

**TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN**

Urologische Klinik und Poliklinik

am Klinikum rechts der Isar

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

**Nachweis von disseminierten Tumorzellen  
anhand der Genexpression von MUC7  
in pelvinen Lymphknoten bei Patienten mit  
Urothelkarzinom der Harnblase  
als neuem diagnostischem Tumormarker**

Jan Henrik Große Wiesmann

2014

# **TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN**

Urologische Klinik und Poliklinik  
am Klinikum rechts der Isar  
(Direktor: Univ.-Prof. Dr. J. E. Gschwend)

## **Nachweis von disseminierten Tumorzellen anhand der Genexpression von MUC7 in pelvinen Lymphknoten bei Patienten mit Urothelkarzinom der Harnblase als neuem diagnostischem Tumormarker**

Jan Henrik Große Wiesmann

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

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

Prüfer der Dissertation: 1. Univ.-Prof. Dr. J. E. Gschwend  
2. apl. Prof. Dr. M. Retz

Die Dissertation wurde am 14.02.2014 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 17.12.2014 angenommen.



Gewidmet meinen Eltern

Angela und Heinrich Große Wiesmann



## Abkürzungsverzeichnis

A.	Arteria
Aqua bidest.	Aqua bidestillata
bp	Basenpaar(e)
°C	Grad Celsius
cDNA	complementary Desoxyribonukleinsäure
CHO	Chinesische Hamsteroarialzellen
CK	Cytokeratin
cm	Centimeter
dest.	destilliert
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
g	Gramm
G	Erdschwerebeschleunigung: $G = 9,81\text{ms}^{-2}$
G1-G3	Grading; histopathologischer Dysplasiegrad
h	Stunde(n)
H $\beta$ A	Humanes Beta-Actin
Histo	Histopathologie
kb	Kilobase
kDa	Kilo-Dalton
l	Liter
LEA	Lymphadenektomiestudie Eingeschränkt vs. Ausgedehnt
LK	Lymphknoten
mA	Milli-Ampere
mg	Milligramm
Mg <sup>2+</sup>	Magnesium
min	Minute(n)
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimolar
M-MLV	Moloney Murine Leukemia Virus
mRNA	Messenger Ribonukleinsäure

MUC	Muzin
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µM	Mikromolar
NEA	Nicht-essenzielle Aminosäure
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
Nr.	Nummer
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Drehzahleinheit für Umdrehungen pro Minute: 1rpm = 1/60sek
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RT	Reverse Transkriptase
sek	Sekunde(n)
Taq	(Bakterium) <i>Thermus aquaticus</i>
TBE	Tris-Borat-Ethylendiamintetraacetat
TU	Technische Universität
U	Unit; Einheit für die Aktivität von Enzymen
UICC	Union Internationale Contre le Cancer
UP	Uroplakin
USA	United States of America
UV	Ultraviolett
V	Volt
z.B.	zum Beispiel

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1	Das Harnblasenkarzinom	1
1.1.1	Epidemiologie	1
1.1.2	Ätiologie	2
1.1.3	Pathogenese	3
1.1.4	Klinik	4
1.1.5	Stadieneinteilung	4
1.1.6	Diagnostik und Therapie	6
1.1.7	Prognose	7
1.2	Metastasierung des Harnblasenkarzinoms	10
1.3	Charakterisierung der Muzine	11
1.3.1	Allgemeiner Aufbau der Muzine	11
1.3.2	Allgemeine Funktion der Muzine	12
1.3.3	Charakterisierung des humanen Muzins 7 (MUC7)	13
1.3.4	Expression der Muzine im Urogenitaltrakt	15
1.3.5	Veränderung der Muzinexpression und der Muzinstruktur bei der Tumorentstehung	15
1.3.6	MUC7 als diagnostischer und prognostischer Tumormarker	17
1.4	Detektionsmethoden zum Nachweis einzelner Tumorzellen in Lymphknoten von Tumorpatienten	18
1.5	Fragestellung	20
<b>2</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>21</b>
2.1	Allgemeine Materialien	21
2.2	Zellkulturen	22
2.2.1	Reagenzien	22
2.2.2	Materialien und Laborgeräte	22
2.2.3	Permanente Zelllinien	23
2.2.4	Kultivierung permanenter Zelllinien	23
2.2.5	Erstellung neuer Zellpassagen und Überführung von Zellen aus der Zellkultur in RNazol (Trizol-Reagent)	23



2.3	Gewebeproben	25
2.3.1	Auswahl des Patientenkollektivs	25
2.3.1.1	Studienziele der LEA-Studie und wissenschaftliches Begleitprogramm	25
2.3.2	Gewinnung von Gewebeproben	26
2.3.2.1	Reagenzien	28
2.3.2.2	Materialien	28
2.3.3	Lymphknotengewebe	29
2.3.4	Urothelgewebe und Tumorgewebe der Harnblase, Binde- und Fettgewebe	30
2.3.5	Lagerung der Proben	30
2.3.6	Vorbereitung der Lymphknotenproben für die spätere RNA-Extraktion	30
2.3.6.1	Reagenzien	30
2.3.6.2	Materialien	30
2.3.7	Mechanische Zerkleinerung der Lymphknoten und Überführung in RNazol (Trizol-Reagent)	31
2.3.8	Peripher venöse Blutproben von gesunden Probanden	32
2.4	RNA-Extraktion	33
2.4.1	Reagenzien	33
2.4.2	Materialien und Laborgeräte	33
2.4.3	RNA-Extraktion aus Zellkulturen und Gewebeproben	34
2.5	Bestimmung der RNA-Konzentration	35
2.5.1	Reagenzien	35
2.5.2	Materialien und Laborgeräte	35
2.5.3	Bestimmung der RNA-Konzentration	35
2.6	Reverse Transkriptase-Reaktion	36
2.6.1	Prinzip der Reversen Transkriptase-Reaktion	36
2.6.2	Reagenzien	37
2.6.3	Materialien und Laborgeräte	37
2.6.4	Durchführung der Reversen Transkriptase-Reaktion	37

2.6.5	Beta-Actin PCR als Kontrolle für die Reverse Transkriptase-Reaktion	38
2.7	MUC7 nested-PCR	39
2.7.1	Prinzip der Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	39
2.7.2	Prinzip der Nested-PCR	40
2.7.3	Reagenzien	41
2.7.4	Materialien und Laborgeräte	41
2.7.5	Durchführung der MUC7 nested-PCR	41
2.7.6	Kontrollen für die PCR-Analysen	43
2.7.6.1	Positivkontrolle	43
2.7.6.2	Negativkontrolle	43
2.7.7	Sequenzierung der PCR-Produkte	43
2.8	Sensitivität der MUC7 RT-PCR	44
2.8.1	Zellverdünnungsreihe mit der Zelllinie T24	44
2.8.2	cDNA-Verdünnungsreihe mit RNA aus der Zelllinie T24	44
2.9	Darstellung der PCR-Produkte	44
2.9.1	Prinzip der Gelelektrophorese	44
2.9.2	Reagenzien	45
2.9.3	Materialien und Laborgeräte	45
2.9.4	Durchführung der Gelelektrophorese	45
2.10	Auswertung der PCR-Ergebnisse	46
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	48
3.1	Sensitivität der MUC7 RT-PCR Methode	48
3.2	Sequenzierung der PCR-Produkte	49
3.3	Kontrollen	50
3.3.1	Überprüfung der Reversen Transkriptase-Reaktion	50
3.3.2	Positivkontrollen der MUC7 nested-PCR	51
3.3.3	Negativkontrollen der MUC7 nested-PCR	51
3.4	MUC7 Genexpression in Zelllinien und peripher venösen Blutproben gesunder Probanden	51
3.4.1	Genexpression von MUC7 in Zelllinien	51

3.4.2	Genexpression von MUC7 in peripher venösen Blutproben gesunder Probanden	52
3.5	Ausschluss von Proben	52
3.6	MUC7 Genexpression in Lymphknotengewebe	53
3.6.1	Charakteristika des Patientenkollektivs	54
3.6.2	Histopathologische Auswertung der Lymphknotenproben	57
3.6.3	Ergebnisse der spezifischen MUC7 nested-PCR der histopathologisch tumorfreien Lymphknoten	58
3.6.4	Vergleich der pT-Klassifikation des Primärtumors mit dem Anteil der histopathologisch tumorfreien Lymphknoten mit positiver MUC7 Genexpression	66
3.6.5	Vergleich der pT-Klassifikation des Primärtumors mit der MUC7 Genexpression aller Lymphknotenproben	72
3.6.6	Ergebnisse der spezifischen MUC7 RT-PCR der histopathologisch positiven Lymphknoten	74
3.7	MUC7 Genexpression in Lymphknoten-Feldern	76
3.8	Verteilung der histopathologisch positiven Lymphknoten	82
3.9	MUC7 Genexpression der histopathologisch tumorfreien Lymphknoten in den Differenzierungsgraden G1-G3	84
3.10	Zusammenfassung der Ergebnisse	85
<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	<b>87</b>
4.1	Sensitivität und Spezifität der Nachweismethode	88
4.2	Genexpression von MUC7 in pelvinen Lymphknoten von Patienten mit Urothelkarzinom der Harnblase	89
4.2.1	MUC7 Genexpression der histopathologisch tumorfreien pelvinen Lymphknoten (pN0)	90
4.2.2	MUC7 Genexpression der histopathologisch als Metastase klassifizierten pelvinen Lymphknoten (pN1, pN2)	93

4.3	Bedeutung der Verteilung der Lymphknotenmikrometastasen	95
4.4	Prognostische Bedeutung der Genexpression von MUC7 in pelvinen Lymphknoten von Patienten mit Urothelkarzinom der Harnblase	97
4.5	Limitierende Faktoren	98
4.5.1	Effekte und methodische Problematik der Materialgewinnung sowie der Materialaufarbeitung	98
4.5.2	Methodische Problematik der RT-PCR Methode	100
4.5.3	Methodische Problematik der Auswertung	101
4.6	Schlussfolgerung und Ausblick	103
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>104</b>
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>107</b>
<b>7</b>	<b>Abbildungsverzeichnis</b>	<b>121</b>
<b>8</b>	<b>Danksagung</b>	<b>122</b>
<b>9</b>	<b>Lebenslauf</b>	<b>124</b>



# 1 Einleitung

## 1.1 Das Harnblasenkarzinom

### 1.1.1 Epidemiologie

Ungefähr 3% aller bösartigen Tumore des Menschen entfallen auf das Harnblasenkarzinom. Im Jahr 2008 lag die weltweite Inzidenz bei ca. 380000 Neuerkrankungen (Globocan, 2010). Bei Frauen ist es der häufigste maligne Tumor des Urogenitalsystems, bei Männern nach dem Prostatakarzinom der zweithäufigste. In Deutschland steht diese Tumorerkrankung an vierter Stelle aller malignen Tumorerkrankungen der männlichen Bevölkerung und an siebter Stelle aller malignen Tumorerkrankungen der weiblichen Bevölkerung (Husmann, 2010). Das mittlere Erkrankungsalter liegt bei 72 Jahren für Männer und bei 74 Jahren für Frauen. Insgesamt erkrankten im Jahr 2006 deutschlandweit 27453 Menschen an einem Harnblasentumor, wobei Männer mit einer Fallzahl von 19360 mehr als doppelt so häufig betroffen waren wie Frauen. Die Erkrankungsrate bei Männern ist seit Mitte der 1990er Jahre rückläufig, während die Erkrankungsrate bei Frauen eher stagniert. Im Jahr 2006 verstarben in Deutschland 3549 Männer und 1893 Frauen an einem Harnblasenkarzinom. Bei einer Prävalenz von 105000 Harnblasenkarzinompatienten im Jahr 2006 war dies ein Anteil von ca. 5% aller Erkrankten. Die Mortalität lag bei ca. 7 Todesfällen je 100000 Einwohner deutschlandweit, der weltweite Durchschnitt liegt bei ca. 4 Todesfällen je 100000 Einwohner (Husmann, 2010). Es gibt sowohl in Deutschland als auch weltweit deutliche regionale Unterschiede bezogen auf Mortalität und Inzidenz. Auch die Ethnienzugehörigkeit scheint ein wichtiger Faktor zu sein. Menschen mit europäischer Abstammung erkranken beispielsweise mit einer Inzidenz von 21 pro 100000 Einwohnern doppelt so häufig an einem Harnblasenkarzinom wie Menschen mit schwarzer Hautfarbe (Morrison et al., 1976). Letztendlich sind auch die gesundheitsökonomischen Faktoren dieser Erkrankung von großer Bedeutung. Die Behandlungskosten für das Harnblasenkarzinom sind höher als für jede andere Krebserkrankung, da sowohl die Diagnostik als auch die Nachsorge aufwändig und teuer sind (Botteman et al., 2003, Sievert et al., 2009).

### 1.1.2 Ätiologie

Ätiologische Bedeutsamkeit beim Harnblasenkarzinom hat besonders die Exposition gegenüber verschiedenen chemischen Substanzen. Hauptrisikofaktor ist dabei der Nikotinabusus (Golka et al., 2006). Etwa die Hälfte der heutigen Blasenkarzinome wird durch das Rauchen verursacht (Harris et al., 1990, Nieder et al., 2008). Eine wichtige Rolle spielen dabei Substanzen wie die aromatischen Amine, beispielsweise das beim Rauchen inhalierte 2-Naphtylamin. Die Exposition gegenüber industriell genutzten biogenen Aminen (wie  $\beta$ -Naphtylamin oder Benzidin), wie sie bei Berufsgruppen vorkommt, die mit der Herstellung von Farben, Gummi und Textilien beschäftigt sind, ist ebenfalls ein bestätigter Risikofaktor (Case et al., 1954, Claude et al., 1988, Yamaguchi et al., 1991). Ein möglicher Zusammenhang zwischen der Exposition mit Anilin und der Entstehung von Harnblasenkarzinomen wurde erstmals 1895 beschrieben (Rehn, 1895). Auch wenn viele der genannten Chemikalien in den Industrienationen mittlerweile verboten wurden oder nur noch unter Einhaltung geeigneter Schutzmaßnahmen verwendet werden dürfen, treten bedingt durch die lange Latenzzeit zwischen Exposition mit der Chemikalie und der Tumorentstehung (bis zu 40 Jahre) auch heute noch Harnblasenkarzinome auf, welche die genannten berufsbedingten Ursachen haben. Auch Nitrosamine sind bei der Entstehung von Harnblasenkarzinomen von Bedeutung. Sie stehen im Zusammenhang mit chronischen Harnwegsinfektionen (z.B. Dimethylnitrosamin) (Calmels et al., 1985). Chronische Infektionen mit *Schistosoma haematobium* mit dem Krankheitsbild der Bilharziose können zu Plattenepithelkarzinomen führen (Mustacchi et al., 1958, Schwartz, 1981, Mostafa et al., 1994). Auch Patienten mit einer sogenannten 'Balkannephropathie' (ausgelöst durch einen saprophytisch wachsenden Pilz auf Lagergetreide, welcher karzinogene Mykotoxine und Nephrotoxine bildet) erkranken im Vergleich mit der Normalbevölkerung häufiger an einem Harnblasenkarzinom (Rübber, 2009). Die Einnahme bestimmter Medikamente steht ebenfalls im Zusammenhang mit der Entstehung von Harnblasenkarzinomen. Nachgewiesen wurde dies sowohl für das Zytostatikum Cyclophosphamid als auch für das Polyzythämie-Therapeutikum Chlornaphazin (Schmahl et al., 1982, Baker et al., 1987). Das Analgetikum Phenacetin wurde ebenfalls als Auslöser für Urothelkarzinome identifiziert und deshalb vom deutschen Markt genommen

(Mccredie et al., 1983). Auch eine Strahlentherapie, beispielsweise zur Behandlung eines Zervixkarzinoms bei Frauen, ist mit einem erhöhten Risiko für ein Harnblasenkarzinom verbunden (Arai et al., 1991).

### **1.1.3 Pathogenese**

Bei 95% aller Harnblasenkarzinome handelt es sich histopathologisch um ein Urothelkarzinom. Diese werden in der Literatur auch als Transitionalzellkarzinome bezeichnet. Die maligne Transformation geht hierbei vom Übergangsepithel (=Transitionalzone) aus. 3-6% der Blasenkarzinome entfallen auf Plattenepithelkarzinome, 0,2-2% auf Adenokarzinome. Sehr selten sind kleinzellige Karzinome oder sarkomatoide Karzinome (Rübber, 2009). Der überwiegende Teil der Blasentumore (70-80%) wächst oberflächlich und ist auf die Mukosa oder die Lamina propria beschränkt (Ta, Tis, T1). Bei 20-30% aller Patienten liegt bei Erstdiagnose bereits ein muskelinvasives Stadium vor (T2-T4). Ein papilläres Wachstumsmuster zeigen hauptsächlich die oberflächlich wachsenden Blasentumore. Die muskelinvasiven Tumore weisen dagegen eher ein solitäres Wachstumsmuster auf. Eine Besonderheit ist das Carcinoma in situ (Cis/Tis), welches zwar oberflächlich, aber dafür meist multifokal wächst und zusätzlich einen geringen Differenzierungsgrad aufweist. Generell ist die Rezidivrate bei oberflächlich wachsenden Blasentumoren nach transurethraler Blasentumorresektion (TUR-B) mit 50% als hoch einzustufen (Cookson et al., 1997). Eine weitere Besonderheit sind Tumore mit dem Stadium pT1G3, mit ebenfalls geringem Differenzierungsgrad bei oberflächlichem Wachstum. Hier sind die Progressionsrate und die Tendenz zur Metastasierung hoch (Jocham et al., 2001).



