Prognose. Diese Ergebnisse sind mit einem Cut-off Wert von 2,37327, orientiert an der Kontrollgruppe, berechnet. Mit p-Werten von  $p = 0,001$  für RFS und  $p < 0,001$  für OS sind die Ergebnisse hochsignifikant. Insgesamt sind unsere Daten überraschend, wenn man die vorausgegangenen Studien zu SPINK1 beim Harnblasenkarzinom betrachtet. SPINK1 war zuvor noch nicht zum Nachweis von disseminierten Tumorzellen herangezogen worden. Die SPINK1-Expression ist jedoch in Harnblasenkarzinom-Primärtumoren untersucht worden. Hierbei hatte in verschiedenen Studien der Verlust oder die Verminderung der SPINK1-Expression mit einem aggressiveren Tumorverhalten sowie kürzeren Überlebenszeiten korreliert [96-98]. Lediglich Gkialas et al. hatten eine erhöhte SPINK1-Konzentration bei Patienten mit Harnblasenkarzinom gegenüber Gesunden nachweisen können. In dieser Studie wurde allerdings direkt das Protein nicht seine mRNA untersucht, der Nachweis erfolgte außerdem im Urin und nicht in Tumor- oder Metastasengewebe [107]. SPINK1 wurde als ein Marker ausgewählt, der von unserer Arbeitsgruppe zunächst beim Prostatakarzinom untersucht worden war. Uns interessierte wie sich die Expression von SPINK1 im Harnblasenkarzinom und in disseminierten Tumorzellen verhält. Es war davon auszugehen, dass ein großer Teil der Tumoren wenig oder keine SPINK1 mRNA exprimiert. Dies ist auch eine mögliche Erklärung warum nur 6% der Patienten überhaupt eine höhere SPINK1-Expression zeigten als die Kontrollgruppe mit gesunden Probanden. Umso interessanter sind die Ergebnisse, dass eine erhöhte SPINK1-Expression im Knochenmark bei uns hochsignifikant mit schlechteren Überlebensraten korrelierte. Dies ist in der Literatur so bisher nicht beschrieben. Unsere Ergebnisse stützen sich allerdings auf wenige Fallzahlen. Dennoch wäre, wenn sich diese Ergebnisse in einem größeren Patientenkollektiv reproduzieren lassen, mit SPINK1 ein neuer prognostischer Marker zur Detektion von disseminierten Tumorzellen im Knochenmark beim Harnblasenkarzinom vorhanden.

### 7.3.3. Weitere Marker

#### **Bewertung der Ergebnisse für CK14, CK17, UPK2 und TMPRSS2**

Die vorliegenden Ergebnisse lassen uns CK14 und CK17 als Marker zur Detektion disseminierter Tumorzellen im Knochenmark beim Harnblasenkarzinom verwerfen. UPK2 und TMPRSS2 sind aktuell ebenfalls nicht als geeignete Marker zu werten. CK14 und CK17 waren bislang nicht zur Detektion von disseminierten Tumorzellen beim Harnblasenkarzinom herangezogen worden. TMPRSS2 war noch überhaupt nicht als Marker beim Harnblasenkarzinom verwendet worden. Es waren somit Marker, bei denen wir nicht einschätzen konnten, welche Ergebnisse uns erwarteten und ob sich einer von ihnen für unsere Fragestellung eignen wird. Bei UPK2 handelt es sich jedoch um den nach CK20 am Zweithäufigsten beim Harnblasenkarzinom getesteten Marker. Er wurde bereits zur Detektion von disseminierten Tumorzellen in PBMC [91, 92] und Lymphknoten bei Patienten mit Harnblasenkarzinom herangezogen. Bei Studien zu disseminierten Tumorzellen in Lymphknoten wurden schlechtere Überlebensraten bei UPK2-positiven Patienten festgestellt [71, 93]. Studien zur Detektion von disseminierten Tumorzellen im Knochenmark gab es mit UPK2 zuvor noch keine. Unsere Erwartungen für die Ergebnisse zu UPK2 waren dementsprechend hoch. Für UPK2 war jedoch bei dem am Höchstwert in der Kontrollgruppe orientierten Cut-off Wert nur noch ein Patient positiv. Ein besserer Cut-off Wert konnte nicht ermittelt werden, die UPK2-Werte von Kranken und Gesunden lagen hierfür zu nah beieinander. Der eine UPK2-positive Patient hat ein Rezidiv entwickelt und ist verstorben. Dieser Umstand kann, da es sich hierbei nur um einen einzelnen Patienten und ein Ereignis handelt, jedoch nur sehr eingeschränkt bewertet werden. Dies gilt analog für die Ergebnisse zu TMPRSS2. Zudem war dieser eine Patient auch für die Marker CK20 und SPINK1 positiv, sodass UPK2 und TMPRSS2 zumindest in diesem Fall in Kombination mit anderen Markern keine zusätzliche Information erbrachten.

## 7.4. Kommentar

### 7.4.1. Fazit

Ziel unserer Arbeit war es bei Patienten mit lokal infiltriertem Harnblasenkarzinom zum Zeitpunkt der primären Therapie, Zystektomie und Lymphadenektomie, mögliche disseminierte Tumorzellen im Knochenmark mithilfe sechs verschiedener Marker nachzuweisen. Unsere Arbeitshypothese (entspricht der Alternativhypothese) war, dass die Überlebensraten von Marker-positiven Patienten kleiner sind als die von Marker-negativen. Für CK20 war die Arbeitshypothese bei einem Cut-off Wert von 0,96108 für RFS lediglich mit einer Wahrscheinlichkeit von 73,5% und für OS mit einer Wahrscheinlichkeit von 93,1% richtig (RFS  $p = 0,265$ , OS  $p = 0,069$ ), die Ergebnisse waren nicht signifikant. Für den Marker SPINK1 stimmte bei einem Cut-off Wert von 2,37327 unsere Arbeitshypothese mit einer Wahrscheinlichkeit von 99,9% ( $p = 0,001$ ), die Ergebnisse waren hochsignifikant. Für CK20 wurde das Signifikanzniveau nicht erreicht und bei SPINK1 war die Anzahl an SPINK1-positiven Patienten sehr klein. Trotz dieser Einschränkungen bezüglich der Aussagekraft sind die Ergebnisse dieser beiden Marker vielversprechend. Sowohl für CK20 als auch für SPINK1 zeichnete sich in der Marker-positiven Gruppe eine schlechtere Prognose ab. Beide Marker haben bei entsprechenden Folgeergebnissen Potential Eingang in einem molekularen Analyseverfahren in der klinischen Routinediagnostik zu finden. Aufgrund unterschiedlicher Expressionsspektren der verschiedenen Tumore ist, wie auch die Ergebnisse unserer Blasenkarzinomzelllinien zeigten, in der klinischen Routinediagnostik die Testung eines Multi-Marker Panels wichtig. Hierdurch verringert sich die Wahrscheinlichkeit disseminierte Tumorzellen, die einen bestimmten Marker nicht exprimieren, zu übersehen. Sensitivität und Spezifität können durch die Kombination mehrerer Marker verbessert werden. Die vier weiteren von uns getesteten Marker CK14, CK17, UPK2 und TMPRSS2 hatten sich für die Detektion von disseminierten Tumorzellen im Knochenmark bei Harnblasenkarzinompatienten in unserer Studie aktuell als ungeeignet erwiesen. Neben CK20 und SPINK1 muss daher nach weiteren geeigneten Markern gesucht werden.

### 7.4.2. Ausblick

Man erhofft sich für den klinischen Alltag zusätzlich zu den bislang verwendeten Prognosemarkern (Tumorstadium, Lymphknotenstatus, Gefäßinvasion und Grading) neue zusätzliche Marker um das individuelle Risiko und die Therapieoptionen für einen Patienten besser als bisher einschätzen zu können. An diesem Punkt setzte unsere Studie an. Mit CK20 und SPINK1 haben wir zwei Marker getestet, die in diesem

Kontext in Zukunft eventuell Anwendung finden können. Hierfür müssen Studien folgen, die beide Marker in größeren Patientenkollektiven und über längere Zeiträume untersuchen. Für CK20 ist es vor allem von Interesse, ob es in größeren Patientenkollektiven und bei längeren Beobachtungszeiträumen gelingt einen Cut-off Wert zu ermitteln, der das Signifikanzniveau erreicht. Für SPINK1 gilt zunächst, die hochsignifikanten Ergebnisse in einem größeren Patientenkollektiv zu reproduzieren und zu bestätigen. Ergebnisse hierzu werden auch aus unserer Arbeitsgruppe folgen, mit der Auswertung der Ergebnisse zu dieser Arbeit ist die Studie nicht beendet. Ein wesentlicher Faktor zukünftiger Studien wird immer auch das Überprüfen und Optimieren der Cut-off Werte sein, um eine größtmögliche Sensitivität und Spezifität des Nachweisverfahrens zu erreichen. Grenzwerte, die festlegen wann ein Wert noch physiologisch ist und ab wann ein Wert als pathologisch gewertet werden muss, können nur über das Testen großer Probanden- und Patientenkohorten gefunden werden. Falls sich unsere Ergebnisse dauerhaft für CK20 erhärten und für SPINK1 reproduzieren lassen, kommen weiterführende klinische Studien in Betracht. Es wäre dann zu überprüfen ob und durch welche Therapieansätze z.B. Chemotherapie oder Antikörpertherapie, die Prognose von Patienten mit disseminierten Tumorzellen beim Harnblasenkarzinom zu verbessern ist.



## 8. Zusammenfassung

Das Harnblasenkarzinom steht an vierter Stelle der Krebsneuerkrankungen der Männer und an vierzehnter Stelle der Krebsneuerkrankungen der Frauen in Deutschland. Jährlich sterben über 5500 Menschen in Deutschland am Harnblasenkarzinom [1]. Auch bei nicht-organüberschreitendem Wachstum, d.h. Tumorstadium pT1 und pT2 liegt die 5-Jahres Gesamtüberlebensrate nur bei etwa 68-74% [18, 19]. Als Grund hierfür wird angenommen, dass bereits zum Zeitpunkt der primären Therapie (der radikalen Zystektomie mit Lymphadenektomie) disseminierte Tumorzellen vorhanden sind, aus denen später ein Tumorrezidiv entsteht [40].

Die derzeitigen diagnostischen Möglichkeiten wie Bildgebung und Histologie können disseminierte Tumorzellen nicht detektieren. Man geht davon aus, dass etwa 40% der Patienten, die eine aggressivere bzw. weitreichendere Therapie benötigen würden, derzeit nicht erkannt werden [54]. Aus diesem Grund wird seit einigen Jahren an Methoden geforscht, disseminierte Tumorzellen zu detektieren, vorwiegend in Lymphknoten, im peripheren Blut oder im Knochenmark. Die Polymerasekettenreaktion ist hierfür ein sensitives Verfahren und wird zunehmend eingesetzt. Mittels PCR werden disseminierte Tumorzellen über tumorspezifische Marker bzw. deren mRNA in Geweben nachgewiesen, in welchen diese normalerweise nicht vorkommen.

Retz und Rotering hatten 2011 eine Arbeit veröffentlicht in der sie disseminierte Tumorzellen mithilfe des Markers CK20 im Knochenmark von Blasenkarzinompatienten nachwiesen. CK20-positive Patienten hatten hierbei ein signifikant schlechteres Outcome bezüglich Rezidivfreiem Überleben, Tumorspezifischem Überleben und Gesamtüberleben [37]. Wir testeten ebenfalls Knochenmark von Blasenkarzinompatienten auf CK20 sowie auf fünf weitere Marker CK14, CK17, UPK2, SPINK1 und TMPRSS2. Dann verglichen wir die Rezidivfreien- (RFS), und die Gesamtüberlebensraten (OS) von Marker-positiven und Marker-negativen Patienten miteinander. Im Gegensatz zu Retz und Rotering, die eine qualitative Reverse Transkriptase PCR verwendet hatten, verwendeten wir die neuere und noch einmal sensitivere Methode der quantitativen real-time PCR. Ziel unserer Arbeit war es, CK20 als einen vom Tumorstadium unabhängigen prognostischen Marker zu bestätigen und zu untersuchen, ob dies für die anderen Marker zutrifft.