#### **1.1.4 Klinik**

Leitsymptom des Harnblasenkarzinoms ist die schmerzlose Makrohämaturie. Auch eine im Rahmen einer medizinischen Untersuchung festgestellte schmerzlose Mikrohämaturie oder eine Leukozyturie können Hinweise auf einen Blasentumor sein, ebenso wie das Auftreten rezidivierender Harnwegsinfekte oder anhaltende Miktionsbeschwerden wie Dysurie, Pollakisurie oder eine Urge-Symptomatik. Im fortgeschrittenen Krankheitsstadium können neben der für maligne Tumorgeschehen typischen B-Symptomatik weitere Spätsymptome wie Blasenschmerzen, Beinschwellungen durch Lymphödeme oder eine Harnstauungsniere (bedingt durch Tumorinfiltration der Ureterostien) mit Flankenschmerzen und postrenalem Nierenversagen auftreten (Hautmann, 2010). Zum Ausschluss eines Harnblasenkarzinoms sollte grundsätzlich bei jeder schmerzlosen Hämaturie sowie bei anhaltenden Miktionsbeschwerden eine eingehende Diagnostik erfolgen.

#### **1.1.5 Stadieneinteilung**

Die Stadieneinteilung (Staging) des Harnblasenkarzinoms in dieser Arbeit erfolgte nach der Nomenklatur der 'Union International Contre le Cancer' (UICC) von 2002 (Sobin et al., 2002). Dabei ist zu beachten, dass die Stadieneinteilung durch die kontinuierliche Erweiterung und den ständigen Fortschritt von Wissen und Forschung einem permanenten Wandel unterliegt und, wie schon in der Vergangenheit, auch in Zukunft Änderungen unterliegen kann. Der Malignitätsgrad (Grading) wurde anhand der histologischen und zytologischen Differenzierung bestimmt und erfolgte nach der Einteilung der WHO von 2004. Die vorherige Einteilung in die Grade G1-G3 von 1997 wurde durch die Unterscheidung zwischen hochdifferenziertem (Low Grade) und niedrigdifferenziertem (High Grade) Tumorgewebe ersetzt (Eble et al., 2004). Dabei ist zu beachten, dass die neue Definition alle Blasentumore im Stadium 'Carcinoma in situ' (Cis) grundsätzlich als 'High Grade' klassifiziert. Für eine Klassifizierung als 'High Grade'-Tumor ist ein kleines Areal mit hochgradig atypischen Zellen innerhalb des insgesamt entnommenen Gewebes ausreichend. Die einzelnen Tumorstadien sind in Tabelle 1 und Abbildung 1 dargestellt.

<b>T-Klassifikation</b>	<b>Lokalisation</b>
Tx	Primärtumor nicht beurteilbar
T0	kein Anhalt für Primärtumor
Ta	oberflächlich im Urothel, nicht invasiv, papillär
Tis	Carcinoma in situ („flat tumor“)
T1	erreicht das subepitheliale Bindegewebe
T2a	erreicht die innere Muskulatur
T2b	erreicht die äußere Muskulatur
T3a	reicht mikroskopisch bis ins Fettgewebe
T3b	reicht makroskopisch bis ins Fettgewebe
T4a	infiltriert Prostata, Uterus, Vagina
T4b	infiltriert andere Nachbarorgane (Beckenwand)
<b>N-Klassifikation</b>	
Nx	Lymphknotenbefall nicht beurteilbar
N0	keine Lymphknotenmetastasen
N1	solitäre Lymphknoten-Metastasen bis 2cm
N2	solitäre Lymphknoten-Metastasen von 2-5cm, multiple Lymphknoten-Metastasen bis 5cm
N3	Lymphknoten-Metastasen größer als 5cm
<b>M-Klassifikation</b>	
Mx	Einschätzung von Fernmetastasen nicht möglich
M0	keine Fernmetastasen
M1	mit Fernmetastasen
<b>Grading</b>	
Low Grade	Hochdifferenziert
High Grade	Niedrigdifferenziert

Tabelle 1: UICC-Klassifikation des Harnblasenkarzinoms mit Staging (UICC von 2002) und Grading (WHO von 2004)

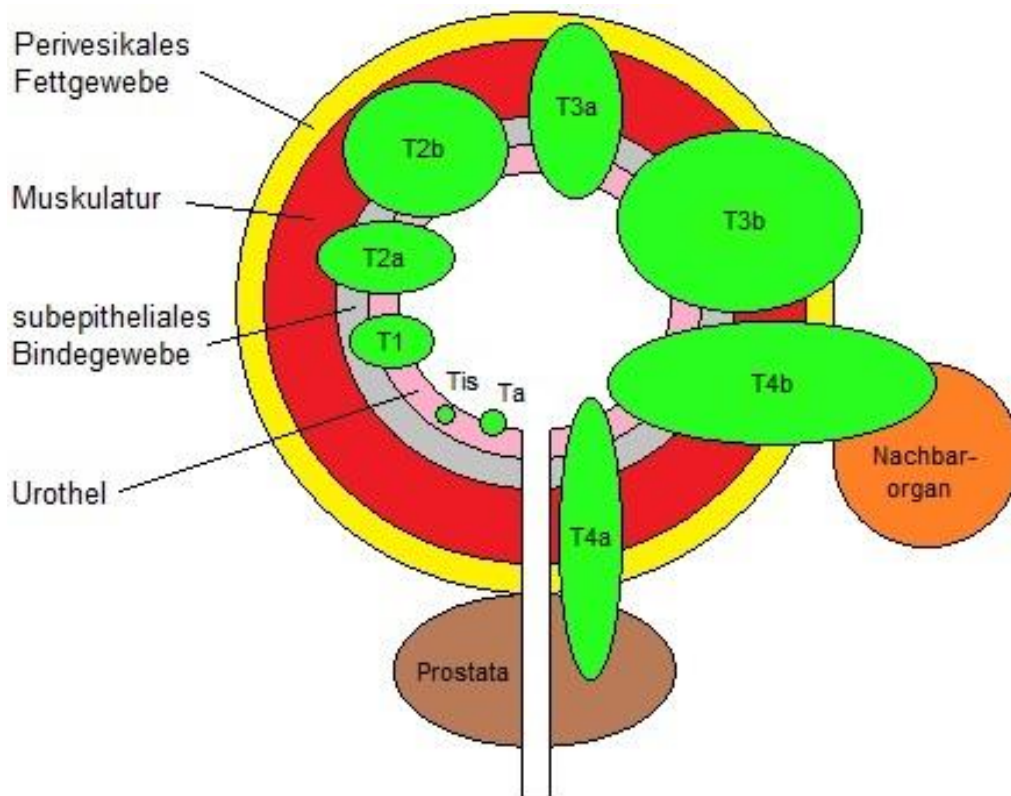


Abbildung 1: Darstellung der Tumorlokalisation gemäß UICC 2002

### 1.1.6 Diagnostik und Therapie

Die Diagnostik des Harnblasenkarzinoms stützt sich im Besonderen auf die Urethrozystoskopie (Retz et al., 2001). Dabei werden exophytisch wachsende Tumore leichter diagnostiziert als Tumore im Schleimhautniveau, wie beispielsweise ein Carcinoma in situ. Seit einigen Jahren kommt deshalb eine Methode zum Einsatz, welche ein Fluoreszenzverfahren nutzt, um die Tumore im Schleimhautniveau signifikant besser erkennbar zu machen (Geavlete et al., 2008, Jocham et al., 2008, Ray et al., 2009). Eine nichtinvasive Methode zur Diagnostik ist die Urinzytologie, welche aber hinsichtlich der Zystoskopie sowohl von der spezifischen als auch der sensitiven Aussagekraft unterlegen ist. Ebenso besteht ein deutlicher Unterschied in Bezug auf die Nachweisquote, je nachdem welche Art von Blasentumor vorliegt (Konety et al., 2001, Feil et al., 2003). Eine Vorsorgeuntersuchung wird gegenwärtig nicht empfohlen. Mit der Diagnostik zum Ausschluss eines Harnblasenkarzinoms wird in den meisten Fällen dann begonnen, wenn die unter Punkt 1.1.4 beschriebenen Symptome auftreten.

Die Standardtherapie bei oberflächlich wachsenden Harnblasentumoren (pTa, pTis, pT1) besteht in der transurethralen Blasentumorresektion (TUR-B). Trotz kompletter Resektion entwickelt der Großteil der Patienten (bis zu 70%) nach wenigen Jahren ein Rezidiv, welches dann durch eine erneute Resektion behandelt werden muss (Herr, 1999). Die Therapie der Wahl bei den lokal fortgeschrittenen und muskelinvasiven Harnblasentumoren ist die radikale Zystektomie zusammen mit einer regionalen Lymphadenektomie. Mehrere Studien konnten den Vorteil einer adjuvanten Polychemotherapie nach radikaler Zystektomie bezüglich der Tumorprogression und des Langzeitüberlebens belegen (Skinner et al., 1991, Stöckle et al., 1995, Freiha et al., 1996), allerdings gibt es noch kein standardisiertes Verfahren bezüglich der Patientenauswahl oder der einzusetzenden Chemotherapeutika (Lehmann et al., 2003). Eine neoadjuvante Therapie vor dem operativen Eingriff der radikalen Zystektomie verbessert laut einer Studie von 2003 die postoperative Prognose (Grossman et al., 2003) und wird mittlerweile für die Behandlung von muskelinvasiven Blasentumoren empfohlen (Herr et al., 2007, De Vere White, 2008).

### **1.1.7 Prognose**

Die wichtigsten Prognosefaktoren für das Überleben von Patienten mit einem Harnblasentumor sind zum einen die Infiltrationstiefe des Tumors (pT-Stadium) und zum anderen das Vorliegen von Metastasen (Cookson et al., 1997, Leissner et al., 2002). Bei muskelinvasiven Harnblasentumoren ohne regionale Lymphknotenmetastasen und ohne Fernmetastasen, welche durch eine radikale Zystektomie behandelt wurden, konnte durch mehrere Studien der Zusammenhang zwischen pT-Stadium und 5-Jahres-Überlebenswahrscheinlichkeit belegt werden. Eine Studie aus dem Jahr 2005 zeigte eine Überlebensrate von 67% bei radikaler Zystektomie nach 5 Jahren bei Patienten mit lokal begrenzten Harnblasentumoren in den Stadien pT1 und pT2 (Nieuwenhuijzen et al., 2005). Eine deutsche Arbeitsgruppe zeigte, dass das progressionsfreie Überleben nach radikaler Zystektomie im Stadium pT2a noch 82,5% betrug. Im Stadium pT2b/pT3a fiel dieser Wert schon auf 61,9%. Im Stadium pT3b waren nur noch 53,1% der Patienten nach 5 Jahren progressionsfrei (Hautmann et al., 2006). Auch frühere Studien bei Harnblasentumorpatienten mit muskelinvasiven Tumoren ohne

Lymphknotenmetastasen zeigten, dass die 5-Jahresüberlebensrate nach radikaler Zystektomie lediglich 30 bis 55 Prozent betrug (Stöckle et al., 1996, Bassi et al., 1999, Stein et al., 2001). Eine japanische Arbeitsgruppe zeigte, wie die progressionsfreie 5-Jahres-Überlebensrate von 67% (Stadium pT2) auf bis zu 38% sank (Stadium pT4) (Takahashi et al., 2004). Wurde ein Patient histopathologisch als pN1 klassifiziert, sank unabhängig vom T-Stadium des Tumors die 5-Jahres-Überlebensrate auf 20-30% (Stein et al., 2001, Lehmann et al., 2002, Takahashi et al., 2004, Hautmann et al., 2006).

Das Vorhandensein von Lymphknotenmetastasen zum Operationszeitpunkt bedeutet für alle Tumorstadien eine erhebliche Prognoseverschlechterung. Trotz radikaler Zystektomie mit begleitender Lymphadenektomie betrug die progressionsfreie 5-Jahres-Überlebensrate in mehreren Untersuchungen nur noch 20% bis 35% (Stein et al., 2001, Madersbacher et al., 2003, Hautmann et al., 2006). Auch für andere Tumorentitäten wie das kolorektale Karzinom konnte ein entsprechender Zusammenhang aufgezeigt werden (Liefers et al., 1998).

Auch die Anzahl der Lymphknotenmetastasen scheint einen entscheidenden Einfluss auf die Prognose zu haben. Liegt die rezidivfreie Überlebensrate nach 10 Jahren bei Patienten mit maximal 4 Lymphknotenmetastasen nach den Ergebnissen der Arbeitsgruppe um Stein noch bei 41%, sinkt sie bei fünf oder mehr Lymphknotenmetastasen im gleichen Zeitraum auf 24% ab (Stein et al., 2001). Es konnte gezeigt werden, dass die Lymphadenektomie einen entscheidenden Einfluss auf die Prognose der Erkrankung hat. Eine Untersuchung aus dem Jahr 2002 zeigte, dass eine Entnahme von mindestens 16 Lymphknoten während der Zystektomieoperation die 5-Jahres-Überlebensrate entscheidend verbessern konnte, sowohl bei Patienten mit tumorfreien Lymphknoten als auch bei Patienten mit Lymphknotenmetastasen (Leissner et al., 2000, Leissner et al., 2002). Auch andere Studien konnten einen Zusammenhang zwischen steigender Anzahl der entfernten Lymphknoten und einer Prognoseverbesserung aufzeigen (Stein et al., 2001, Herr et al., 2002, Herr, 2003). An dieser Stelle ist allerdings zu erwähnen, dass noch nicht abschließend geklärt ist, ob die Lymphadenektomie zu einer Prognoseverbesserung führt, weil auch mehr okkulte Tumorzellen entfernt wurden, oder ob die Ursache in der damit verbundenen häufigeren histopathologischen

Detektion von Mikrometastasen zu suchen ist, wodurch die Patienten vom Tumorstadium her anders klassifiziert und somit einer anderen Therapie zugeführt werden (Suttman et al., 2007). Weiterhin konnte in verschiedenen Studien gezeigt werden, dass sowohl die adjuvante (Skinner et al., 1991, Stöckle et al., 1995, Freiha et al., 1996, Takahashi et al., 2004), als auch die neoadjuvante Chemotherapie (Grossman et al., 2003, Herr et al., 2007, De Vere White, 2008) die Prognose für Patienten mit muskelinvasivem Harnblasenkarzinom verbessern kann.

Bis zu 50% der Patienten mit lokal begrenzter Tumorausbreitung sowie histopathologisch tumorfreien Lymphknoten nach radikaler Zystektomie entwickeln eine systemische Tumorprogression. Ursache hierfür könnten disseminierte Tumorzellen sein, welche zum Operationszeitpunkt bereits zu einer hämatogenen oder lymphogenen Metastasierung geführt haben, aber weder klinisch noch histopathologisch nachweisbar sind (Gusterson, 1992, Pantel et al., 1997, Liefers et al., 1998, Stein et al., 1998, Weitz et al., 1999, Retz et al., 2004). Diese Vermutung sowie der bewiesene Zusammenhang zwischen dem Vorliegen von histopathologisch nachgewiesenen Lymphknotenmetastasen und einer deutlichen Prognoseverschlechterung zeigen, dass eine frühzeitige, erfolgreiche Detektion von (Mikro-)Metastasen in Lymphknoten auf die individuelle Behandlung des Patienten großen Einfluss haben kann. Durch die Entwicklung molekularbiologischer Techniken zur erfolgreichen Identifizierung von Hochrisikopatienten könnte diese Patientengruppe von einer frühzeitigen adjuvanten Polychemotherapie profitieren (Lehmann et al., 2002). In einer Untersuchung von 2003 konnte gezeigt werden, dass bei Patienten mit histopathologisch nachgewiesenen Lymphknotenmetastasen durch den Einsatz einer Polychemotherapie das Risiko, tumorbedingt zu versterben, halbiert werden konnte (Frank et al., 2003).

Zusammengefasst ist festzustellen, dass der Therapieerfolg des Harnblasenkarzinoms in besonderem Maße von der erfolgreichen Detektion von Mikrometastasen beziehungsweise okkulten Tumorzellen in Lymphknoten abhängig zu sein scheint, da ein korrektes Tumorstaging eine Grundvoraussetzung für eine adäquate Therapie darstellt (Dhar et al., 2006). Der heutige diagnostische Standard bezüglich der Detektion von Mikrometastasen in Lymphknoten ist in dieser Hinsicht

noch unzureichend. Präoperativ können bildgebende Verfahren wie die Computertomographie, die Magnetresonanztomographie oder die Positronen-Emissions-Tomographie eingesetzt werden. Trotz modernster Bildgebungstechnik gelingt der Nachweis von Lymphknotenmetastasen dabei nur in sehr begrenztem Umfang (Voges et al., 1989, Paik et al., 2000, Schoder et al., 2004). Postoperativ werden entnommene Lymphknoten der histopathologischen Schnittuntersuchung zugeführt. Routinemäßig werden hierbei aber nur einzelne histologische Schnitte untersucht, wodurch einzelne Tumorzellen oder Mikrometastasen häufig unentdeckt bleiben (Weitz et al., 1999).

Die Untersuchung verschiedener epithelialer Marker hinsichtlich ihrer Eignung für den molekularbiologischen Nachweis okkulten Tumorzellen in pelvinen Lymphknoten von Blasenkarzinompatienten sowie die Etablierung einer geeigneten Nachweismethodik waren die Aufgaben unserer Arbeitsgruppe. In der vorliegenden Arbeit wurde als potentieller epithelialer Marker das humane Mucin 7 (MUC7) untersucht.