Durch die höhere Sensitivität der quantitativen real-time PCR waren bei einem deutlich größeren Anteil der Patienten, aber auch bei einem Teil der Gesunden aus der Kontrollgruppe die Knochenmarksproben Marker-positiv. Es mussten daher Grenzwerte (Cut-off Werte) eingeführt werden, anhand denen die Patienten noch einmal in Marker-positiv und -negativ eingeteilt wurden. Diese orientierten sich zunächst am höchsten Wert, der für einen Marker in der Kontrollgruppe auftrat.

Für CK20 wurde entsprechend eine Berechnung mit einem Cut-off Wert von 1,74752 vorgenommen. Hierbei bestand bezüglich des Überlebens kein Unterschied zwischen CK20-positiven und CK20-negativen Patienten ( $p = 0,699$  für RFS,  $p = 0,471$  für OS). Dies stand im Gegensatz zu den Ergebnissen von Retz und Rotering. Es wurden daher mithilfe des Log-Rang-Tests weitere Cut-off Werte überprüft. Die größtmögliche Unterscheidung zwischen CK20-positiver und CK20-negativer Gruppe lieferte ein Cut-off Wert von 0,96108. Hier bestand bezüglich der Überlebensraten ein deutlicher Unterschied zwischen CK20-positiven und CK20-negativen Patienten. Der Unterschied war nicht signifikant ( $p = 0,265$  für RFS,  $p = 0,069$  für OS), man kann jedoch von einem Trend sprechen, dass (bei einem Cut-off Wert von 0,96108) der Nachweis von CK20 mit einer schlechteren Prognose korreliert. Für das Gesamtüberleben reicht dieser Trend nahe an das vorgegebene Signifikanzniveau von 5% heran. Die CK20-Expression war in unserem Patientenkollektiv ebenfalls unabhängig vom Tumorstadium. Insgesamt konnten die signifikanten Ergebnisse für CK20, wie sie von Retz und Rotering nachgewiesen wurden, von uns aktuell nicht reproduziert werden.

Ein überraschend gutes Ergebnis wurde hingegen mit dem Marker SPINK1 erzielt, der zuvor noch nicht zum Nachweis von disseminierten Tumorzellen verwendet worden war. 2,37327 entsprach dem höchsten Wert für SPINK1 in der Kontrollgruppe. Bei der Berechnung mit einem Cut-off Wert von 2,37327 bestand bezüglich der Überlebensraten ein hochsignifikanter Unterschied zwischen den SPINK1-positiven und den SPINK1-negativen Patienten ( $p = 0,001$  für RFS,  $p < 0,001$  für OS). Diese Daten stützen sich auf nur wenige Fallzahlen, da nur 6% der Patienten eine SPINK1-Expression über dem Level der Kontrollgruppe zeigten. Mit dem Log-Rang-Test ließ sich für SPINK1 kein besserer Cut-off Wert ermitteln. Die Marker CK14, CK17, UPK2 und TMPRSS2 erwiesen sich als ungeeignet für unsere Fragestellung.

Dies war die erste Studie, die disseminierte Tumorzellen im Knochenmark von Harnblasenkarzinompatienten mittels quantitativer real-time PCR und den Markern CK20

und SPINK1 nachwies. Das Verfahren der quantitativen real-time PCR anstelle der qualitativen RT-PCR machte methodisch den größten Unterschied zu der Studie von Retz und Roterling aus. Im Gegensatz zu Studien mit RT-PCR war die Sensitivität unseres Nachweisverfahrens deutlich höher und die Spezifität im gleichen Zug niedriger. Trotz der Problematik die das neuere Verfahren mit sich bringt, liefert diese Methode insgesamt mehr Informationen und ermöglicht über die Untersuchung verschiedener Cut-off Werte eine genaue Einschätzung ab wann ein Signal relevant ist.

Insgesamt war unser Patientenkollektiv mit 117 Patienten recht klein. Die mediane Follow-up Zeit ist mit knapp 18 Monaten zudem sehr kurz, sodass wir im Vergleich zu anderen Studien deutlich weniger Ereignisse (Rezidiv- und Todesfälle) zu verzeichnen hatten. Die kleinen Fallzahlen schränken vor allem die Aussagekraft der hochsignifikanten Ergebnisse zum Marker SPINK1 ein.

Die Marker CK20 und SPINK1 müssen in weiteren Studien mit größeren Patientenkollektiven getestet werden. Bei CK20 stellt sich vor allem die Frage ob in einem größeren Patientenkollektiv ein Cut-off Wert ermittelt werden kann, mit dem sich ein signifikanter Unterschied zwischen CK20-positiven und CK20-negativen Patienten erzielen lässt. Für SPINK1 gilt es die gewonnenen Ergebnisse in einem größeren Patientenkollektiv zu reproduzieren. Die in dieser Arbeit präsentierten Ergebnisse sind eine Zwischenevaluation, die Studie wird fortgeführt und weitere Ergebnisse werden folgen. Aus aktueller Sicht sind CK20 und SPINK1 vielversprechende Marker, die das Potential haben zukünftig in klinischen Routinetests Anwendung zu finden.



## 9. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen ganz herzlich bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Ich danke Herrn Prof. Dr. med. Jürgen Gschwend, Chefarzt und Direktor der urologischen Klinik und Poliklinik des Klinikums rechts der Isar der technischen Universität München, an dessen Institut ich diese Arbeit durchführen durfte.

Ich danke Frau Prof. Dr. med. Margitta Retz, leitende Oberärztin im Bereich Urologische Onkologie und meine Doktormutter, für das interessante Thema und für ihre stetige Unterstützung auch über die Doktorarbeit hinaus. Ich danke ihr besonders für ihre Unterstützung bei meinem Stipendium über den Deutschen Akademischen Austauschdienst.