## **1.2 Metastasierung des Harnblasenkarzinoms**

Unter dem Begriff Metastasierung versteht man eine hypothetische Absiedlung eines Tumors in entferntem Gewebe. Der Begriff wird daneben auch für die Streuung eines Infektionsherdes verwendet. Tumorzellen, welche sich vom Primärtumor lösen, können sich über den hämatogenen oder den lymphogenen Weg im Körper ausbreiten. Einen ersten Erklärungsansatz für die Metastasierung findet man bereits in einer Veröffentlichung aus dem Jahre 1889, welche eine Interaktion zwischen einzelnen, freien Tumorzellen und dem Mikrozellmilieu des Sekundärorgans annimmt (Paget, 1889). Später wurden dann physikalische Eigenschaften, wie die Mechanik der anatomischen Gegebenheiten des Gefäßsystems als zugrunde liegende Ursachen für die Art der Metastasierung postuliert (Ewing, 1928). Aktuelle Forschungen gehen davon aus, dass Metastasierung durch ein Zusammenspiel vieler verschiedener Faktoren bestimmt wird. Sehr wahrscheinlich ist das Mikrozellmilieu in den Sekundärorganen ebenso bedeutsam wie die anatomische Beschaffenheit des Organismus (Fidler, 2003). Des Weiteren scheinen einzelne biochemische Abläufe ebenfalls eine wichtige

Rolle zu spielen. Beispielhaft dafür kann eine Studie aus dem Jahr 2000 genannt werden. Die Stimulation von Blasen-tumor-zellen mit dem Chemokinliganden CXCL8 führte hier zu einer verstärkten Tumor-zellinvasion. Gleichzeitig wurde die Neoangiogenese im Tumorgewebe stimuliert. Im Mausmodell konnten CXCL8-aktivierte Blasen-tumor-zellen eine spontane lymphogene Metastasierung hervorrufen (Inoue et al., 2000). Passend dazu zeigte eine weitere Studie eine Korrelation zwischen dem Anstieg der Konzentration von CXCL8 im Urin und dem Anstieg des Tumorstadiums (Sheryka et al., 2003).

### **1.3 Charakterisierung der Muzine**

#### **1.3.1 Allgemeiner Aufbau der Muzine**

Muzine (MUC) sind hochmolekulare Glykoproteine, welche an der Oberfläche verschiedener epithelialer Zellen vorkommen. Dazu gehören neben dem Urogenitaltrakt der Gastrointestinal- und Respirationstrakt (Dekker et al., 2002). Bis heute wurden 23 verschiedene Muzine in der Literatur beschrieben. Die internationale Nomenklatur bezeichnet die Muzine mit MUC1, MUC2 (Gum et al., 1989, Gendler et al., 1990, Gum et al., 1990, Gendler et al., 1991, Kraus et al., 2002), MUC3A, MUC3B (Pratt et al., 2000), MUC4, MUC5AC (Guyonnet Duperat et al., 1995, Porchet et al., 1995), MUC5B (Nielsen et al., 1997), MUC6 (Bartman et al., 1998), MUC7 (Bobek et al., 1996), MUC8 (Shankar et al., 1997), MUC9 (Lapensee et al., 1997), MUC10 (Melnick et al., 2001), MUC11 (Williams et al., 1999), MUC12 (Matsuyama et al.), MUC13 (Williams et al., 2001), MUC14 (Kinoshita et al., 2001, Rose et al., 2006), MUC15 (Pallesen et al., 2002, Pallesen et al., 2008), MUC16 (Perez et al., 2008, Goodell et al., 2009), MUC17 (Moniaux et al., 2006), MUC18 (Hampel et al., 1997, Filshie et al., 1998, Wu et al., 2001), MUC19 (Chen et al., 2004, Kerschner et al., 2009), MUC20 (Higuchi et al., 2004) und MUC21 (Itoh et al., 2008). Zwei dieser Muzine, MUC10 und MUC14, konnten bisher nur bei der Maus identifiziert werden (Melnick et al., 2001, Leikauf et al., 2002). Alle Muzine bestehen aus einem von Kohlenhydraten umgebenen Proteinkern. Dieser Proteinkern, welcher auch als Apomuzin bezeichnet wird, ist in der Regel reich an den Aminosäuren Serin, Prolin und Threonin. Das Proteingerüst



der Muzine beinhaltet eine zentrale Domäne, in welcher sich eine variable Anzahl von Aminosäuresequenzen findet. Diese auch als VNTR (Variable Number of Tandem Repeats) bezeichnete Region wird von nichtrepetitiven Aminosäuresequenzen eingerahmt. Die VNTR-Sequenzen sind für die jeweiligen Muzine spezifisch (Toribara et al., 1991, Vinall et al., 1998). Das Molekulargewicht der Muzine liegt zwischen 400 bis 1000 kDa. Der Kohlenhydratanteil macht dabei über 80% des Gewichtes aus. Das Proteingerüst und die Kohlenhydratseitenketten sind durch O-glykosidische Bindungen zwischen Serin- und Threoninresten verbunden. An diesen O-glykosidischen Bindungen sind fünf verschiedene Zucker beteiligt: N-Azetylgalaktosamin, N-Azetylglukosamin, N-Azetylneuraminsäure, Galaktose und Fucose (Bobek et al., 1993). Grundsätzlich kann zwischen membrangebundenen und sezernierten Muzinen unterschieden werden. Eine spezielle Eigenschaft einiger sezernierter Muzine ist die Möglichkeit, eine Gelformation zu bilden. Dies geschieht durch die Ausbildung von intermolekularen Disulfidbrücken in zystinreichen Regionen (Gipson et al., 1997). Die gelbildenden Muzine bedecken dabei die Oberfläche der sezernierenden Epithelzellen. Andere sezernierte Muzine, zu welchen unter anderem auch MUC7 zählt, liegen als lösliche, solartige, kolloidale Teilchen frei vor, beispielsweise im menschlichen Speichel (Nielsen et al., 1997, Bolscher et al., 1999).

### **1.3.2 Allgemeine Funktion der Muzine**

Die wichtigste Aufgabe der Muzine liegt in ihrer protektiven Funktion, welche sie als integraler Bestandteil von Schleimhautoberflächen erfüllen. Dort erschweren sie die Besiedlung sowie das Eindringen pathogener Mikroorganismen in die Schleimhaut. Des Weiteren schützen Muzine vor mechanischen und chemischen Schädigungen (Wu et al., 1994, Hattrup et al., 2008). Muzine wirken außerdem proteolytischen Enzymen entgegen (Shrom et al., 1978). Die von Muzinen bedeckte Oberfläche der Harnblase bildet eine physikalische Barriere zwischen den Urothelzellen und dem Urin. Die Urothelzellen werden dadurch vor starken Änderungen des pH-Wertes sowie der hohen Osmolarität des Urins geschützt. Die Anheftung von Bakterien und Urinkristallen wird erschwert oder verhindert (Parsons et al., 1978, Shrom et al., 1978). In einer Arbeit von 1986 konnte gezeigt werden, dass eben diese antiadhäsive Wirkung der Muzinschicht für den antibakteriellen

Schutzmechanismus der Blasenschleimhaut verantwortlich ist. Nach Entfernung der Muzinschicht zeigte sich eine verstärkte Adhäsion von Bakterien an die Blasenschleimhaut (Ruggieri et al., 1986). Später wurde gezeigt, dass im Besonderen der sulfatierte Zucker der Muzine für den antiadhäsiven Effekt verantwortlich ist (Ruggieri et al., 1992).

### **1.3.3 Charakterisierung des humanen Muzins 7 (MUC7)**

Das humane Muzin 7 (MUC7) wurde erstmals 1993 aus dem menschlichen Speichel isoliert und anschließend die vollständige Struktur und Nukleotidsequenz analysiert und beschrieben (Bobek et al., 1993). MUC7 wird als solartiges, lösliches Muzin von verschiedenen Subpopulationen seröser Drüsen exprimiert. Dazu gehören die Glandulae submandibularis, sublingualis und palatina (Nielsen et al., 1997, Bolscher et al., 1999). Außerdem wurde die Expression von MUC7 bisher in serösen submukösen Drüsen der Bronchien, in Pankreasgewebe, in Zellen des Gallengangskarzinoms sowie in den Zellen der Konjunktiva nachgewiesen (Sharma et al., 1998, Sasaki et al., 1999, Jumblatt et al., 2003). Des Weiteren zeigt die Expression von MUC7 altersbiologische Unterschiede (Sonesson et al., 2008). Wie auch die anderen Muzine erfüllt MUC7 protektive Aufgaben (Bruno et al., 2005). Die elektronenmikroskopische Untersuchung von isolierten MUC7 Glykoproteinen zeigte kurze, flexible, spiralförmige Strukturen mit einer Länge zwischen 30 nm und 120 nm. Es konnte gezeigt werden, dass sich die MUC7 Glykoproteine durch Selbstassoziation zusammenlagern können und neben der hauptsächlich vorkommenden Monomerstruktur auch Dimere oder Tetramere bilden können (Mehrotra et al., 1998). MUC7 gehört mit einem Gewicht von 150 bis 250 kDa zu den kleinsten sekretorischen Muzinen. Der Proteinanteil, das Apomuzin, besteht aus 377 Aminosäuren und hat ein Molekulargewicht von 39 kDa (Bobek et al., 1993). Es können fünf verschiedene Domänen innerhalb des MUC7 Apomuzins unterschieden werden: Eine N-terminale Region mit 144 Aminosäuren, ein Signalpeptid mit 20 Aminosäuren, die Zentralregion (VNTR) mit 138 Aminosäuren bestehend aus sechs nahezu identischen Wiederholungssequenzen mit jeweils 23 Aminosäuren, und eine C-terminale Region mit 75 Aminosäuren (Liu et al., 1999). Schon vor Identifizierung des MUC7 Gens wurden zwei Isoformen des MUC7 Glykoproteins beschrieben (MG2a und MG2b), welche sich bei einer identischen

Aminosäuresequenz durch den Gehalt an N-Azetylneuraminsäure und Fucose im Kohlenhydratanteil unterschieden (Ramasubbu et al., 1991). Das MUC7 Gen liegt auf dem langen Arm des Chromosoms 4, in der Region 4q13.3 (Abbildung 2). Dieses Gen mit einer Größe von 10 kb kodiert für zwei Introns und drei Exons. Die für das sekretorische Protein kodierende Basensequenz liegt auf dem dritten Exon und umfasst ca. 2200 Basen (NCBI Gene ID: 4589, NCBI Reference Sequence: NG\_012348.1) (Bobek et al., 1996).

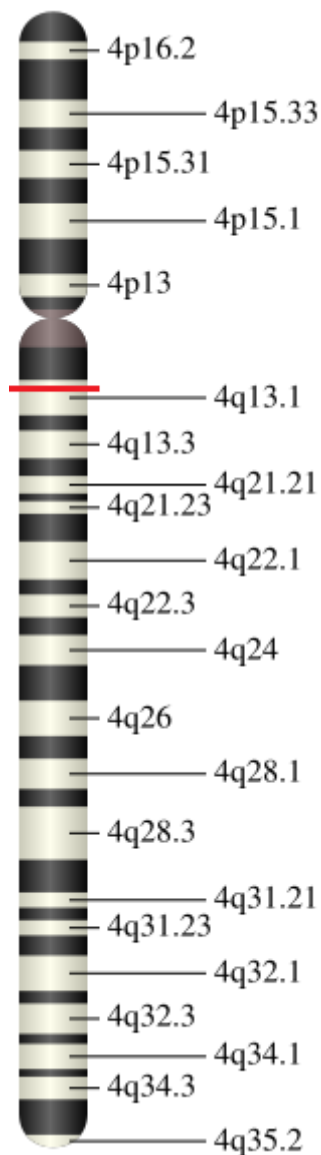


Abbildung 2: Lokalisation des MUC7 Gens auf Chromosom 4 (Markierung)

### **1.3.4 Expression der Muzine im Urogenitaltrakt**

Muzine im Urogenitaltrakt wurden bisher überwiegend im Rahmen immunhistochemischer Studien untersucht. Im Jahr 1998 konnte eine voneinander abweichende Expression von MUC1 und MUC2 in normalem Prostatagewebe, in Prostatakarzinomen und deren Lymphknotenmetastasen nachgewiesen werden (Zhang et al., 1998). Eine Studie aus dem Jahr 2002 zeigte einen signifikanten Zusammenhang zwischen einer steigenden MUC1 Proteinexpression bei gleichzeitig zunehmendem Tumorstadium und der Tumorprogression des Nierenzellkarzinoms (Kraus et al., 2002). Im Jahr 1994 wurde die Expression von MUC1 und MUC2 im normalen Urothelgewebe der Harnblase sowie beim Urothelkarzinom untersucht. MUC1 war im normalen Urothelgewebe nur in der oberen Zellmembran der Superficialzellen nachweisbar. Im Tumorgewebe konnte MUC1 dagegen auch im Zytoplasma lokalisiert werden. MUC2 wurde im normalen Urothelgewebe nicht gefunden, wurde aber bei 40% der Blasenkarzinomproben nachgewiesen, wobei kein Zusammenhang zwischen der Expression von MUC2 und dem Tumorstadium beziehungsweise der Tumordifferenzierung bestand (Walsh et al., 1994). Später konnte ebenfalls gezeigt werden, dass MUC1 in Harnblasenkarzinomen nahezu doppelt so häufig exprimiert wird wie in normalem Urothelgewebe (Syrigos et al., 2000). Eine weitere Untersuchung aus demselben Jahr beschäftigte sich ebenfalls mit der Proteinexpression von MUC1 und MUC2 bei Harnblasenkarzinomproben. MUC1 war dabei mehr als doppelt so häufig in Tumorgewebe nachweisbar wie MUC2. Die MUC1 Proteinexpression war in entdifferenzierten und muskelinvasiven Tumoren deutlich höher als in gut differenzierten, oberflächlichen Tumoren (Cardillo et al., 2000).

### **1.3.5 Veränderung der Muzinexpression und der Muzinstruktur bei der Tumorentstehung**

Neoplastisches Gewebe kann gegenüber dem gesunden Ursprungsgewebe in Bezug auf die Muzinexpression sowie auf die Muzinstruktur verändert sein. Die Veränderungen der Expression umfassen eine vermehrte, verminderte oder auch fehlende Expression von Muzinen in Tumorgewebe, wobei umgekehrt auch die Expression im gesunden Ursprungsgewebe fehlen kann (Ho et al., 1993, Kim et al., 1996). Die Muzinstruktur kann sich durch Veränderungen in der

Kohlenhydratstruktur dahingehend verändern, dass neue Epitope gebildet oder Proteingerüste freigelegt werden (McGuckin et al., 1995). Mit zunehmender Metaplasie können alle Veränderungen im Verlauf variieren (Reis et al., 1999). Eine Veränderung der Muzinexpression oder der Muzinglykosylierung unter dem Einfluss von Infektionen oder exogenen Faktoren wie z.B. Zigarettenrauch wurde ebenfalls beobachtet (Li et al., 2006, Kang et al., 2008, Linden et al., 2008, Fan et al., 2010).

In mehreren Arbeiten wurde bereits die tumorassoziierte, veränderte Expression und divergente Kohlenhydratstruktur von Muzinen beschrieben (Singhal et al., 1990, Devine et al., 1992). Dadurch kommt es zu mehreren für die Tumorzelle vorteilhaften Veränderungen. Die veränderte Kohlenhydratstruktur ermöglicht der neoplastischen Zelle eine effektivere Bindung an das Gefäßendothel, was eine Metastasierung begünstigen könnte. Weiterhin könnte die veränderte Antigenstruktur der Zelloberfläche einen effektiven Schutz vor Angriffen des Immunsystems darstellen, da dieses die Tumorzellen nicht mehr als solche erkennen kann. Möglicherweise weisen Tumore mit einer alterierten Muzinexpression somit eine stärkere Progressions- und Metastasierungstendenz auf. Im Jahr 1993 konnte dieser Zusammenhang zwischen dem Mammakarzinom und einer MUC2 Genexpression gezeigt werden (Walsh et al., 1993). Eine weitere Studie aus dem Jahr 1998 konnte eine ähnliche Korrelation bei Magenkarzinomen mit einer MUC1 Proteinexpression zeigen. Patienten ohne MUC1 Proteinexpression hatten eine signifikant höhere Überlebenszeit als Patienten mit einem MUC1 positiven Tumor (Utsunomiya et al., 1998).

In Bezug auf das Blasenkarzinom gibt es einen interessanten Zusammenhang zwischen der therapeutisch angewandten Instillation von Bacillus Calmette-Guerin (BCG) und der Muzinexpression der Blasenschleimhaut. BCG wird als Immuntherapeutikum zur Behandlung oberflächlicher Blasentumore und nach der transurethralen Resektion zur Rezidivprophylaxe eingesetzt (Nishino et al., 1999). Die BCG-Instillation führt zu einer humoralen und zellulären Immunantwort, welche längerfristig in der Harnblasenwand persistiert (Bohle et al., 2001). In einer Arbeit von 1992 konnte gezeigt werden, dass die Anheftung von BCG an die Blasenschleimhaut insbesondere vom Glykosylierungszustand der muzinbildenden

Urothelschicht abhängt. Nach Entfernung der Muzinschicht konnte eine verstärkte Bindung von BCG an die Blasenschleimhaut beobachtet werden (Badalament et al., 1992).

### **1.3.6 MUC7 als diagnostischer und prognostischer Tumormarker**

Muzine stehen schon länger als Tumormarker im Fokus der medizinischen Diagnostik und gelten daneben auch als mögliche Ansatzpunkte in der Krebstherapie (Hollingsworth et al., 2004). Das humane Muzin 7 wurde bis heute nur von wenigen Studien als möglicher Tumormarker untersucht. Eine japanische Arbeitsgruppe konnte 2004 mit Hilfe der MUC7 RT-PCR den Nachweis einer MUC7 Expression in peripheren Blutproben von Blasenkarzinompatienten erbringen. Bei Patienten mit oberflächlichem Blasentumor war bei 38% ein MUC7 Produkt im Blut nachweisbar. Bei Patienten mit einem muskelinvasiven Tumor lag der MUC7 Nachweis mit 78% deutlich höher. Im Gegensatz dazu konnte bei keinem der gesunden Kontrollpatienten eine MUC7 Expression im Blut nachgewiesen werden (Kinjo et al., 2004). Eine Untersuchung aus dem Jahr 1998 erbrachte, dass MUC7 eine konstante Genexpression bei invasiv wachsenden Urothelkarzinomen sowie dem Carcinoma in situ der Harnblase zeigt. Auch in vier Blasenkarzinomzelllinien konnte eine MUC7 Genexpression nachgewiesen werden. Die MUC7 Genexpression fehlte dagegen in normalem Urothelgewebe sowie in oberflächlich wachsenden Blasentumoren. Die Genexpression von MUC7 scheint daher im Rahmen der malignen Entartung des Urothelgewebes aufzutreten (Retz et al., 1998). Eine weitere Studie untersuchte die MUC7 Genexpression in Lymphknoten bei Patienten mit einem Harnblasenkarzinom. Es konnte gezeigt werden, dass MUC7 mit Hilfe der MUC7 RT-PCR im Gewebe aller fünf Lymphknoten mit histologisch gesicherten Lymphknotenmetastasen nachgewiesen werden konnte. Zusätzlich dazu konnte in 46 von 160 histologisch tumorfreien Lymphknoten eine MUC7 Genexpression nachgewiesen werden (Retz et al., 2004). Dagegen konnte eine Genexpression von MUC7 in Lymphknoten von gesunden Patienten nicht nachgewiesen werden, was eine wichtige Voraussetzung zur Eignung von MUC7 als Marker zum Nachweis von Tumormetastasen in Lymphknoten darstellt (Retz et al., 2004). Des Weiteren existiert eine Untersuchung zur Muzinexpression in

Mukoepidermoidkarzinomen der Speicheldrüsen. Eine Expression von MUC7 konnte nur sehr selten in diesen Tumoren nachgewiesen werden (Alos et al., 2005).

#### **1.4 Detektionsmethoden zum Nachweis vereinzelter Tumorzellen in Lymphknoten von Tumorpatienten**

Zum Nachweis von Tumorzellen in Lymphknoten wird heutzutage standardmäßig eine histopathologische Schnittuntersuchung durchgeführt. Dabei ist zu beachten, dass dabei eine Detektionsgrenze existiert und aus ökonomischen Gründen in der Routinediagnostik nur einige wenige Schnitte von Gewebeproben angefertigt werden können. Unabhängig von der histopathologischen Untersuchung wurden nach aktuellem Stand der Literatur bis heute hauptsächlich zwei weitere verschiedene Methoden zum Nachweis vereinzelter Tumorzellen in Lymphknoten angewandt. Auf der einen Seite wurde die Proteinexpression von Epithelmarkern mit der klassischen Immunhistochemie untersucht, zum anderen wurde diese Proteinexpression mit der Reversen Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) analysiert. Bis heute existieren erst wenige Arbeiten, welche mit den beiden zuletzt genannten Methoden den Nachweis vereinzelter Tumorzellen in Lymphknoten bei Blasen tumorpatienten untersucht haben.

Eine Arbeitsgruppe untersuchte im Jahr 1999 mit Antizytokeratin-Antikörpern (CAM 5,2 und AE1/AE2) 159 histopathologisch tumorfreie Lymphknoten von Patienten mit einem Blasenkarzinom. Dabei konnte nur ein einziger Lymphknoten mit der Immunhistochemie zusätzlich als Metastase klassifiziert werden, welche anschließend in der histopathologischen Reevaluierung ebenfalls gefunden wurde (Yang et al., 1999). Diese Methode konnte somit keine signifikant höhere Nachweisrate einer Lymphknotenmetastasierung beziehungsweise einer Mikrometastasierung erbringen.

Demgegenüber steht die zweite Methode, bei welcher die Detektion vereinzelter Tumorzellen auf dem molekularbiologischen Nachweis epithelialer Marker mit Hilfe der RT-PCR beruht. Im Jahr 2002 wurden 85 histopathologisch tumorfreie Lymphknoten von Kolonkarzinompatienten mit der spezifischen CK-20-PCR untersucht, wobei 52% eine positive CK-20 Genexpression zeigten. Die Erhebung

der Nachsorgedaten erbrachte, dass die 5-Jahres-Überlebensrate bei Patienten mit positiver CK-20 Genexpression in den Lymphknotenproben bei 77,9% lag, für die Patienten mit negativer CK-20 Genexpression hingegen bei 94,7% (Rosenberg et al., 2002). In einer Arbeit aus dem Jahr 2001 wurden Lymphknoten von Ösophaguskarzinompatienten auf eine CEA-Genexpression (Carcinoembryonales Antigen) hin untersucht, wobei ein signifikanter Unterschied bezüglich der progressionsfreien Überlebenszeit zwischen Patienten mit und ohne CEA-Genexpression bestand (Godfrey et al., 2001). In einer Arbeit von Seraj und Mitarbeitern aus dem Jahr 2001 wurden erstmals Lymphknoten von Blasen-tumorpatienten untersucht. Der in der RT-PCR zugrunde liegende Epithelmarker war das Uroplakin 2 (UP-II). Bei der geringen Probenanzahl von 19 untersuchten Lymphknoten wurden alle drei histopathologisch nachgewiesenen Lymphknotenmetastasen auch in der spezifischen UP-II-RT-PCR positiv getestet. Daneben konnte in 4 von 16 histopathologisch tumorfreien Lymphknoten eine Uroplakin-II Genexpression nachgewiesen werden (Seraj et al., 2001).

Die bis heute einzige Arbeit zur Detektion vereinzelter Tumorzellen in Lymphknoten von Blasen-tumorpatienten mit der spezifischen MUC7 RT-PCR wurde im Jahr 2004 publiziert, und umfasste ein Patientenkollektiv von 25 Personen mit einer untersuchten Gewebeprobenanzahl von insgesamt 166 geeigneten Lymphknotenproben. Dabei zeigte sich, dass 29% der 160 histopathologisch tumorfreien Lymphknoten eine positive MUC7 Genexpression aufwiesen. Fünf der sechs histopathologisch positiven Lymphknoten zeigten eine positive MUC7 Genexpression, wobei die histopathologische Reevaluierung des sechsten Lymphknotens einen Tumorbefall in einer anliegenden Vene und nicht im Lymphknoten selbst zeigte (Retz et al., 2004).



## 1.5 Fragestellung

Das Ziel unserer Arbeitsgruppe war die Prüfung und mögliche Etablierung neuer diagnostischer und prognostischer Tumormarker für Patienten mit lokal fortgeschrittenem Urothelkarzinom der Harnblase. Der in dieser Arbeit untersuchte Epithelmarker war das humane Muzin 7 (MUC7). Weitere von unserer Arbeitsgruppe untersuchte Epithelmarker waren CK-20, UP-II und MUC5b. Im ersten Teil der Arbeit wurden Zelllinien von Urothelkarzinomen mit verschiedenen Differenzierungsgraden sowie Blutproben gesunder Probanden auf eine Genexpression von MUC7 hin untersucht. Zur Bestimmung der Sensitivität wurden mehrfach Verdünnungsreihen mit der MUC7 positiven Harnblasenkarzinomzelllinie T24 durchgeführt. Im zweiten Teil der Arbeit wurden insgesamt 790 Lymphknotenproben von 41 Patienten mit lokal fortgeschrittenem Urothelkarzinom der Harnblase untersucht, welche im Rahmen der Zystektomie mit begleitender Lymphadenektomie entnommen worden waren. Die Untersuchung erfolgte anhand der spezifischen MUC7 Reversen Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion und diente der Detektion okkultur Tumorzellen. Alle Lymphknoten wurden während der Operation aus genau definierten anatomischen Regionen entnommen und entsprechend katalogisiert.

Das Hauptziel dieser Arbeit war der Vergleich zwischen der histopathologischen und der hier durchgeführten molekulargenetischen Detektion von Metastasen in den Lymphknotenproben. Weiterhin wurde eine Korrelation zwischen dem pT-Stadium des Primärtumors und dem Anteil der jeweils entnommenen Lymphknoten mit positiver MUC7 Genexpression untersucht. Zum Schluss wurde die Verteilung der MUC7 positiven Lymphknotenproben in Bezug auf die definierten anatomischen Regionen untersucht. Die Bewertung von MUC7 als Prognosemarker für das rezidivfreie Überleben wird Gegenstand einer zukünftigen Untersuchung sein.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Allgemeine Materialien

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Materialien, die bei verschiedenen Arbeitsabschnitten verwendet wurden, werden im Folgenden aufgeführt. Spezielle Materialien und Geräte sowie alle Reagenzien werden im jeweiligen Abschnitt genannt. Bei allen Laborarbeiten wurden grundsätzlich ein Laborkittel sowie Einmal-Arbeitshandschuhe aus Naturlatex getragen. Wenn nötig, wurden zusätzlich eine Schutzbrille sowie ein Mundschutz getragen. Die Arbeiten im Operationsaal wurden in Operationskleidung mit sterilem Kittel, sterilen Handschuhen, Mundschutz und Schutzbrille durchgeführt.

Pipetten peqpette	Peqlab, Erlangen
Größen:	
0,5-10µl, 2-20µl, 20-200µl, 100-1000µl	
Pipettenspitzen	Biozym, Hessisch Oldendorf
Sterile Pipettenspitzen	Biozym, Hessisch Oldendorf
Sterile Pipettenspitzen mit Filter (DNase/RNase-frei)	Biozym, Hessisch Oldendorf
Größen aller Pipettenspitzen:	
10µl, 20µl, 100µl, 200µl, 1000µl	
Reaktionsgefäße 1,5ml	SLG GmbH, Gauting
Reaktionsgefäße 1,5ml (steril)	SLG GmbH, Gauting
Reaktionsgefäße 1,5ml (DNase/RNase-frei)	SLG GmbH, Gauting
Reaktionsgefäße 0,5ml (DNase/RNase-frei)	Biozym, Hessisch Oldendorf
Reaktionsgefäße 0,2ml (DNase/RNase-frei)	SLG GmbH, Gauting
Arbeitshandschuhe Sempercare aus Naturlatex	Semperit, Wien
Tischzentrifuge QikSpin (Mod. QS7000)	Edwards Instruments
Schüttelgerät Minishaker KS1	IKA Works Inc., USA

## 2.2 Zellkulturen

### 2.2.1 Reagenzien

RPMI 1640 Medium mit Phenolrot mit stabilem Glutamin und Natriumhydrogenkarbonat (2g/l)	Biochrom AG, Berlin
Fötale Kälberserum	Biochrom AG, Berlin
Antibiotikamischung Penicillin-Streptomycin bestehend aus 10000U Penicillin/ml und 10mg Streptomycin/ml	Invitrogen, Karlsruhe
Nicht essenzielle Aminosäuren	Biochrom AG, Berlin
PBS Dulbecco (Phosphatgepufferte Salzlösung)	Biochrom AG, Berlin
Trypsin/EDTA (0,05% / 0,02%) in PBS	Biochrom AG, Berlin
Trypanblau 0,5%	Biochrom AG, Berlin
RNazol (Trizol-Reagent)	Sigma-Aldrich, Hamburg

### 2.2.2 Materialien und Laborgeräte

Steril-Werkbank Herasafe KS12	Thermo Scientific, Karlsruhe
Brutschrank Heraeus CO2-Auto-Zero	Heraeus, Hanau
Brutschrank Heraeus B6030	Heraeus, Hanau
Zellkulturschalen	BD Falcon, Heidelberg
Zentrifuge Rotina 35R	Hettich, Tuttlingen
Zentrifugenröhrchen (steril) 10ml	BD Falcon, Heidelberg
Pipettierhilfe Pipetboy acu	Integra Biosciences, Fernwald
Serologiepipetten (1/2/5/10/25ml)	BD Falcon, Heidelberg
Absaugpumpe Atmolit 16N	Atmos, Lenzkirch
Glaspipetten (steril)	BD Falcon, Heidelberg
Brenner Fireboy eco	Integra Biosciences, Fernwald
Mikroskop Axiovert 135	Zeiss, Göttingen
Zählkammer nach Neubauer	Marienfeld, Lauda
Wasserbad	Memmert, Schwabach

### 2.2.3 Permanente Zelllinien

Die in dieser Arbeit verwendeten permanenten Zelllinien wurden von der 'Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH' in Braunschweig bezogen und sind in Tabelle 2 aufgeführt.

Bezeichnung	Ursprungsgewebe	Grading
RT-4	Humanes Urothelkarzinom	G1
RT-112	Humanes Urothelkarzinom	G2
647-V	Humanes Urothelkarzinom	G2
J-82	Humanes Urothelkarzinom	G3
T-24	Humanes Urothelkarzinom	G3
CHO	Chinesische Hamsteroarialzellen	
JURKAT	Humane T-Zell-Leukämiezellen	

Tabelle 2: Zelllinien und deren Ursprungsgewebe

### 2.2.4 Kultivierung permanenter Zelllinien

Die Kultivierung der in dieser Arbeit verwendeten permanenten Zelllinien erfolgte als Monolayer auf Zellkulturplatten unter Zugabe von auf 37°C erwärmten RPMI 1640 Medium. Diesem Kulturmedium wurden vor Verwendung anteilmäßig 10% hitzeinaktiviertes fötales Kälberserum sowie jeweils 1% NEAs (Nicht-essenzielle Aminosäuren) und 1% der Antibiotikamischung aus Penicillin und Streptomycin hinzugegeben. Die Zugabe der Antibiotika diente der Verhinderung einer bakteriellen Überwucherung der Kultur. Das Kulturmedium wurde bis zur Verwendung bei 6°C im Kühlschrank gelagert. Die Kultivierung der Zellen erfolgte im Brutschrank bei einer Temperatur von 37°C in einer feuchten 5%igen CO<sub>2</sub>-Atmosphäre.

### 2.2.5 Erstellung neuer Zellpassagen und Überführung von Zellen aus der Zellkultur in RNazol (Trizol-Reagent)

Die Erstellung neuer Zellpassagen erfolgte während der gesamten Kultivierung in einem konstanten Zeitfenster von 48-72h nach der Aussaat einer neuen Passage. Um eine optimale Ausgangssituation für die neuen Passagen zu gewährleisten, wurden pro Aussaat jeweils 1x10<sup>6</sup> Zellen der Vorgängerpassage in 10ml RPMI

Medium (inkl. Zusätzen, Punkt 2.2.4) kultiviert. Bei der Erstellung einer neuen Passage wurden die Zellkulturschalen nach der Entnahme aus dem Brutschrank zunächst mikroskopisch untersucht, um die Konfluenz zu überprüfen, die Kulturen auf Kontaminationen zu untersuchen und um das Wachstumsmuster sowie den Anteil der toten Zellen zu bestimmen. Alle Zellpassagen, die nicht zweifelsfrei für die Weiterverarbeitung geeignet waren, wurden verworfen. Die Weiterverarbeitung der Zellkulturen erfolgte stets unter sterilen Bedingungen unter einer Steril-Werkbank. Zunächst wurde das Medium von der Platte abgesaugt und verworfen. Danach wurden zwei Mal hintereinander 10ml PBS vorsichtig auf die Platte pipettiert, anschließend wieder abgesaugt und ebenfalls verworfen. Danach wurden 2ml Trypsin / EDTA - 0,05% / 0,02% auf die Zellkulturplatte pipettiert und diese für 5 Minuten im Brutschrank bei 37°C in einer 5%igen CO<sub>2</sub>-Atmosphäre inkubiert, wodurch sich die Zellen vom Boden der Zellkulturschale ablösten. Der Ablösevorgang wurde anschließend mikroskopisch kontrolliert. Danach wurden 8ml RPMI Medium hinzugegeben und die nun insgesamt 10ml Flüssigkeit inklusive der darin gelösten Zellen in ein steriles 10ml Zentrifugenröhrchen (Falcon) überführt. Die Zellsuspension wurde nun für 5min bei Raumtemperatur und 250G abzentrifugiert. Dadurch bildeten die Zellen ein Pellet am Boden des Röhrchens. Der Überstand wurde komplett abgehoben und verworfen. Das Zellpellet wurde anschließend in 1ml neuem Nährmedium resuspendiert. Aus dieser gut gemischten Zellsuspension wurden 50µl in ein 1,5ml Reaktionsgefäß überführt, dort im Verhältnis 1:1 mit Trypanblau gemischt und in eine Neubauer-Zählkammer überführt, mit welcher unter dem Mikroskop die Anzahl der Zellen in der Zellsuspension ermittelt wurde. Im Anschluss daran wurden 1x10<sup>6</sup> Zellen für die neue Passage aus der Zellsuspension entnommen, zusammen mit 10ml RPMI Medium (plus Zusätze) auf eine neue Zellkulturschale gegeben und wieder kultiviert. Der andere Teil der Zellsuspension wurde entweder im Rahmen einer Zellverdünnungsreihe weiterverarbeitet (Punkt 2.7.8.1) oder im Gesamten erneut abzentrifugiert, das überstehende Medium verworfen und das Zellpellet in 1ml RNazol (Trizol) resuspendiert. Letzteres diente der Herstellung von Kontrollen für die PCR-Analysen.