Ein besonderer Dank gilt Herrn Dr. rer. nat. Roman Nawroth, Leiter des urologischen Forschungslabores, für seine kontinuierliche und intensive Betreuung und Unterstützung in allen wissenschaftlichen Belangen über die gesamte Zeit meiner Arbeit. Er hat mich bei allen Problemen und unerwarteten Wendungen, die sich während meiner Arbeit ergeben haben, engagiert und kompetent beraten und maßgeblich beigetragen, dass die Arbeit einen guten Abschluss gefunden hat.

Ich danke Herrn Dr. med. Matthias Heck für seine Unterstützung, er half mir die komplexen Abläufe der qPCR zu verstehen. Insbesondere danke ich ihm für seine ausführliche und zeitintensive Unterstützung bei der Berechnung und statistischen Auswertung der gesamten Ergebnisse meiner Arbeit.

Ein weiterer Dank geht an Frau Monika Moissel für ihre praktische Anleitung und ihre Hilfsbereitschaft während meiner experimentellen Arbeiten im Labor. Ich bedanke mich auch bei meinen Mitdoktoranden Christoph Oehler, Jan Henrick Große-Wiesmann, Saskia Semmlack und Kathrin Rathgeber, die an ähnlichen Themen arbeiteten. Ich durfte immer auf ihre Hilfe zählen und auf einige ihrer Versuche aufbauen.

Ich danke allen Mitarbeitern der urologischen Klinik am Klinikum Rechts der Isar (Ärzteschaft, Pflege, OP, Wissenschaftliche Forschung, Forschungslabor, Sekretariat) sowie dem Institut für medizinische Statistik der Technischen Universität München für die stets kompetente und freundliche Hilfe und für die kollegiale Atmosphäre.

Von ganzem Herzen danke ich meinem Mann Thomas Fiala sowie meinen Eltern Edeltraud Kohlmann-Lier und Karlheinz Lier, die mich während meines Studiums, während meiner Dissertation sowie beruflich und privat immer in jeder Lebenslage unterstützt haben. Ein besonderer Dank gilt ihnen auch für das Korrekturlesen meiner Arbeit.

Ein herzlicher Dank gilt auch meinen anderen Familienmitgliedern und Freunden, welche mich ebenfalls auf meinem Lebens- und Berufsweg beeinflusst, unterstützt und gefördert haben.

Abschließend und das ist mir zugleich ein besonderes Anliegen, möchte ich den vielen ungenannten Patienten danken. Durch ihre vertrauensvolle Einwilligung und Teilnahme an dieser Studie, trotz ihrer zu diesem Zeitpunkt schweren Lebenssituation, haben sie die Forschung für andere Erkrankte und diese und andere Arbeiten ermöglicht. Ihnen gilt unser aller Respekt und Dank!

# 10. Literaturverzeichnis

1. *Krebs in Deutschland 2009/2010*. 9. ed. 2013, Berlin: Robert Koch-Institut, Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V.
2. *Krebs in Deutschland 2007/2008*. 8 ed. 2012, Robert Koch-Institut, Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. : Berlin.
3. McGrath, M., D.S. Michaud, and I. De Vivo, *Hormonal and reproductive factors and the risk of bladder cancer in women*. Am J Epidemiol, 2006. **163**(3): p. 236-44.
4. Tanahashi, N.K., N. Suzawa, and C. Azuma, *Effects of sex hormones on oncogenesis in rat urinary bladder by N-butyl-N-(4-hydroxybutyl)-nitrosamine*. Int J Clin Pharmacol Biopharm, 1977. **15**(3): p. 101-5.
5. Pashos, C.L., M.F. Botteman, B.L. Laskin, and A. Redaelli, *Bladder cancer: epidemiology, diagnosis, and management*. Cancer Pract, 2002. **10**(6): p. 311-22.
6. Freedman, N.D., 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, 2011. **306**(7): p. 737-45.
7. Zheng, W., J.K. McLaughlin, Y.T. Gao, D.T. Silverman, R.N. Gao, and W.J. Blot, *Bladder cancer and occupation in Shanghai, 1980-1984*. Am J Ind Med, 1992. **21**(6): p. 877-85.
8. Gago-Dominguez, M., J.E. Castela, J.M. Yuan, M.C. Yu, and R.K. Ross, *Use of permanent hair dyes and bladder-cancer risk*. Int J Cancer, 2001. **91**(4): p. 575-9.
9. *Schistosomes, liver flukes and Helicobacter pylori*. IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Lyon, 7-14 June 1994. IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum, 1994. **61**: p. 1-241.
10. Castela, J.E., J.M. Yuan, M. Gago-Dominguez, M.C. Yu, and R.K. Ross, *Non-steroidal anti-inflammatory drugs and bladder cancer prevention*. Br J Cancer, 2000. **82**(7): p. 1364-9.
11. Travis, L.B., R.E. Curtis, B. Glimelius, E.J. Holowaty, F.E. Van Leeuwen, C.F. Lynch, A. Hagenbeek, M. Stovall, P.M. Banks, J. Adami, M. Gospodarowicz, S. Wacholder, P. Inskip, M. Tucker, and D. Boice, *Bladder and kidney cancer following cyclophosphamide therapy for non-Hodgkin's lymphoma*. J Natl Cancer Inst, 1995. **87**(7): p. 524-30.
12. Zelefsky, M.J., D.M. Housman, X. Pei, Z. Alicikus, J.M. Magsanoc, L.T. Dauer, J. St Germain, Y. Yamada, M. Kollmeier, B. Cox, and Z. Zhang, *Incidence of secondary cancer development after high-dose intensity-modulated radiotherapy and image-guided brachytherapy for the treatment of localized prostate cancer*. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 2012. **83**(3): p. 953-9.
13. Kantor, A.F., P. Hartge, R.N. Hoover, A.S. Narayana, J.W. Sullivan, and J.F. Fraumeni, Jr., *Urinary tract infection and risk of bladder cancer*. Am J Epidemiol, 1984. **119**(4): p. 510-5.
14. Locke, J.R., D.E. Hill, and Y. Walzer, *Incidence of squamous cell carcinoma in patients with long-term catheter drainage*. J Urol, 1985. **133**(6): p. 1034-5.
15. Metts, M.C., J.C. Metts, S.J. Milioto, and C.R. Thomas, Jr., *Bladder cancer: a review of diagnosis and management*. J Natl Med Assoc, 2000. **92**(6): p. 285-94.
16. Witjes, J.A., E. Compérat, N.C. Cowan, M.D. Santis, G. Gakis, T. Lebrét, M.J. Ribal, A. Sherif, and A.G.v.d. Heijden, *Guidelines on Muscle-invasive and Metastatic Bladder Cancer 2014*, European Association of Urology