## **2.3 Gewebeproben**

### **2.3.1 Auswahl des Patientenkollektivs**

Die Auswahl des Patientenkollektivs erfolgte im Rahmen einer Studie der Arbeitsgemeinschaft Urologische Onkologie (AUO) mit dem Titel: "Prospektiv randomisierte Studie zum Vergleich einer ausgedehnten mit einer eingeschränkten pelvinen Lymphadenektomie bei der operativen Therapie des Harnblasenkarzinoms" (Kurzform: LEA-Studie). Die für diese Studie von der AUO vergebene Studiennummer lautet AB 25/02. Alle Ein- und Ausschlusskriterien der LEA-Studie sind Tabelle 3 zu entnehmen. Daneben wurden auch Lymphknotenproben von Patienten untersucht, welche trotz eines oberflächlichen Harnblasentumors mit einer Zystektomie und begleitender Lymphadenektomie behandelt wurden. Dies war immer dann der Fall, wenn ein multifokaler oberflächlicher Tumor vorlag oder eine Resektionsbehandlung nicht durchgeführt werden konnte.

#### **2.3.1.1 Studienziele der LEA-Studie und wissenschaftliches Begleitprogramm**

Primäres Studienziel ist der Vergleich zwischen ausgedehnter und eingeschränkter Lymphadenektomie bei der radikalen Zystektomie und die Auswirkungen auf die progressionsfreie Überlebensrate zur Definierung eines Operationsstandards. Gegenstand dieser Arbeit war eine die LEA-Studie begleitende wissenschaftliche Untersuchung, mit dem Ziel der molekularbiologischen Detektion von Mikrometastasen in den entnommenen Lymphknoten anhand des Nachweises verschiedener Gewebemarker. Es wurde eine vergleichende Untersuchung zwischen dem Nachweis der Gewebemarker und der histopathologischen Untersuchung der entnommenen Lymphknoten durchgeführt. Das Ziel ist die mögliche Etablierung neuer prognostischer Tumormarker, welche den Nachweis okkultur Tumorzellen in Lymphknoten ermöglichen. Der in dieser Arbeit untersuchte Gewebemarker war das humane Protein Muzin 7 (MUC7). Die Studie wurde von der klinischen Ethikkommission der Technischen Universität München genehmigt.

Die Untersuchungen erfolgten ausschließlich nach ausführlicher Aufklärung und entsprechender Einverständniserklärung der Patienten.

<b>Einschlusskriterien der LEA-Studie</b>
histologisch gesichertes, muskelinvasives Harnblasenkarzinom, lokal komplett resektabel (T2-T4a, Nx)
Alter $\geq$ 18 Jahre
Schriftliche Einwilligungserklärung des Patienten
Patienten-Compliance und geographische Nähe, die ein adäquates Follow-Up ermöglichen
<b>Ausschlusskriterien der LEA-Studie</b>
Histologisch oder durch bildgebende Diagnostik gesicherte Organmetastasen
Radiologischer Nachweis von vergrößerten Lymphknoten ( $>1$ cm) oberhalb der Aortenbifurkation in Verbindung mit pelvinen Lymphknotenmetastasen
Radiologischer oder sonstiger Nachweis eines T4b-Tumors (Infiltration der Beckenwand oder anderer Organsysteme)
Zustand nach neoadjuvanter Polychemotherapie des Blasenkarzinoms
Zustand nach früherer pelviner Lymphadenektomie
Zustand nach Radiotherapie des Beckens
Internistische oder anästhesiologische Risikofaktoren, die eine kurze Operationszeit erforderlich machen
Palliative Zystektomie (z.B. Bulky-Disease, Infiltration benachbarter Strukturen)
Nachweis eines weiteren Tumors, der die Lebenserwartung des Patienten führend einschränkt

Tabelle 3: Ein- und Ausschlusskriterien der LEA-Studie

### 2.3.2 Gewinnung von Gewebeproben

Die Gewinnung aller in dieser Arbeit verwendeten Gewebeproben erfolgte im Rahmen der Zystektomie der Patienten durch einen der behandelnden Operateure der Urologischen Klinik und Poliklinik des Klinikums rechts der Isar der Technischen Universität München. Alle in dieser Arbeit untersuchten Lymphknoten wurden bei der zur Zystektomie gehörenden Lymphadenektomie gewonnen. Die Entnahme der Lymphknoten erfolgte nach im Rahmen der LEA-Studie definierten anatomischen Regionen, im Folgenden Felder genannt und in Tabelle 4 sowie Abbildung 3 dargestellt. Die ausgedehnte Lymphadenektomie umfasste alle definierten anatomischen Felder, die eingeschränkte Lymphadenektomie nur die Felder 5, 7, 9, 11, 13 und 14. Jeder präparierte Lymphknoten wurde mit einem

eindeutigen, nur ihm zugehörigen Terminus katalogisiert, welcher auch für alle folgenden Arbeitsschritte beibehalten wurde, um jede Lymphknotenprobe jederzeit eindeutig identifizieren zu können. Dieser Terminus setzte sich zusammen aus:

1. Ziffer: Feld, aus dem der Lymphknoten entnommen wurde
2. Buchstabe: Aufsteigende alphabetische Bezeichnung der Lymphknoten eines Feldes
3. Ziffer: Aufsteigende lateinische Nummerierung, falls ein Lymphknoten aufgrund seiner Größe in mehrere Stücke aufgeteilt werden musste. In allen anderen Fällen wurde diese Ziffer nicht verwendet.

Bei der Weiterverarbeitung im Labor wurde, falls nötig, noch eine römische Ziffer an den Lymphknotenterminus angefügt, falls die Probe aufgrund einer größeren, zum Auflösen benötigten RNazol-Menge aliquotiert werden musste.

<b>Feld</b>	<b>Bezeichnung</b>
1	Paracavale Gruppe rechts
2	Interaortocavale Gruppe
3	Paraaortale Gruppe links
4	Gruppe A. iliaca communis rechts
5	Gruppe A. iliaca externa rechts
6	Gruppe A. iliaca communis links
7	Gruppe A. iliaca externa links
8	Präsakrale Gruppe
9	Obturatorische Gruppe rechts
10	Tiefe obturatorische Gruppe rechts
11	Obturatorische Gruppe links
12	Tiefe obturatorische Gruppe links
13	Gruppe A. iliaca interna rechts
14	Gruppe A. iliaca interna links

Tabelle 4: Definition der anatomischen Felder für die Lymphadenektomie



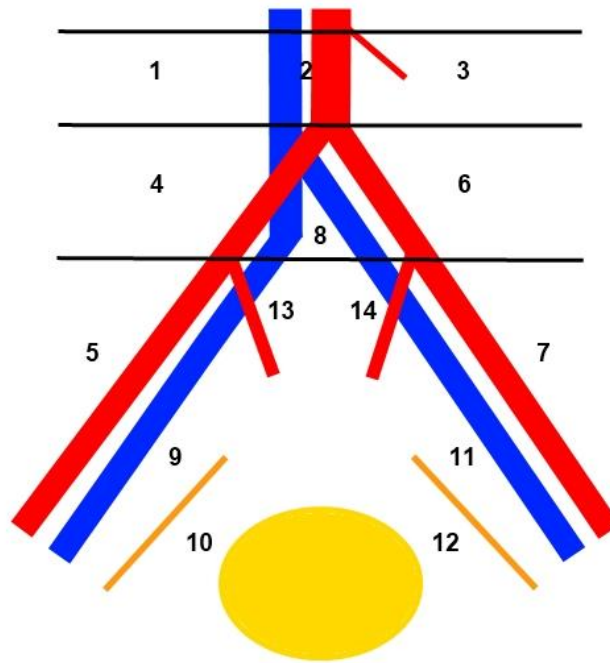


Abbildung 3: Anatomische Aufteilung der Lymphadenektomie-Felder

### 2.3.2.1 Reagenzien

Flüssigstickstoff (N<sub>2</sub>)

Formaldehydlösung, 4%

Gewebefarbstoffe

Bouin'sche Lösung

Roth, Karlsruhe

Cancer Diagnostics Inc., USA

Klinikapotheke MRI, München

### 2.3.2.2 Materialien

OP-Kittel (steril)

OP-Handschuhe (steril)

Einmalpinzetten (steril)

Einmalskarpelle (steril)

Kompressen (steril)

Folie aus Aluminium (autoklaviert)

Servoprax, Wesel

Feather, Osaka

L&R, Rengsdorf

Igefa, Dahlewitz

### 2.3.3 Lymphknotengewebe

Das bei der Lymphadenektomie entnommene Gewebe wurde im Operationssaal an einem separaten Tisch unter sterilen Bedingungen aufgearbeitet. Dabei wurden die im Gewebe enthaltenen Lymphknoten vorsichtig ertastet und das umliegende Binde- und Fettgewebe mit einem sterilen Skalpell entfernt, ohne die Lymphknoten zu verletzen. Dabei wurden nur Lymphknoten mit einer Größe von mindesten 7mm bearbeitet. Für jedes Gewebestück und jeden Lymphknoten wurden neue sterile Handschuhe, eine neue sterile Einmalpinzette und ein neues steriles Einmalskalpell verwendet. Als Unterlage dienten sterile Kompressen, die ebenfalls für jede Gewebeprobe und jeden Lymphknoten erneuert wurden. Jeder präparierte Lymphknoten wurde in der Mitte geteilt, wobei die erste Hälfte (Abbildung 4, Teil 1) mit Gewebefarbe markiert, in Bouin'scher Lösung fixiert und zur Konservierung in einem Gewebeprobengefäß in eine Formaldehydlösung überführt wurde. Von der anderen Hälfte wurde ein kleiner Teil der Gegenseite (Abbildung 4, Teil 3) des Lymphknotens entfernt, mit Gewebefarbe markiert, in Bouin'scher Lösung fixiert und ebenfalls in ein Gewebeprobengefäß in einer Formaldehydlösung konserviert. Der übrig gebliebene Teil des Lymphknotens (Abbildung 4, Teil 2) wurde flüssigkeitsdicht in autoklavierte Alufolie verpackt und in Flüssigstickstoff tiefgefroren. Alle drei Teile wurden mit demselben eindeutigen Lymphknotenterminus versehen. Die pathologische Aufarbeitung der in Formaldehydlösung gelagerten Lymphknotenteile wurde vom Pathologischen Institut des Klinikums rechts der Isar der TU München übernommen. Alle Proben wurden im Hinblick auf die Gewebedignität untersucht. Die in Flüssigstickstoff tiefgefrorenen Proben wurden zur weiteren Lagerung bei einer Temperatur von -80°C eingelagert.

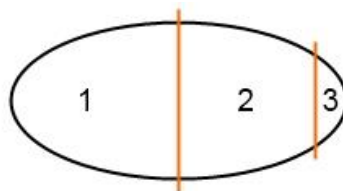


Abbildung 4: Aufteilung eines Lymphknotens

### **2.3.4 Urothelgewebe und Tumorgewebe der Harnblase, Binde- und Fettgewebe**

Die Harnblase mit Urothel- und Tumorgewebe wurde im Anschluss an die Zystektomie als Präparat an das Pathologische Institut des Klinikums rechts der Isar der TU München übergeben, um die Gewebedignität zu untersuchen und den Tumor gemäß der UICC-Richtlinien zu klassifizieren. Das von allen makroskopisch feststellbaren Lymphknoten befreite Binde- und Fettgewebe wurde zur Untersuchung ebenfalls an das Pathologische Institut weitergeleitet.

### **2.3.5 Lagerung der Proben**

Die Lagerung der Proben erfolgte je nach Anforderung im Hinblick auf den bestmöglichen Schutz und Erhalt der Probe. Alle Gewebeproben, in RNazol gelöste Zellbestandteile sowie die aus den Proben extrahierte RNA wurden tiefgefroren bei -80°C in einem Spezialtiefkühlschrank gelagert. Komplementäre DNA sowie sämtliche PCR-Produkte wurden tiefgefroren bei -20°C in einem Tiefkühlschrank gelagert. Während der Verarbeitung wurden die Proben grundsätzlich in einem auf Crushed-Eis aufliegenden Tray aufgetaut und dort gelagert.

### **2.3.6 Vorbereitung der Lymphknotenproben für die spätere RNA-Extraktion**

#### **2.3.6.1 Reagenzien**

Flüssigstickstoff (N<sub>2</sub>)

Diethylpyrocarbonat (DEPC)

Sigma-Aldrich, Hamburg

RNazol (Trizol-Reagent)

Sigma-Aldrich, Hamburg

#### **2.3.6.2 Materialien**

Mikro-Dismembrator U

Braun, Melsungen

Dismembrator-Teflongefäße (3ml und 5ml)

Metallkugeln (5mm Durchmesser)

Metallspatel

Zentrifugenröhrchen (steril) 50ml  
Feinmechanik-Präzisionshammer

BD Falcon, Heidelberg

### **2.3.7 Mechanische Zerkleinerung der Lymphknoten und Überführung in RNazol (Trizol-Reagent)**

Die zur Weiterverarbeitung ausgewählten Lymphknoten wurden aus der Lagerung bei -80°C entnommen und in ein mit Flüssigstickstoff gefülltes Transportgefäß überführt, ohne den tiefgefrorenen Zustand der Proben zu unterbrechen. Die Verarbeitung der Lymphknoten erfolgte einzeln unter sterilen Bedingungen. Während des gesamten Vorgangs wurden sterile Handschuhe getragen, die für jede Probe gewechselt wurden. Des Weiteren wurden ein Laborkittel, ein Mundschutz, eine Kopfhaube sowie eine Schutzbrille getragen. Alle für die Gewebezerkleinerung benötigten Materialien wurden vor ihrer Verwendung mit Diethylpyrocarbonat behandelt und autoklaviert. Diese Maßnahmen dienten dem Schutz vor Verunreinigungen der Proben mit Fremd-RNA. Die benötigten Dismembrator-Teflongefäße, die Metallkugeln sowie die Metallspatel wurden in einem zweiten Gefäß mit Flüssigstickstoff vorgekühlt, damit während des Kontakts mit den Proben ein Auftauen des Gewebes so weit wie möglich verhindert werden konnte. Nach Entnahme eines Lymphknotens aus dem Flüssigstickstoff wurde die jeweilige noch in Alufolie verpackte Probe durch einen Schlag mit dem Hammer grob zerkleinert. Danach wurden die Lymphknotenbruchstücke mit Hilfe eines Metallspatels aus der Alufolie in ein Dismembratorgefäß überführt und eine Metallkugel hinzugegeben. Das Gefäß wurde umgehend in den Dismembrator eingespannt, in welchem die Probe innerhalb von 70s bei 1800rpm zu einem feinen Pulver zermahlen wurde. Dieses Pulver wurde sofort im Anschluss in ein bereits vorbereitetes mit RNazol (Trizol-Reagent) gefülltes Zentrifugenröhrchen (50ml, Falcon) überführt. Je nach Probengröße wurden 1-5ml RNazol verwendet. Die Probe wurde anschließend bis zur vollständigen Auflösung mit einer Pipette so lange vorsichtig gemischt, bis makroskopisch keine festen Bestandteile mehr sichtbar waren. Bei mehr als 1ml verwendetem RNazol wurden die Proben zu je 1ml in 1,5ml Reaktionsgefäßen aliquotiert und eindeutig beschriftet. Bis zu weiteren Verarbeitung wurden die Proben bei -80°C tiefgefroren gelagert.

### **2.3.8 Peripher venöse Blutproben von gesunden Probanden**

Zur Kontrolle auf MUC7 Genexpression in Blutzellen wurden venöse Blutproben von 15 gesunden freiwilligen Probanden untersucht, die keine bekannte Erkrankung oder Tumoranamnese hatten. Das Gruppenkollektiv bestand dabei aus sechs weiblichen und neun männlichen Probanden. Das Durchschnittsalter zum Zeitpunkt der Untersuchung lag bei 28 Jahren (19-52 Jahre). Alle Probanden dieser Kontrollgruppe wurden über den Zweck der Blutentnahme und der folgenden Untersuchung aufgeklärt und gaben ihre mündliche Einwilligung. Die Entnahme erfolgte durch für diese Maßnahme ausgebildete Fachkräfte. Zunächst wurden 5ml Blut entnommen, die anschließend verworfen wurden, um eine mögliche Kontamination der Blutprobe durch kutane Zellen zu verhindern, welche während des Einstichs der Kanüle durch die Haut in die Probe hätten gelangen können. Dies war nötig, da die Proben im Rahmen der Arbeitsgruppe auch auf andere Tumormarker wie z.B. CK-20 untersucht wurden. CK-20 zeigt eine Genexpression in kutanen Merkel-Zellen, was zu falsch positiven Ergebnissen bei der Genamplifikation hätte führen können (Moll et al., 1992). Für MUC7 ist keine kutane Genexpression beschrieben. Ohne die Kanüle zu wechseln, wurden nun 10ml Blut in eine EDTA-Blutmonovette (Sarstedt) entnommen. Die Proben wurden umgehend im Labor weiterverarbeitet. Jede Blutprobe wurde zunächst in einem Zentrifugenröhrchen (50ml, Falcon) im Verhältnis 1:1,5 mit PBS verdünnt. Diese Suspension wurde danach in einem neuen Zentrifugenröhrchen (50ml, Falcon) vorsichtig auf 20ml Ficoll-Lösung aufpipettiert, ohne die beiden Phasen zu vermischen. Durch eine anschließende Zentrifugation für 20min und 250G bei Raumtemperatur bildete sich eine opake, die mononukleären Blutzellen enthaltende Interphase, welche abpipettiert und in ein weiteres mit 45ml PBS gefülltes Zentrifugenröhrchen (50ml, Falcon) überführt wurde. Nach erneuter Zentrifugation für 10min und 500G bei Raumtemperatur wurde der Überstand komplett abgehoben und das sich am Boden befindende Zellpellet in 1ml PBS resuspendiert. Anschließend wurde mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer die Anzahl der Zellen innerhalb der Suspension ermittelt. Danach wurde die Suspension wieder für 10min und 500G bei Raumtemperatur abzentrifugiert, um das PBS komplett abzuheben und die Zellen in 1ml RNazol (Trizol-Reagent) zu resuspendieren. Anschließend erfolgte die RNA-Extraktion (Punkt 2.4.3) oder die

Lagerung bei -80°C bis zur weiteren Verarbeitung. Nach Extraktion der Zell-RNA wurde diese mit Hilfe der Reverse-Transkriptase Reaktion in cDNA umgeschrieben und danach mit der MUC7 nested-PCR auf eine MUC7 Genexpression untersucht.

## **2.4 RNA-Extraktion**

Die RNA-Extraktion dieser Arbeit wurde mit der 1987 von Chomczynski und Sacchi beschriebene Phenol-Chloroform-Methode (Chomczynski et al., 1987) durchgeführt. Bei dieser Methode ist es möglich, durch Zentrifugation eine Phasentrennung herbeizuführen, wobei eine der Phasen dann nahezu sämtliche in der Flüssigkeit vorhandene RNA enthält und abgehoben werden kann. Andere Zellbestandteile wie DNA, Proteine und Lipide befinden sich innerhalb der anderen Phasen und können verworfen werden. Die RNA wird bei der Weiterverarbeitung mit Hilfe von Isopropanol präzipitiert, und am Ende des Arbeitsdurchgangs in RNase-freiem Wasser resuspendiert. Bei allen Arbeitsschritten mit RNA wurden grundsätzlich RNase- und DNase-freie Materialien und Reagenzien verwendet um die Proben vor einem ungewollten Verdau zu schützen.

### **2.4.1 Reagenzien**

Chloroform	Klinikapotheke MRI, München
Isopropanol	Klinikapotheke MRI, München
Äthanol 95%	Klinikapotheke MRI, München
Äthanol 75%	Klinikapotheke MRI, München
DNase-/RNase-freies Aqua bidest.	Gibco/Invitrogen, Karlsruhe

### **2.4.2 Materialien und Laborgeräte**

Zentrifuge Centrifuge 5215R	Eppendorf, Hamburg
Thermomixer comfort 5355	Eppendorf, Hamburg
Vakuum-Exsikkator mit Wasserstrahlpumpe	Glaswerke Wertheim

### 2.4.3 RNA-Extraktion aus Zellkulturen und Gewebeproben

Um die konservierte und freigesetzte RNA der in 1ml RNAzol (Trizol-Reagent) aufgelösten Zellen der jeweiligen Zelllinie aus der Zellkultur oder einer Gewebeprobe (Blut, Lymphknotengewebe) zu extrahieren, wurden die bei -80°C tiefgefrorenen 1,5ml Reaktionsgefäße zunächst für 5min bei 30°C und 300rpm zum Auftauen inkubiert. Um die Phasentrennung einzuleiten, wurden anschließend 200µl Chloroform hinzupipettiert. Die Deckel der Reaktionsgefäße wurden dann mit einem Verschlussring gesichert und für 15sek kräftig mit der Hand geschüttelt. Danach wurden die Proben wieder für 3min bei 25°C und 0rpm im Thermomixer inkubiert. Die Reaktionsgefäße wurden anschließend in der Zentrifuge für 15min bei 12.000g und 4°C abzentrifugiert. Durch diesen Vorgang kam es zu einer Auftrennung der Flüssigkeit in drei Phasen (Abbildung 5). Die oberste Phase stellte die wässrige Phase dar, in der sich die RNA befand. In der Interphase und der unteren organischen Phase befanden sich die DNA beziehungsweise Proteine und Lipide. Von der oberen Phase wurde nun vorsichtig möglichst viel (500-700µl) in ein neues 1,5ml Reaktionsgefäß überführt, wobei die Interphase nicht mit erfasst wurde. Um die RNA zu fällen, wurden 500µl Isopropanol hinzupipettiert und die Flüssigkeit mit einer Pipettenspitze gemischt. Anschließend wurden die Proben erneut für 10min bei 25°C und 0rpm inkubiert, und danach für 10min bei 12.000g und 4°C abzentrifugiert. Dadurch bildete sich am Boden des Reaktionsgefäßes ein RNA-Pellet. Um die nun am Boden verbliebene RNA zu waschen, wurde der Überstand bis auf das Pellet abgehoben und 1ml Äthanol 75% hinzupipettiert. Im Anschluss wurden die Proben für 5min bei 4°C und 7.600G abzentrifugiert. Der Überstand wurde danach komplett abgehoben. Um die RNA wieder aufzulösen, wurden die Proben zunächst für 5min einer Vacuumtrocknung im Wasserstrahlpumpen-Exsikkator unterzogen. Danach wurden 30µl DNase-/RNase-freies Aqua bidest. hinzupipettiert, und die Reaktionsgefäße mit der Hand leicht geschüttelt, bis das Pellet nicht mehr sichtbar war. Um die RNA vollständig zu resuspendieren, wurden die Proben danach für 10min bei 55°C und 500rpm im Thermomixer inkubiert und anschließend zum Schutz der RNA sofort auf Eis gelagert.

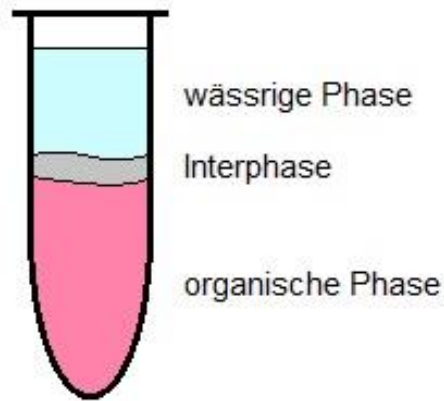


Abbildung 5: Phasentrennung nach Zentrifugation

## 2.5 Bestimmung der RNA-Konzentration

### 2.5.1 Reagenzien

DNase-/RNase-freies Aqua bidest.

Gibco/Invitrogen, Karlsruhe

RNasin plus (40U/μl)

Promega, Mannheim

### 2.5.2 Materialien und Laborgeräte

Biophotometer

Eppendorf, Hamburg

Einmal-Photometerküvetten

Brand, Wertheim

### 2.5.3 Bestimmung der RNA-Konzentration

Zur photometrischen Konzentrationsbestimmung wurden zunächst 2μl von jeder RNA-Probe zusammen mit 98μl DNase-/RNase-freiem Aqua bidest. in ein 1,5ml Reaktionsgefäß gegeben, dort mit der Pipettenspitze gemischt und anschließend im Gesamten in eine Einmal-Photometerküvette überführt. Für die Absorptionsmessung im BioPhotometer wurden zunächst 100μl reines DNase- und RNase freies bidest. Aqua als Leerwert gemessen. Die Messung der Extinktion der Proben erfolgte im UV-Licht bei 260nm Wellenlänge. Eine zweite Messung bei 280nm Wellenlänge diente der Erfassung von Verunreinigungen, welche durch den Messwertquotienten bei 260nm und 280nm bestimmt wurde. Ein Quotient unter 1,8 wies dabei auf eine Verunreinigung der Probe durch Proteine hin. Proben, die weniger als 200μg/ml RNA enthielten wurden nicht weiterverarbeitet. Zum Schutz



der RNA wurde nach der Messung zu allen Proben 1µl RNasin plus (40U/µl) hinzupipettiert. Durch die Konzentrationsbestimmung war es möglich, in den darauffolgenden Arbeitsschritten bei jeder einzelnen Gewebeprobe die gleiche Menge an RNA einzusetzen, um die späteren Ergebnisse vergleichbar zu machen.

## **2.6 Reverse Transkriptase-Reaktion**

### **2.6.1 Prinzip der Reversen Transkriptase-Reaktion**

Die 'Reverse Transkriptase-Reaktion' ermöglicht die Synthese komplementärer doppelsträngiger DNA (sog. cDNA) aus RNA. Dadurch ist es möglich, die Transkription eines bestimmten Zellgens nachzuweisen, da diese cDNA, welche später als Ausgangsprodukt für die PCR dient, aus der in der Zelle enthaltenen mRNA synthetisiert wurde. Im Gegensatz zu genomischer DNA, aus welcher grundsätzlich jedes Gen amplifiziert werden kann, ist mRNA in einer Zelle nur bei einer tatsächlichen Genexpression vorhanden. Der Reaktionsansatz besteht aus der extrahierten RNA der zu untersuchenden Zellen, Random-Primern, einer ausreichenden Menge an desoxygenierten Nukleinsäuren sowie dem für die Reaktion benötigten Reverse Transkriptase-Enzym und einem Puffer. Random-Primer sind Oligonukleotide, bestehend aus 8 Basen. Um für jede aus jeweils acht Basen bestehende Basensequenz jeder möglichen DNA-Probe einen passenden Primer zur Verfügung stellen zu können, bestehen die Random-Primer aus  $4^8 = 65.536$  Primerkombinationen (Feinberg et al., 1983). Das Reverse Transkriptase-Enzym, welches in dieser Arbeit verwendet wurde, stammt aus dem Moloney Murine Leukemia Virus (M-MLV). Für den ersten Schritt der Reaktion werden die RNA sowie die Random-Primer in das Reaktionsgefäß überführt, welches anschließend für fünf Minuten auf 70°C erhitzt wird. Dies denaturiert die RNA-Moleküle und entfaltet die Sekundärstruktur der RNA. Um die neue Entstehung der Sekundärstruktur zu verhindern, werden die Proben sofort auf Eis gelagert und dann die weiteren Reaktionskomponenten hinzugefügt. Der nun komplette Reaktionsansatz wird zunächst für 10min auf 25°C erhitzt. Bei der anschließenden Erwärmung auf 48°C für 50min kommt es zunächst zur Synthese des Hybridstranges. Danach wird das Reaktionsgemisch für 15min auf 70°C erhitzt.

Dadurch denaturiert der Hybridstrang und die DNA-Polymerase bildet den Sekundärstrang der cDNA. Im Anschluss werden die Proben bei 4°C zwischengelagert oder bei -20°C tiefgefroren.

### 2.6.2 Reagenzien

Random Primer (50ng/μl)	Promega, Mannheim
dNTP-Mix (10mM)	Promega, Mannheim
M-MLV RT (200U/μl)	Promega, Mannheim
M-MLV RT 5x Reaction Buffer	Promega, Mannheim
DNase-/RNase-freies Aqua bidest.	Gibco/Invitrogen, Karlsruhe

### 2.6.3 Materialien und Laborgeräte

Cycler Peltier Thermo Cycler 200	MJ Research, USA
----------------------------------	------------------

### 2.6.4 Durchführung der Reversen Transkriptase-Reaktion

Die RNA-Proben und die Reagenzien wurden auf Eis aufgetaut, gemischt, mit der Tischzentrifuge abzentrifugiert und anschließend wieder auf Eis gelagert. Alle Reagenzien mit Enzymaktivität wurden durchgehend in Kühlblöcken bei -20°C aufbewahrt, und auch während der Verarbeitung nicht daraus entnommen, um die Enzyme zu schützen. Je Probe wurden 2,5μg RNA mit 2μl Random Primer (50ng/μl) in einem PCR-Softtube 0,5ml gemischt, und mit DNase-/RNase-freiem Aqua bidest. ergänzt, so dass ein Gesamtvolumen von 14μl resultierte. Anschließend wurden die 0,5ml Reaktionsgefäße im Multicycler nach folgendem Programm (Tabelle 5) inkubiert:

Zeit	Temperatur
5 min	70°C
5 min	4°C

Tabelle 5: Programm für Schritt 1 der cDNA-Synthese

Direkt im Anschluss wurden die Proben auf Eis zwischengelagert. Für die weitere Verarbeitung wurde nun das Reaktionsgemisch Nr. 1 (Tabelle 6) vorbereitet, für jede Probe bestehend aus:

Menge	Substanz
1µl	M-MLV RT (200U/µl)
5µl	M-MLV RT 5x Reaction Buffer
0,5µl	RNasin plus (40U/µl)
1,25µl	dNTP-Mix (10 mM)
3,25µl	DNase-/RNase-freies Aqua bidest.

Tabelle 6: Reaktionsgemisch Nr. 1 für cDNA-Synthese

Zu jeder auf Eis gelagerten Probe wurden 11µl des Reaktionsgemisches hinzupipettiert, so dass ein Gesamtvolumen von 25µl entstand. Anschließend wurden die Proben nach folgendem Programm (Tabelle 7) im Multicycler inkubiert:

Zeit	Temperatur
10 min	25°C
50 min	48°C
15min	70°C
10min	4°C

Tabelle 7: Programm für Schritt 2 der cDNA-Synthese

Im Anschluss wurden die Proben entweder direkt weiterverarbeitet oder bei -20°C für die spätere Verarbeitung tiefgefroren. Die Konzentration der fertigen cDNA betrug 100ng/µl.

### 2.6.5 Beta-Actin PCR als Kontrolle für die Reverse Transkriptase-Reaktion

Für jede Probe wurde das Gelingen der Reverse Transkriptase-Reaktion mit Hilfe einer Amplifikation des Beta-Actin Gens kontrolliert (Prinzip der PCR, Punkt 2.7.1). Beta-Actin ist ein in allen eukaryotischen Zellen als Bestandteil des Zytoskeletts vorkommendes Strukturprotein, weshalb es auch als „Housekeeping-Gen“ bezeichnet wird. Die Beta-Actin PCR bestand aus 32 Schritten, wobei die ersten 30 Schritte das Produkt amplifizierten, Schritt 31 die Reaktion beendete und Schritt 32 eine temperaturgerechte Verwahrung der Proben im Cycler gewährleistete. Die Beta-Actin spezifischen Primer (Human-β-Actin-3' und -5') sowie das Zeit-

Temperaturprofil-Protokoll der Beta-Actin-PCR sind in den Tabellen 8 und 9 dargestellt. Die Primer wurden von der Firma Invitrogen (Karlsruhe) synthetisiert. Die PCR erfolgte je Probe mit 1µl cDNA (100ng/µl) sowie 12,5µl Go-Taq PCR-Master-Mix, 6,5µl DNase-/RNase-freies Aqua bidest. und jeweils 2,5µl HβA-3'-Primer (10µM) und HβA-5'-Primer (10µM). Das Produkt der Beta-Actin PCR bestand aus 838 Basenpaaren.

Bezeichnung	Basensequenz
HβA-3'	5'-CGTCATACTCCTGCTTGCTGATCCACATCTGC-3'
HβA-5'	5'-ATCTGGCACCACACTTCTACAATGAGCTGCG-3

Tabelle 8: Nukleotidsequenzen der spezifischen Beta-Actin-Primer

Schritt	Zyklusanzahl	Denaturierung Zeit / Temperatur	Annealing Zeit / Temperatur	Extension Zeit / Temperatur
1-30	30	20sek / 95°C	1min / 60°C	1min / 72°C
31	1	5min / 72°C		
32	1	forever / 4°C		

Tabelle 9: Zeit-Temperaturprofil-Protokoll der spezifischen Beta-Actin-PCR

## 2.7 MUC7 nested-PCR

### 2.7.1 Prinzip der Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion wurde 1985 von Kary Mullis entwickelt (Mullis et al., 1986). Die Methode dient der in-vitro Vervielfältigung eines genau definierten DNA-Strangs. Neben der Original-DNA-Probe, welche den zu vervielfältigenden Abschnitt, das sog. Template, enthält, benötigt die Reaktion mehrere Komponenten. Dazu gehören eine ausreichende Menge zweier definierter Primer, welche an den beiden DNA-Einzelsträngen die Startpunkte der Synthese festlegen. Die eingesetzte DNA-abhängige DNA-Polymerase muss hohe Temperaturen tolerieren können, ohne dabei zu denaturieren und somit funktionsunfähig zu werden. Dazu wird häufig, wie auch in dieser Arbeit, die sog. Taq-Polymerase

verwendet, eine DNA-Polymerase des Bakteriums *Thermus aquaticus*. Des Weiteren werden dem Reaktionsansatz eine ausreichende Menge von Desoxyribonukleosidtriphosphaten,  $Mg^{2+}$ -Ionen sowie eine Pufferlösung hinzugefügt. Die DNA-Amplifikation erfolgt in einem Thermocycler durch einen sich mehrfach wiederholenden Zyklus, welcher drei unterschiedliche Reaktionsschritte beinhaltet. Zunächst wird die doppelsträngige DNA bei einer hohen Temperatur denaturiert. Anschließend erfolgt die Anlagerung der Primer an die DNA-Einzelstränge, das sog. Annealing, bei Temperaturen zwischen 55-65°C. Der dritte Schritt, die Elongation, findet beim Temperaturoptimum der verwendeten Polymerase statt. Durch mehrfache Zykluswiederholungen vervielfältigt sich die DNA exponentiell (Abbildung 6). Theoretisch ist es somit möglich, aus einem einzigen DNA-Strang  $2^{30}$ - $2^{40}$  Kopien zu synthetisieren.

### **2.7.2 Prinzip der Nested-PCR**

Eine Nested-PCR ermöglicht die Erhöhung der Nachweis-Sensitivität, indem das Produkt aus einer ersten Polymerase-Kettenreaktion in einem zweiten PCR-Durchlauf weiter vervielfältigt wird (Baier et al., 1993). Die zweite PCR wird mit einem neuen Primerpaar durchgeführt, welches sich innerhalb des Produktes aus dem ersten PCR-Ansatz anlagert. Das zweite PCR-Produkt ist somit kleiner als das Produkt der ersten PCR. Eine Verwendung derselben Primer wie beim ersten Durchlauf wäre ebenfalls möglich, dann würde die PCR allerdings als Doppel-PCR bezeichnet werden. Um eine Amplifikation eventuell vorhandener genomischer DNA möglichst zu verhindern, wird für die erste PCR ein sog. „exon-spanning“-Primer eingesetzt. Während der Prozessierung einer mRNA werden die enthaltenen Introns entfernt und die verbleibenden Exons miteinander verbunden. Nach der Umwandlung der mRNA in cDNA mit Hilfe der Reverse-Transkriptase Reaktion erfolgt während der PCR die Bindung dieses speziellen Primers an einer Stelle der cDNA, welche die Enden zweier Exons des zu amplifizierenden Gens darstellt. Somit ist es für den Primer nur möglich, an eine zur mRNA komplementäre DNA zu binden, da genomische DNA noch das Intron enthalten würde und somit keine passende Bindungsstelle vorläge.