17. Rosenberg, J.E., P.R. Carroll, and E.J. Small, *Update on chemotherapy for advanced bladder cancer*. J Urol, 2005. **174**(1): p. 14-20.
18. Stein, J.P., 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, 2001. **19**(3): p. 666-75.
19. Gschwend, J.E., P. Dahm, and W.R. Fair, *Disease specific survival as endpoint of outcome for bladder cancer patients following radical cystectomy*. Eur Urol, 2002. **41**(4): p. 440-8.
20. Prout, G.R., Jr., P.P. Griffin, and W.U. Shipley, *Bladder carcinoma as a systemic disease*. Cancer, 1979. **43**(6): p. 2532-9.
21. Stenzl, A., J.A. Witjes, E. Comp  rat, N.C. Cowan, M. De Santis, M. Kuczyk, T. Lebreit, M.J. Ribal, and A. Sherif, *Guidelines on Bladder Cancer Muscle-invasive and Metastatic*. 2012: European Association of Urology.
22. Babjuk, M., W. Oosterlinck, R. Sylvester, E. Kaasinen, A. Bohle, J. Palou-Redorta, and M. Roupret, *EAU Guidelines on Non-Muscle-Invasive Urothelial Carcinoma of the Bladder, the 2011 Update*. Actas Urol Esp, 2012. **36**(7): p. 389-402.
23. Carmack, A.J. and M.S. Soloway, *The diagnosis and staging of bladder cancer: from RBCs to TURs*. Urology, 2006. **67**(3 Suppl 1): p. 3-8; discussion 8-10.
24. Dorfman, R.E., M.B. Alpern, B.H. Gross, and M.A. Sandler, *Upper abdominal lymph nodes: criteria for normal size determined with CT*. Radiology, 1991. **180**(2): p. 319-22.
25. Kirkali, Z., T. Chan, M. Manoharan, F. Algaba, C. Busch, L. Cheng, L. Kiemeny, M. Kriegmair, R. Montironi, W.M. Murphy, I.A. Sesterhenn, M. Tachibana, and J. Weider, *Bladder cancer: epidemiology, staging and grading, and diagnosis*. Urology, 2005. **66**(6 Suppl 1): p. 4-34.
26. Wright, J.L., D.W. Lin, and M.P. Porter, *The association between extent of lymphadenectomy and survival among patients with lymph node metastases undergoing radical cystectomy*. Cancer, 2008. **112**(11): p. 2401-8.
27. Koppie, T.M., A.J. Vickers, K. Vora, G. Dalbagni, and B.H. Bochner, *Standardization of pelvic lymphadenectomy performed at radical cystectomy: can we establish a minimum number of lymph nodes that should be removed?* Cancer, 2006. **107**(10): p. 2368-74.
28. Raza, S.J., T. Wilson, J.O. Peabody, P. Wiklund, D.S. Scherr, A. Al-Daghmin, S. Dibaj, M.S. Khan, P. Dasgupta, A. Mottrie, M. Menon, B. Yuh, L. Richstone, M. Saar, M. Stoeckle, A. Hosseini, J. Kaouk, J.L. Mohler, K.H. Rha, G. Wilding, and K.A. Guru, *Long-term Oncologic Outcomes Following Robot-assisted Radical Cystectomy: Results from the International Robotic Cystectomy Consortium*. Eur Urol, 2015.
29. Hautmann, R.E., 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, 2007. **69**(1 Suppl): p. 17-49.
30. Cohen, S.M., A. Goel, J. Phillips, R.D. Ennis, and M.L. Grossbard, *The role of perioperative chemotherapy in the treatment of urothelial cancer*. Oncologist, 2006. **11**(6): p. 630-40.
31. Lehmann, J., M. Retz, C. Wiemers, J. Beck, J. Thuroff, C. Weining, P. Albers, D. Frohneberg, T. Becker, P.J. Funke, P. Walz, S. Langbein, F. Reiher, M. Schiller, K. Miller, S. Roth, T. Kalble, D. Sternberg, S. Wellek, and M. Stockle, *Adjuvant cisplatin plus methotrexate versus methotrexate, vinblastine, epirubicin, and cisplatin in locally advanced bladder cancer: results of a randomized, multicenter, phase III trial (AUO-AB 05/95)*. J Clin Oncol, 2005. **23**(22): p. 4963-74.
32. Retz, M., P. de Geeter, P.J. Goebell, U. Matz, W. de Schultz, and A. Hegele, *Vinflunine in routine clinical practice for the treatment of advanced or*