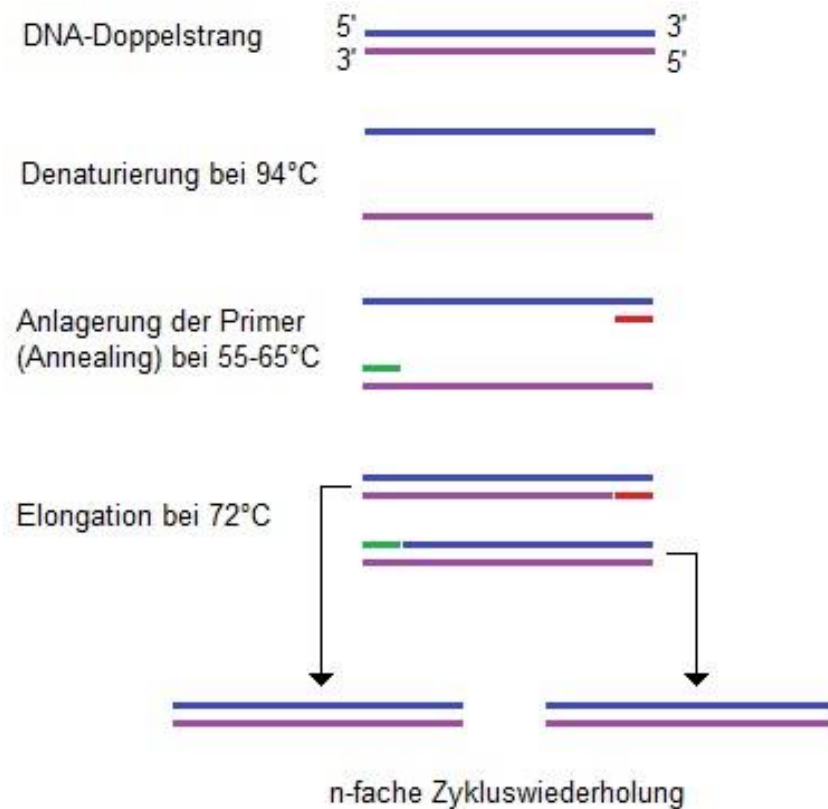


Abbildung 6: Prinzip der Polymerase-Kettenreaktion

### 2.7.3 Reagenzien

Go-Taq PCR Master-Mix	Promega, Mannheim
Primer 10F, 6As, 5S, 9Rev (jew. 10µM)	Invitrogen, Karlsruhe
DNase-/RNase-freies Aqua bidest.	Gibco/Invitrogen, Karlsruhe

### 2.7.4 Materialien und Laborgeräte

Cycler iCycler	Biorad, München
Cycler T-Personal 48	Biometra, Göttingen

### 2.7.5 Durchführung der MUC7 nested-PCR

Bei der spezifischen MUC7 nested-PCR wurde die cDNA aus der Reverse Transkriptase-Reaktion in zwei aufeinander folgenden PCR-Reaktionen amplifiziert. Das für diese Arbeit verwendete Zeit-Temperatur-Protokoll war für die erste und zweite PCR identisch und wird in Tabelle 10 dargestellt. Die Nukleotidsequenzen der spezifischen MUC7 Primer werden in Tabelle 11 dargestellt. Alle Primer wurden

von der Firma Invitrogen (Karlsruhe) synthetisiert. Für den ersten PCR-Ansatz wurden 5µl cDNA (100ng/µl) mit 12,5µl Go-Taq PCR-Master, 2,5µl DNase-/RNase-freiem Aqua bidest. und jeweils 2,5µl 10F-Primer (10µM) und 6As-Primer (10µM) in ein 0,2ml Reaktionsgefäß pipettiert, vorsichtig gemischt und mit einer Tischzentrifuge abzentrifugiert. Das Produkt der ersten PCR bestand aus einem 299 Basenpaare langen DNA-Fragment. Für die anschließende zweite PCR wurden 2,5µl des Produktes aus dem ersten Durchlauf mit 12,5µl Go-Taq PCR-Master, 5µl DNase-/RNase-freiem Aqua bidest. und jeweils 2,5µl 5S-Primer (10µM) und 9Rev-Primer (10µM) in ein 0,2ml Reaktionsgefäß pipettiert und wieder vorsichtig gemischt sowie mit einer Tischzentrifuge abzentrifugiert. Die Länge der PCR-Produkte betrug 299bp aus der ersten und 211bp aus der zweiten PCR.

Schritt	Zyklusanzahl	Denaturierung Zeit / Temperatur	Annealing Zeit / Temperatur	Extension Zeit / Temperatur
1	1	3min / 94°C		
2	1	30sek / 94°C	30sek / 61°C	30sek / 72°C
3	1	30sek / 94°C	30sek / 60°C	30sek / 72°C
4	1	30sek / 94°C	30sek / 59°C	30sek / 72°C
5	1	30sek / 94°C	30sek / 58°C	30sek / 72°C
6	1	30sek / 94°C	30sek / 57°C	30sek / 72°C
7-37	31	30sek / 94°C	30sek / 56°C	30sek / 72°C
38	1	7min / 72°C		
39	1	forever / 10°C		

Tabelle 10: Zeit-Temperaturprofil-Protokoll der spezifischen MUC7 PCR

Primer	Nukleotidsequenz
10F	5'-GCACCAGGAGACATCAGAAAG-3'
6As	5'-GTTTAGGTGGCTGGTGAGGA-3'
5S	5'-CACTGAGTGCTTGCTTCTCG-3'
9Rev	5'-GGGGGGTTATTAGGTGAAGG-3'

Tabelle 11: Nukleotidsequenzen der spezifischen MUC7 Primer

## **2.7.6 Kontrollen für die PCR-Analysen**

### **2.7.6.1 Positivkontrolle**

Als Positivkontrolle für die MUC7 Amplifikation während der MUC7 nested-PCR wurden jeweils 250ng cDNA der Harnblasenkarzinom-Zelllinie T24 parallel zu jedem PCR-Reaktionsansatz amplifiziert, da die T24-Zelllinie eine konstante Genexpression für das MUC7 Gen aufzeigt. Die T24-RNA wurde aus einer Zellsuspension mit T24-Zellen extrahiert, welche im Rahmen der Erstellung einer neuen Zellpassage in der Zellkultur in RNazol (Trizol-Reagent) überführt wurden.

### **2.7.6.2 Negativkontrolle**

Als Negativkontrolle wurden für jeden PCR-Ansatz der MUC7 nested-PCR 500ng cDNA der Zelllinie CHO verwendet, welche keine Genexpression für das MUC7 Gen aufzeigt. Die CHO-RNA wurde aus einer Zellsuspension mit CHO-Zellen extrahiert, die im Rahmen der Erstellung einer neuen Zellpassage in der Zellkultur in RNazol (Trizol-Reagent) überführt wurden. Die Negativkontrolle der Beta-Actin PCR erfolgte mit DNase-/RNase-freiem Aqua bidest, welches die cDNA ersetzte.

## **2.7.7 Sequenzierung der PCR-Produkte**

Um zu verifizieren, dass die Darstellung der PCR-Produkte im Agarosegel tatsächlich einer MUC7 Genexpression entsprach, wurden ausgewählte auf der Laufhöhe von 211 Basenpaaren dargestellte Banden sequenziert. Weitere Banden auf anderen Laufhöhen wurden ebenfalls zur Kontrolle sequenziert. Die Gelbanden wurden zunächst unter UV-Kontrolle mit einem Skalpell aus dem Gel herausgetrennt und die im Gel enthaltenen PCR-Produkte mit Hilfe des QIAGEN Gel-Extraction Kits extrahiert und aufgereinigt. Im Anschluss daran wurden die DNA-Fragmente bakteriell kloniert (TOPO TA Cloning Kit, Invitrogen Karlsruhe). Nach der Überprüfung der Klonierung wurden passende bakterielle Klone ausgewählt und die enthaltene Plasmid-DNA extrahiert. Die Sequenzierung der Proben erfolgte durch die Firma GATC Biotech, Konstanz.



## **2.8 Sensitivität der MUC7 RT-PCR**

### **2.8.1 Zellverdünnungsreihe mit der Zelllinie T24**

Die Sensitivität der MUC7 RT-PCR wurde mit Hilfe von verschiedenen Verdünnungsreihen untersucht. Im Rahmen der Zellverdünnungsreihe wurde die Gesamt-RNA der T24-Zelllinie für verschiedene Zellmengen extrahiert und anschließend 500ng RNA jeder dieser Proben mit der MUC7 nested-PCR amplifiziert. Die eingesetzten Zellmengen betragen dabei: 10.000, 7.500, 5.000, 2.500, 1.000, 500 und 0.

### **2.8.2 cDNA-Verdünnungsreihe mit RNA aus der Zelllinie T24**

Im Rahmen der cDNA-Verdünnungsreihe wurde die aus der Harnblasenkarzinom-Zelllinie T24 extrahierte RNA in Stufen zwischen 500ng bis 0,5ng durch die Reverse Transkriptase-Reaktion in komplementäre DNA umgewandelt und dann mit der MUC7 nested-PCR amplifiziert.

## **2.9 Darstellung der PCR-Produkte**

### **2.9.1 Prinzip der Gelelektrophorese**

Die Gelelektrophorese ist eine häufig angewandte analytische Methode zur Trennung von Molekülen. In dieser Arbeit wurden mit Hilfe der Agarose-Gelelektrophorese verschieden lange DNA-Fragmente getrennt. Das Prinzip dieser Methode basiert auf der Anlage eines elektrischen Feldes an ein Gel mit einer Gelmatrix aus Kohlenhydratmolekülen. Das Gel liegt dabei in einer ionischen Pufferlösung. Die negativ geladene DNA durchwandert die Gelmatrix von der negativ geladenen Kathode in Richtung der positiv geladenen Anode. Kleine Fragmente wandern dabei schneller als größere Fragmente. Das ebenfalls im Gel enthaltene Ethidiumbromid interkaliert die DNA-Fragmente, während diese das Gel durchwandern. Dadurch verändert sich das Absorptionsspektrum der DNA, welche somit später unter UV-Lichteinstrahlung sichtbar gemacht werden kann.

### 2.9.2 Reagenzien

Agarose (UltraPure)	Invitrogen, Karlsruhe
1xTBE-Puffer (Tris-Borat-EDTA-Puffer)	
Laborwasser, dest.	eigene Herstellung
DNA-Ladder Benchtop (100bp)	Promega, Mannheim
Ethidiumbromidlösung (10mg/ml)	Sigma-Aldrich, Hamburg

### 2.9.3 Materialien und Laborgeräte

Gelkammer 40-0911	Peqlab, Erlangen
Gelkammer GNA 200	Amersham Biotech, Sweden
Geltray mit Kämmen	Amersham Biotech, Sweden
Mikrowellenfolie	Toppits, Minden
Mikrowelle NN-5256	Panasonic, Hamburg
Feinwaage	Sartorius, Göttingen
Magnetrührer Ikamag RCT	IKA Labortechnik, Staufen
Gleichstromgenerator EPS 601	Amersham Biotech, Sweden
Molecular Imager ChemiDOC®XRS	Biorad, München

### 2.9.4 Durchführung der Gelelektrophorese

Das Agarose-Gel für die Gelelektrophorese wurde in einer 1,5%igen Konzentration hergestellt, um eine optimale Lauffähigkeit der DNA-Fragmente zu gewährleisten. Dazu wurden 1,5g Agarose pro 100ml 1xTBE-Puffer in einem Erlenmeyerkolben miteinander vermischt, mit einer luftdurchlässigen Folie verschlossen und in einem Mikrowellenherd bis zum Erreichen des Siedepunktes erhitzt. Dann wurde die flüssige Gelmischung mehrmals kurz geschwenkt und erneut erhitzt, bis die Flüssigkeit durchsichtig war und mit bloßem Auge keine Agarosefragmente mehr erkennbar waren. Vor dem Befüllen der Gelkammer wurde das flüssige Gel für 15min zur Abkühlung auf einen Magnetrührer gestellt. Die dann folgenden Arbeitsschritte wurden unter dem Abzug durchgeführt. Zunächst wurde zu je 20ml Agarosegelflüssigkeit 1µl Ethidiumbromidlösung (10mg/ml) hinzupipettiert und untergerührt. Dann wurde die Agarosegelflüssigkeit in eine Gelform gegossen, und mit Gelkämmen versehen, welche bei der Aushärtung des Gels die späteren Geltaschen aussparten. Nach einer Stunde wurde die Gelform mit dem

ausgehärteten Gel aus dem Abzug herausgenommen und in die Gelkammer gestellt. Als Anodenpuffer diente 1xTBE-Puffer, mit welchem die Kammer genau so weit befüllt wurde, dass das Gel mit einer 2-3mm dicken 1xTBE-Pufferschicht überzogen war. Anschließend wurden die Käbme entfernt, wodurch sich die Geltaschen mit TBE-Puffer füllten. Das Beladen der Geltaschen erfolgte immer in der gleichen Reihenfolge: Positivkontrolle, Negativkontrolle, PCR-Proben, DNA-Ladder (100bp). Die Füllmenge betrug 15µl je PCR-Probe, sowie 6µl je DNA-Ladder. Dabei wurde jede Probe mit einer Pipette in die Geltasche eingeführt und am Boden der Geltasche entladen, so dass keine Verunreinigung anderer Taschen erfolgen konnte. Die angelegte Stromspannung betrug 140V, die Stromstärke 350mA. Um eine ausreichende Auflösung der Banden innerhalb des Gels zu gewährleisten, wurde das elektrische Feld für 80min aufrechterhalten. Das Gel wurde anschließend unter UV-Lichtbestrahlung fotografiert, und das Ergebnis sowohl in Druckform als auch in digitaler Form als Bild archiviert.

## **2.10 Auswertung der PCR-Ergebnisse**

Die Auswertung der PCR Ergebnisse erfolgte anhand der Fotografien, auf welchen die unter UV-Licht dargestellten Gelbanden abgebildet waren. Jeder Bande ließ sich mit Hilfe des standardisierten Molekularmarkers (100bp DNA-Ladder) die entsprechende DNA-Fragmentgröße in Basenpaaren zuordnen (Abbildung 7, Beispielbild einer Beta-Actin PCR im Agarosegel). Als Nachweis einer validen Beta-Actin Genamplifikation wurde dabei ein Produkt von 838 Basenpaaren, bei MUC7 ein Produkt von 211 Basenpaaren gewertet. Nur Proben, die einen Beta-Actin Nachweis aufzeigten, wurden in die endgültige Auswertung übernommen. Jede Probe wurde, ausgehend von derselben cDNA, mit Hilfe der spezifischen MUC7 RT-PCR zwei Mal unabhängig voneinander auf eine MUC7 Genexpression hin untersucht. Kam es dabei zu Abweichungen zwischen den beiden Durchläufen, wurde die Probe ein drittes Mal untersucht. Bei mindestens zwei validen Nachweisen einer MUC7 Genexpression wurde die Probe als MUC7 positiv, in allen anderen Fällen als MUC7 negativ gewertet. Die Ergebnisse wurden detailliert in eine für diese Studie erstellte Datenbank eingetragen, damit sie auch in Zukunft für weitere mögliche Auswertungen zur Verfügung stehen. Alle Daten wurden

ebenfalls in eine Excel-Tabelle (Microsoft Office 2007) eingetragen, anhand derer die Auswertungen für diese Arbeit erfolgte.

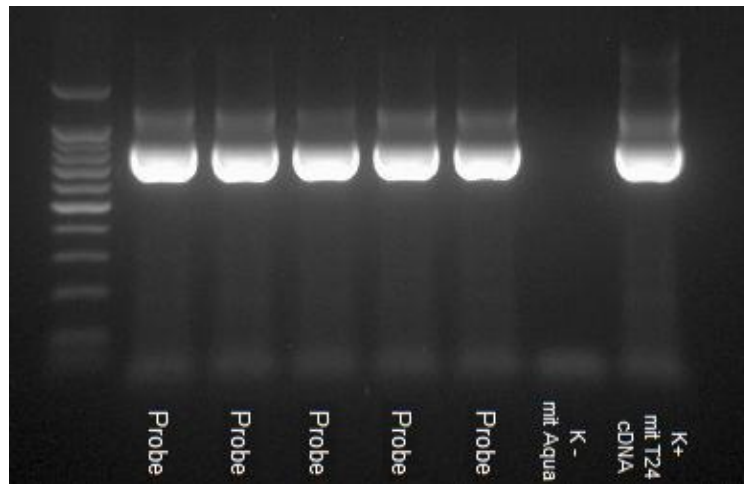


Abbildung 7: Beispielbild einer Beta-Actin PCR

### **3 Ergebnisse**

In dieser Arbeit wurde die Genexpression von MUC7 in Lymphknoten bei Patienten mit lokal fortgeschrittenem Urothelkarzinom der Harnblase, in verschiedenen Zelllinien von Urothelkarzinomen der Harnblase sowie in peripher venösen Blutproben gesunder Probanden untersucht. Die zugrunde liegende Untersuchungsmethode war die spezifische MUC7 Reverse-Transkriptase-PCR. Ziel war dabei die Detektion okkulten Tumorzellen und somit von Mikrometastasen. Das Urothel- und Tumorgewebe der Harnblase (Primärtumor) sowie Teile der untersuchten Lymphknoten wurden vom Pathologischen Institut des Klinikums rechts der Isar der TU München im Hinblick auf die Gewebedignität untersucht. Die Ergebnisse der Laboruntersuchungen wurden im Anschluss mit den Ergebnissen der Pathologie verglichen.