- metastatic urothelial cell carcinoma - data from a prospective, multicenter experience.* BMC Cancer, 2015. **15**: p. 455.
33. Sternberg, C.N. and N.J. Vogelzang, *Gemcitabine, paclitaxel, pemetrexed and other newer agents in urothelial and kidney cancers.* Crit Rev Oncol Hematol, 2003. **46 Suppl**: p. S105-15.
  34. Madersbacher, S., 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, 2003. **21**(4): p. 690-6.
  35. Horn, T., S.C. Schmid, A.K. Seitz, J. Grab, P. Wolf, B. Haller, M. Retz, T. Maurer, M. Autenrieth, H.R. Kubler, and J.E. Gschwend, *Clinical prognosticators of survival in patients with urothelial carcinoma of the bladder and lymph node metastases after cystectomy with curative intent.* World J Urol, 2015. **33**(6): p. 813-9.
  36. Hautmann, R.E., R.C. de Petriconi, C. Pfeiffer, and B.G. Volkmer, *Radical cystectomy for urothelial carcinoma of the bladder without neoadjuvant or adjuvant therapy: long-term results in 1100 patients.* Eur Urol, 2012. **61**(5): p. 1039-47.
  37. Retz, M., 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, 2011. **60**(2): p. 231-8.
  38. Riethdorf, S., H. Wikman, and K. Pantel, *Review: Biological relevance of disseminated tumor cells in cancer patients.* Int J Cancer, 2008. **123**(9): p. 1991-2006.
  39. D'Souza, A.M., K.S. Pohar, T. Arif, S. Geyer, and D.L. Zynger, *Retrospective analysis of survival in muscle-invasive bladder cancer: impact of pT classification, node status, lymphovascular invasion, and neoadjuvant chemotherapy.* Virchows Arch, 2012.
  40. DeGraff, D.J. 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, 2011. **60**(2): p. 239-40.
  41. Balic, M., A. Williams, N. Dandachi, and R.J. Cote, *Micrometastasis: detection methods and clinical importance.* Cancer Biomark, 2010. **9**(1-6): p. 397-419.
  42. Hermanek, P., *Disseminated tumor cells versus micrometastasis: definitions and problems.* Anticancer Res, 1999. **19**(4A): p. 2771-4.
  43. Luzzi, K.J., I.C. MacDonald, E.E. Schmidt, N. Kerkvliet, V.L. Morris, A.F. Chambers, and A.C. Groom, *Multistep nature of metastatic inefficiency: dormancy of solitary cells after successful extravasation and limited survival of early micrometastases.* Am J Pathol, 1998. **153**(3): p. 865-73.
  44. Kratschmar, A., *Nachweis Dissiminerter Tumorzellen in Zentral-Venösem Blut bei Patienten mit Operablen Gastro-Intestinalen Karzinomen mittels Echtzeit Polymerase-Kettenreaktion von Cytokeratin 20 Transkripten.* 2007, Ludwig-Maximilians-Universität München.
  45. Klein, C.A., *Parallel progression of primary tumours and metastases.* Nat Rev Cancer, 2009. **9**(4): p. 302-12.
  46. Ribal, M.J., 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, 2006. **26**(1A): p. 411-9.
  47. Retz, M., 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, 2001. **39**(5): p. 507-15; discussion 516-7.

48. Braun, S., F.D. Vogl, B. Naume, W. Janni, M.P. Osborne, R.C. Coombes, G. Schlimok, I.J. Diel, B. Gerber, G. Gebauer, J.Y. Pierga, C. Marth, D. Oruzio, G. Wiedswang, E.F. Solomayer, G. Kundt, B. Strobl, T. Fehm, G.Y. Wong, J. Bliss, A. Vincent-Salomon, and K. Pantel, *A pooled analysis of bone marrow micrometastasis in breast cancer*. *N Engl J Med*, 2005. **353**(8): p. 793-802.
49. Pantel, K., C. Alix-Panabieres, and S. Riethdorf, *Cancer micrometastases*. *Nat Rev Clin Oncol*, 2009. **6**(6): p. 339-51.
50. Nawroth, R., D. Weckermann, and M. Retz, *[Prostate and bladder cancer: detection of disseminated tumor cells in bone marrow]*. *Urologe A*, 2014. **53**(4): p. 514-8.
51. Pantel, K. and R.H. Brakenhoff, *Dissecting the metastatic cascade*. *Nat Rev Cancer*, 2004. **4**(6): p. 448-56.
52. Alix-Panabieres, C., S. Riethdorf, and K. Pantel, *Circulating tumor cells and bone marrow micrometastasis*. *Clin Cancer Res*, 2008. **14**(16): p. 5013-21.
53. Ghossein, R.A. and S. Bhattacharya, *Molecular detection and characterisation of circulating tumour cells and micrometastases in solid tumours*. *Eur J Cancer*, 2000. **36**(13 Spec No): p. 1681-94.
54. Gerges, N., J. Rak, and N. Jabado, *New technologies for the detection of circulating tumour cells*. *Br Med Bull*, 2010. **94**: p. 49-64.
55. Huggett, J., K. Dheda, S. Bustin, and A. Zumla, *Real-time RT-PCR normalisation; strategies and considerations*. *Genes Immun*, 2005. **6**(4): p. 279-84.
56. Soeth, E., I. Vogel, C. Roder, H. Juhl, J. Marxsen, U. Kruger, D. Henne-Bruns, B. Kremer, and H. Kalthoff, *Comparative analysis of bone marrow and venous blood isolates from gastrointestinal cancer patients for the detection of disseminated tumor cells using reverse transcription PCR*. *Cancer Res*, 1997. **57**(15): p. 3106-10.
57. Nezos, A., N. Pissimisis, P. Lembessis, A. Sourla, P. Dimopoulos, T. Dimopoulos, K. Tzelepis, and M. Koutsilieris, *Detection of circulating tumor cells in bladder cancer patients*. *Cancer Treat Rev*, 2009. **35**(3): p. 272-9.
58. Msaouel, P. and M. Koutsilieris, *Diagnostic value of circulating tumor cell detection in bladder and urothelial cancer: systematic review and meta-analysis*. *BMC Cancer*, 2011. **11**: p. 336.
59. Burchill, S.A., M.F. Bradbury, K. Pittman, J. Southgate, B. Smith, and P. Selby, *Detection of epithelial cancer cells in peripheral blood by reverse transcriptase-polymerase chain reaction*. *Br J Cancer*, 1995. **71**(2): p. 278-81.
60. Moll, R., 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*, 1990. **111**(2): p. 567-80.
61. Moll, R., A. Lowe, J. Laufer, and W.W. Franke, *Cytokeratin 20 in human carcinomas. A new histodiagnostic marker detected by monoclonal antibodies*. *Am J Pathol*, 1992. **140**(2): p. 427-47.
62. Klein, A., R. Zemer, V. Buchumensky, R. Klaper, and I. Nissenkorn, *Expression of cytokeratin 20 in urinary cytology of patients with bladder carcinoma*. *Cancer*, 1998. **82**(2): p. 349-54.
63. Moll, R., R. Zimbelmann, M.D. Goldschmidt, M. Keith, J. Laufer, M. Kasper, P.J. Koch, and W.W. Franke, *The human gene encoding cytokeratin 20 and its expression during fetal development and in gastrointestinal carcinomas*. *Differentiation*, 1993. **53**(2): p. 75-93.
64. Champelovier, P., F. Mongelard, and D. Seigneurin, *CK20 gene expression: technical limits for the detection of circulating tumor cells*. *Anticancer Res*, 1999. **19**(3A): p. 2073-8.
65. Jung, R., K. Petersen, W. Kruger, M. Wolf, C. Wagener, A. Zander, and M. Neumaier, *Detection of micrometastasis by cytokeratin 20 RT-PCR is limited due to stable background transcription in granulocytes*. *Br J Cancer*, 1999. **81**(5): p. 870-3.

66. Soeth, E., U. Grigoleit, B. Moellmann, C. Roder, B. Schniewind, B. Kremer, H. Kalthoff, and I. Vogel, *Detection of tumor cell dissemination in pancreatic ductal carcinoma patients by CK 20 RT-PCR indicates poor survival*. J Cancer Res Clin Oncol, 2005. **131**(10): p. 669-76.
67. Giribaldi, G., S. Procida, D. Ulliers, F. Mannu, R. Volpatto, G. Mandili, L. Fanchini, O. Bertetto, G. Fronza, L. Simula, E. Rimini, G. Cherchi, L. Bonello, M.M. Maule, and F. Turrini, *Specific detection of cytokeratin 20-positive cells in blood of colorectal and breast cancer patients by a high sensitivity real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction method*. J Mol Diagn, 2006. **8**(1): p. 105-12.
68. Fujii, Y., 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, 1999. **90**(7): p. 753-7.
69. Gudemann, C.J., 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, 2000. **164**(2): p. 532-6.
70. Guzzo, T.J., B.K. McNeil, T.J. Bivalacqua, D.J. Elliott, L.J. Sokoll, and M.P. Schoenberg, *The presence of circulating tumor cells does not predict extravesical disease in bladder cancer patients prior to radical cystectomy*. Urol Oncol, 2012. **30**(1): p. 44-8.
71. Watts, K.L., B.T. Ristau, H.T. Yamase, and J.A. Taylor, 3rd, *Prognostic implications of lymph node involvement in bladder cancer: are we understaging using current methods?* BJU Int, 2011. **108**(4): p. 484-92.
72. Gazquez, C., 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.
73. Marin-Aguilera, M., 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, 2012. **79**(1): p. 240 e9-15.
74. Alam, H., L. Sehgal, S.T. Kundu, S.N. Dalal, and M.M. Vaidya, *Novel function of keratins 5 and 14 in proliferation and differentiation of stratified epithelial cells*. Mol Biol Cell, 2011. **22**(21): p. 4068-78.
75. Xue, L.Y., S.M. Zou, S. Zheng, Y.Q. Xie, P. Wen, X.Y. Liu, D.M. Lin, and N. Lu, *[Expression of fascin and CK14 in different histological types of cancer and its differential diagnostic significance]*. Zhonghua Zhong Liu Za Zhi, 2010. **32**(11): p. 838-44.
76. Chu, P.G., M.H. Lyda, and L.M. Weiss, *Cytokeratin 14 expression in epithelial neoplasms: a survey of 435 cases with emphasis on its value in differentiating squamous cell carcinomas from other epithelial tumours*. Histopathology, 2001. **39**(1): p. 9-16.
77. Volkmer, J.P., D. Sahoo, R.K. Chin, P.L. Ho, C. Tang, A.V. Kurtova, S.B. Willingham, S.K. Pazhanisamy, H. Contreras-Trujillo, T.A. Storm, Y. Lotan, A.H. Beck, B.I. Chung, A.A. Alizadeh, G. Godoy, S.P. Lerner, M. van de Rijn, L.D. Shortliffe, I.L. Weissman, and K.S. Chan, *Three differentiation states risk-stratify bladder cancer into distinct subtypes*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2012. **109**(6): p. 2078-83.
78. Troyanovsky, S.M., V.I. Guelstein, T.A. Tchipsheva, V.A. Krutovskikh, and G.A. Bannikov, *Patterns of expression of keratin 17 in human epithelia: dependency on cell position*. J Cell Sci, 1989. **93** ( Pt 3): p. 419-26.
79. Troyanovsky, S.M., R.E. Leube, and W.W. Franke, *Characterization of the human gene encoding cytokeratin 17 and its expression pattern*. Eur J Cell Biol, 1992. **59**(1): p. 127-37.
80. GeneCard. 2014; Available from: <http://www.genecards.org>.

81. Thike, A.A., J. Iqbal, P.Y. Cheok, A.P. Chong, G.M. Tse, B. Tan, P. Tan, N.S. Wong, and P.H. Tan, *Triple negative breast cancer: outcome correlation with immunohistochemical detection of basal markers*. *Am J Surg Pathol*, 2010. **34**(7): p. 956-64.
82. Ide, M., T. Kato, K. Ogata, E. Mochiki, H. Kuwano, and T. Oyama, *Keratin 17 expression correlates with tumor progression and poor prognosis in gastric adenocarcinoma*. *Ann Surg Oncol*, 2012. **19**(11): p. 3506-14.
83. Ikeda, K., G. Tate, T. Suzuki, and T. Mitsuya, *Coordinate expression of cytokeratin 8 and cytokeratin 17 immunohistochemical staining in cervical intraepithelial neoplasia and cervical squamous cell carcinoma: an immunohistochemical analysis and review of the literature*. *Gynecol Oncol*, 2008. **108**(3): p. 598-602.
84. Kim, C.Y., W.Y. Jung, H.J. Lee, H.K. Kim, A. Kim, and B.K. Shin, *Proteomic analysis reveals overexpression of moesin and cytokeratin 17 proteins in colorectal carcinoma*. *Oncol Rep*, 2012. **27**(3): p. 608-20.
85. Yoshida, Y., [Effective biological marker to detect oral squamous cancer cells--expression patterns of CK 10, 17, 19 and SCCA mRNA--]. *Kokubyo Gakkai Zasshi*, 2007. **73**(3)-**74**(1): p. 37-42.
86. Guelstein, V.I., T.A. Tchipsheva, V.D. Ermilova, and S.M. Troyanovsky, *Immunohistochemical localization of cytokeratin 17 in transitional cell carcinomas of the human urinary tract*. *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol*, 1993. **64**(1): p. 1-5.
87. He, X., 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*, 2009. **27**(7): p. 1487-95.
88. Wu, X.R., 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*, 1994. **269**(18): p. 13716-24.
89. Lu, J.J., 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*, 2000. **6**(8): p. 3166-71.
90. Okegawa, T., M. Kinjo, K. Nutahara, and E. Higashihara, *Value of reverse transcription polymerase chain assay in peripheral blood of patients with urothelial cancer*. *J Urol*, 2004. **171**(4): p. 1461-6.
91. Yuasa, T., T. Yoshiki, T. Isono, T. Tanaka, and Y. Okada, *Molecular cloning and expression of uroplakins in transitional cell carcinoma*. *Adv Exp Med Biol*, 2003. **539**(Pt A): p. 33-46.
92. Osman, I., 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*, 2004. **111**(6): p. 934-9.
93. Copp, H.L., J.L. Chin, M. Conaway, and D. Theodorescu, *Prospective evaluation of the prognostic relevance of molecular staging for urothelial carcinoma*. *Cancer*, 2006. **107**(1): p. 60-6.
94. Stenman, U.H., *Role of the tumor-associated trypsin inhibitor SPINK1 in cancer development*. *Asian J Androl*, 2011. **13**(4): p. 628-9.
95. Marchbank, T., A. Mahmood, and R.J. Playford, *Pancreatic secretory trypsin inhibitor causes autocrine-mediated migration and invasion in bladder cancer and phosphorylates the EGF receptor, Akt2 and Akt3, and ERK1 and ERK2*. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2013. **305**(3): p. F382-9.
96. Hotakainen, K., A. Bjartell, A. Sankila, R. Jarvinen, A. Paju, E. Rintala, C. Haglund, and U.H. Stenman, *Differential expression of trypsinogen and tumor-associated trypsin inhibitor (TATI) in bladder cancer*. *Int J Oncol*, 2006. **28**(1): p. 95-101.

97. Patschan, O., S.F. Shariat, D.C. Chade, P.I. Karakiewicz, R. Ashfaq, Y. Lotan, K. Hotakainen, U.H. Stenman, and A. Bjartell, *Association of tumor-associated trypsin inhibitor (TATI) expression with molecular markers, pathologic features and clinical outcomes of urothelial carcinoma of the urinary bladder*. *World J Urol*, 2011.
98. Rink, M., 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.
99. Vaarala, M.H., K. Porvari, A. Kyllonen, O. Lukkarinen, and P. Vihko, *The TMPRSS2 gene encoding transmembrane serine protease is overexpressed in a majority of prostate cancer patients: detection of mutated TMPRSS2 form in a case of aggressive disease*. *Int J Cancer*, 2001. **94**(5): p. 705-10.
100. Vaarala, M.H., K.S. Porvari, S. Kellokumpu, A.P. Kyllonen, and P.T. Vihko, *Expression of transmembrane serine protease TMPRSS2 in mouse and human tissues*. *J Pathol*, 2001. **193**(1): p. 134-40.
101. Mostaghel, E.A., S.T. Page, D.W. Lin, L. Fazli, I.M. Coleman, L.D. True, B. Knudsen, D.L. Hess, C.C. Nelson, A.M. Matsumoto, W.J. Bremner, M.E. Gleave, and P.S. Nelson, *Intraprostatic androgens and androgen-regulated gene expression persist after testosterone suppression: therapeutic implications for castration-resistant prostate cancer*. *Cancer Res*, 2007. **67**(10): p. 5033-41.
102. Bi, X., H. He, Y. Ye, Q. Dai, Z. Han, Y. Liang, and W. Zhong, *Association of TMPRSS2 and KLK11 gene expression levels with clinical progression of human prostate cancer*. *Med Oncol*, 2010. **27**(1): p. 145-51.
103. Bassi, P., G.D. Ferrante, N. Piazza, R. Spinadin, R. Carando, G. Pappagallo, and F. Pagano, *Prognostic factors of outcome after radical cystectomy for bladder cancer: a retrospective study of a homogeneous patient cohort*. *J Urol*, 1999. **161**(5): p. 1494-7.
104. Hong, S.K., C. Kwak, H.G. Jeon, E. Lee, and S.E. Lee, *Do vascular, lymphatic, and perineural invasion have prognostic implications for bladder cancer after radical cystectomy?* *Urology*, 2005. **65**(4): p. 697-702.
105. Boyum, A., *Isolation of leucocytes from human blood. A two-phase system for removal of red cells with methylcellulose as erythrocyte-aggregating agent*. *Scand J Clin Lab Invest Suppl*, 1968. **97**: p. 9-29.
106. Chomczynski, P. and N. Sacchi, *Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction*. *Anal Biochem*, 1987. **162**(1): p. 156-9.
107. Gkialas, I., G. Papadopoulos, L. Iordanidou, G. Stathouros, C. Tzavara, A. Gregorakis, and M. Lykourinas, *Evaluation of urine tumor-associated trypsin inhibitor, CYFRA 21-1, and urinary bladder cancer antigen for detection of high-grade bladder carcinoma*. *Urology*, 2008. **72**(5): p. 1159-63.