#### **3.1 Sensitivität der MUC7 RT-PCR Methode**

Die Sensitivität der MUC7 RT-PCR Methode wurde durch wiederholte Verdünnungsreihen untersucht. Mindestens vier Wiederholungen wurden für jede Verdünnungsreihe durchgeführt. Die Ergebnisse der Verdünnungsreihen waren reproduzierbar. In der Zellverdünnungsreihe mit Zellen der Harnblasenkarzinom-Zelllinie T24 waren Zellkonzentrationen von mindestens 2500 Zellen für einen positiven Nachweis einer MUC7 Genexpression notwendig (Abbildung 8). In der Verdünnungsreihe mit Gesamt-RNA der Harnblasenkarzinom-Zelllinie T24 war eine Konzentration von mindestens 2,5ng T24-RNA für einen sicheren positiven Nachweis einer MUC7 Genexpression notwendig (Abbildung 9).

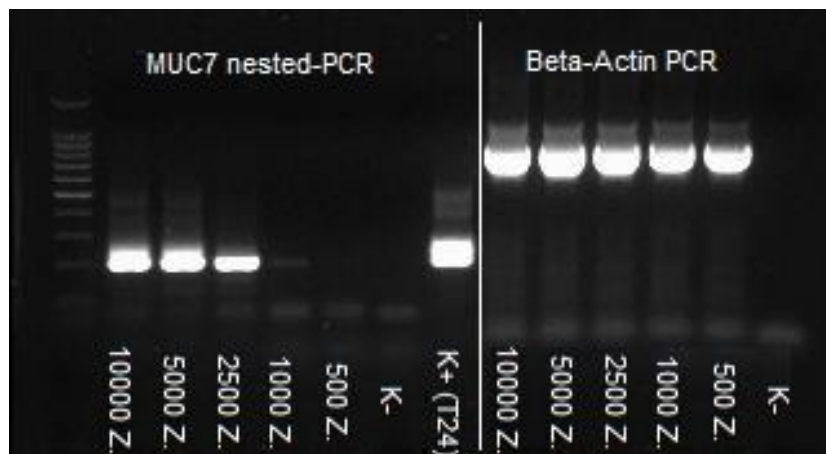


Abbildung 8: Zellverdünnungsreihe (mit Anzahl der Zellen) der T24 Harnblasenkarzinom-Zelllinie

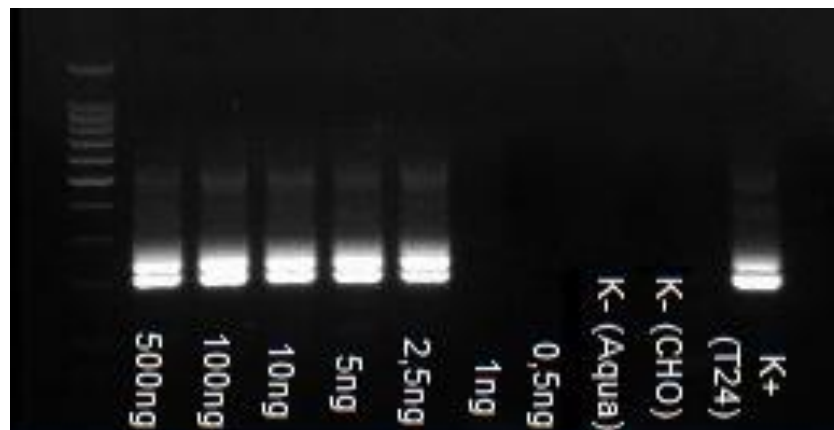


Abbildung 9: Verdünnungsreihe mit Gesamt-RNA (in ng) der Harnblasenkarzinomzelllinie T24

### 3.2 Sequenzierung der PCR-Produkte

Die Sequenzierung ausgewählter Agarosegelbanden erfolgte zur Überprüfung eines validen MUC7 Nachweises. Die Sequenzierung aller Banden mit 211 bp bestätigte die bekannte mRNA-Sequenz von MUC7 aus der Gendatenbank (NCBI Reference Sequence: NM\_001145006.1). Die Sequenzierung weiterer teilweise vorhandener Banden mit Amplifikationsprodukten anderer Basenpaarlängen zeigte Gensequenzen von genomischer DNA (Abbildung 10).

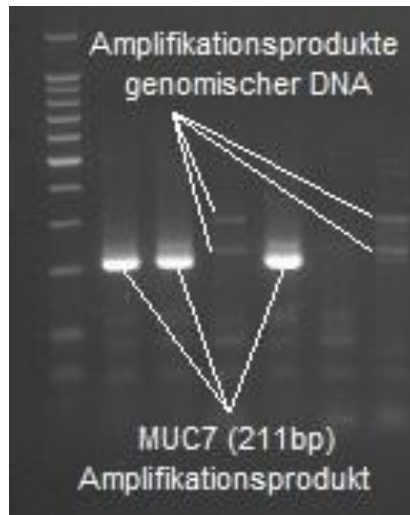


Abbildung 10: Auswahl von PCR-Produkten (Banden) zur Sequenzierung;  
Ergebnis der Sequenzierung

### 3.3 Kontrollen

#### 3.3.1 Überprüfung der Reversen Transkriptase-Reaktion

Die erfolgreiche Durchführung der Reversen Transkriptase-Reaktion wurde durch eine positive Beta-Actin Amplifikation mittels PCR überprüft. Dieser Nachweis gelang bei allen Proben aus Zelllinien (Verdünnungsreihen und Herstellung von Kontrollen für die MUC7 nested-PCR) und bei allen peripher venösen Blutproben gesunder Probanden. Ein positiver Beta-Actin Nachweis gelang bei 790 von 793 Lymphknotenproben inklusive der Lymphknotenteilstücke. Nur Proben mit positivem Beta-Actin Nachweis wurden in die weiteren Untersuchungen eingeschlossen. Als Positivkontrolle für die Beta-Actin PCR wurden grundsätzlich 250ng in cDNA transkribierte T24-RNA mit amplifiziert. Als Negativkontrolle für die Beta-Actin-PCR wurde Aqua bidest. statt Proben-cDNA verwendet. Bei allen Beta-Actin PCR-Durchgängen wiesen die Positivkontrollen eine dem Beta-Actin Amplifikationsprodukt (838bp) entsprechende Bande auf, alle Negativkontrollen waren negativ.

### **3.3.2 Positivkontrollen der MUC7 nested-PCR**

Parallel zu allen MUC7 nested-PCR-Reaktionsansätzen wurden als Positivkontrolle 250ng in cDNA transkribierte RNA der Harnblasenkarzinom-Zelllinie T24 mit amplifiziert, welche eine konstante Genexpression für MUC7 zeigt. Bei allen PCR-Reaktionsansätzen gelang der Nachweis der MUC7 Genexpression in der Positivkontrolle, wodurch das Gelingen der jeweiligen MUC7 nested-PCR bestätigt werden konnte.

### **3.3.3 Negativkontrollen der MUC7 nested-PCR**

Zum Ausschluss von Kontaminationen wurden alle PCR-Reaktionen zusammen mit einer Negativkontrolle durchgeführt. Diese Negativkontrolle enthielt 500ng in cDNA transkribierte CHO-RNA und DNase-/RNase-freies Aqua bidest. anstelle von Proben-RNA. Bei einer der in dieser Arbeit durchgeführten PCR-Reaktionen waren in der Negativkontrolle PCR-Produkte nachweisbar. Dieser Ansatz wurde verworfen und mit neuen Materialien wiederholt. Alle anderen Negativkontrollen zeigten keine Amplifikationsprodukte.

## **3.4 MUC7 Genexpression in Zelllinien und peripher venösen Blutproben gesunder Probanden**

### **3.4.1 Genexpression von MUC7 in Zelllinien**

Die Genexpression von MUC7 wurde in den Harnblasenkarzinom-Zelllinien RT4, RT112, 647-V, J-82 und T24 mit den histopathologischen Differenzierungen zwischen G1 und G3, sowie den Zelllinien CHO und Jurkart überprüft. Dabei wurden jeweils 500ng Gesamt-RNA der jeweiligen Zelllinie eingesetzt. Alle Harnblasenkarzinom-Zelllinien zeigten eine positive MUC7 Genexpression mit einem Amplifikationsprodukt von 211bp. Die Zelllinien CHO und Jurkart zeigten keine Genexpression für MUC7.



### 3.4.2 Genexpression von MUC7 in peripher venösen Blutproben gesunder Probanden

Es wurden die mononukleären Zellen 15 peripher venöser Blutproben gesunder Probanden mit der spezifischen MUC7 RT-PCR auf eine Genexpression von MUC7 untersucht. Bei keiner Blutprobe konnte eine MUC7 Genexpression nachgewiesen werden.

### 3.5 Ausschluss von Proben

Die insgesamt 1583 Lymphknotenproben aller 41 in diese Arbeit eingeschlossenen Patienten wurden im Rahmen der Lymphadenektomie entnommen, welche begleitend zu jeder Zystektomie durchgeführt wurde. Voraussetzung für die Weiterverarbeitung war eine Mindestgröße von 7mm Durchmesser pro Lymphknoten, damit bei der späteren mechanischen Aufarbeitung der Teilstücke genug Material für die RNA-Extraktion zur Verfügung stand. Daher wurden 779 Proben schon während der Operation nicht weiter verarbeitet und direkt im Anschluss an die Zystektomie zur Staging-Untersuchung an das Pathologische Institut des Klinikums rechts der Isar übersandt. Von den übrigen 804 Lymphknotenproben wurden während der späteren Verarbeitung im Labor diejenigen ausgeschlossen, welche mindestens eines der folgenden Merkmale erfüllten (Tabelle 12):

Ausschlusskriterium	Probenanzahl
Weniger als 0,2 µg/µl Gesamt-RNA nach RNA-Extraktion	11
Zweifacher negativer Beta-Actin Nachweis (PCR) nach der RT-Reaktion	3

Tabelle 12: Ausschlusskriterien für Lymphknotenproben

Somit wurden insgesamt 14 Lymphknotenproben ausgeschlossen. Die Auswertung erfolgte anhand der übrigen 790 Lymphknotenproben. Alle Proben, die aus Zelllinien der Zellkultur gewonnen wurden, sowie alle peripher venösen Blutproben, konnten in die Auswertung übernommen werden.

### 3.6 MUC7 Genexpression in Lymphknotengewebe

Wie unter Punkt 2.10 beschrieben, wurde jede Lymphknotenprobe bei der spezifischen MUC7 nested-PCR zweimal unabhängig voneinander untersucht. Bei Abweichungen im Ergebnis wurde ein dritter Durchgang durchgeführt. Bei mindestens zwei positiven Nachweisen einer MUC7 Genexpression wurde die Probe als positiv gewertet. Die Häufigkeitsverteilung der Ergebnisse der MUC7 nested-PCR aller Lymphknotenproben ist Tabelle 13 zu entnehmen.

Ergebnis	Ergebnisse der MUC7 nested-PCR	Lymphknotenanzahl
positiv	positiv / positiv	316
	positiv / negativ / positiv	118
negativ	positiv / negativ / negativ	126
	negativ / negativ	230

Tabelle 13: Häufigkeitsverteilung der Ergebnisse der MUC7 nested-PCR aller Lymphknotenproben

546 der 790 Lymphknotenproben wurden durch die MUC7 nested PCR eindeutig als positiv oder negativ klassifiziert, was einem Anteil von 69% entspricht. 244 Lymphknotenproben (31%) konnten in den ersten zwei Durchgängen der PCR nicht eindeutig zugeordnet werden und wurden deshalb ein drittes Mal untersucht. Abbildung 11 zeigt eine repräsentative Darstellung der spezifischen MUC7 nested-PCR mit einem Amplifikationsprodukt von 211 bp. Als Negativkontrolle wurde die Proben-cDNA durch DNase-/RNase-freies Aqua bidest. mit 500ng CHO-cDNA ersetzt. Als Positivkontrolle dienten 250ng T24-cDNA.

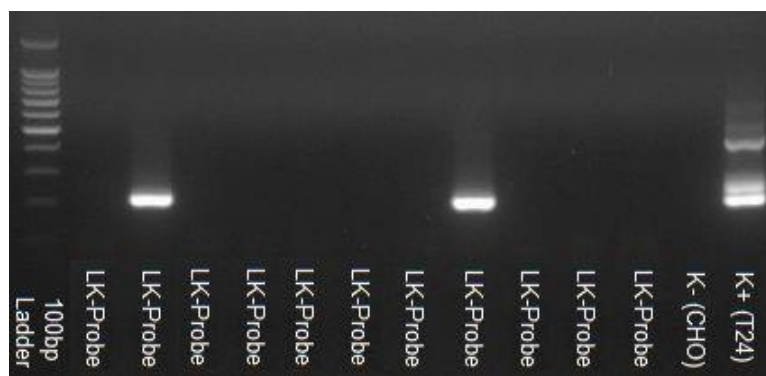


Abbildung 11: Repräsentative Darstellung der spezifischen MUC7 nested-PCR bei 11 Lymphknotenproben

### **3.6.1 Charakteristika des Patientenkollektivs**

Das untersuchte Patientenkollektiv dieser Arbeit bestand aus 41 Patienten, welche vor der Operation randomisiert wurden. 21 Patienten wurden der Gruppe "ausgedehntes Feld" zugeordnet und Lymphknoten aus allen 14 Lymphadenektomiefeldern (Punkt 2.3.2) entnommen und untersucht. Die anderen 20 Patienten wurden der Gruppe "eingeschränktes Feld" zugeordnet, wobei nur Lymphknoten aus den Feldern 5, 7, 9, 11, 13 und 14 (Punkt 2.3.2) entnommen und untersucht wurden. Der Zeitraum der Probenentnahme begann im Mai 2007 und endete im Juli 2008. Unter den Patienten waren 33 Männer und acht Frauen. Das Durchschnittsalter zum Zeitpunkt der Operation betrug 67,2 Jahre (40-84 Jahre). Im Rahmen der Lymphadenektomie wurden insgesamt 1583 Lymphknoten entnommen. Einige Lymphknoten mussten aufgrund ihrer Größe in mehrere Teilstücke von bis zu 1cm Durchmesser pro Stück aufgeteilt werden. Jedes Teilstück wurde bei der Auswertung als einzelne Probe betrachtet und ebenso behandelt. Die Genexpression von MUC7 wurde nach dem Ausschluss ungeeigneter Proben (Punkt 3.5) bei insgesamt 790 Lymphknotenproben untersucht (Tabelle 14). Im Durchschnitt wurden somit bei jeder Lymphadenektomie 19,3 Lymphknoten entfernt, welche später auch für die weitere Untersuchung im Hinblick auf eine MUC7 Genexpression geeignet waren.

Patient	Anzahl LKs	Patient	Anzahl LKs	Patient	Anzahl LKs
1	14	15 (eg)	8	29	42
2 (eg)	11	16	10	30 (eg)	17
3	25	17	16	31	27
4 (eg)	12	18 (eg)	10	32	21
5 (eg)	13	19	40	33	18
6 (eg)	9	20 (eg)	18	34 (eg)	13
7	21	21	8	35 (eg)	14
8 (eg)	11	22 (eg)	20	36 (eg)	25
9	21	23	31	37 (eg)	10
10	23	24 (eg)	13	38	15
11	42	25	19	39	19
12	22	26 (eg)	21	40	19
13 (eg)	9	27	39	41 (eg)	25
14 (eg)	15	28 (eg)	24		

Tabelle 14: Patientennummer (eg = eingeschränkte Lymphadenektomie)  
und Anzahl der untersuchten Lymphknoten (inkl. Teilstücke)

Die detaillierten Charakteristika des Patientenkollektivs sind in Tabelle 15 dargestellt. Die Tabelle beinhaltet neben der Patientennummer das Patientenalter, das Geschlecht sowie die genaue UICC-Klassifikation (von 2002) des Harnblasenkarzinoms bei Erstdiagnose des Urothelkarzinoms mit Angabe von T-, N-, M- und G-Stadium.

Pat.	Alter und Geschlecht	UICC-Klassifikation				Pat.	Alter und Geschlecht	UICC-Klassifikation			
		T	N	M	G			T	N	M	G
1	80 – m	3a	0	0	3	22	41 – m	2a, Cis	0	0	3
2	77 – m	2	0	0	3	23	66 – m	1, Cis	0	0	3
3	61 – m	3a	2	0	3	24	81 – m	4a, Cis	0	0	2
4	79 – w	Cis, a	0	0	3	25	78 – m	1	0	0	3
5	82 – m	3a	0	0	3	26	59 – w	3b	0	0	3
6	73 – m	Cis, a	0	0	3	27	55 – m	3b	0	0	3
7	81 – w	3b	0	0	2	28	84 – m	3a	0	0	3
8	78 – w	Cis, a	0	0	3	29	57 – m	3b	1	0	3
9	64 – m	Cis, a	0	0	2	30	71 – w	2a	0	0	3
10	71 – m	4a	0	0	3	31	73 – m	2a	0	0	1
11	53 – m	2a	0	0	3	32	66 – w	1, Cis	0	0	3
12	65 – w	3b	0	0	3	33	65 – m	2a	0	0	3
13	83 – m	4a, Cis	0	0	3	34	59 – m	1	2	0	3
14	58 – m	2a, Cis	0	0	3	35	57 – m	1	0	0	3
15	71 – m	3a	2	0	3	36	40 – m	Cis	0	0	3
16	76 – m	2a, Cis	0	0	3	37	81 – m	4a	2	0	3
17	84 – m	1, Cis	0	0	3	38	55 – m	1	0	0	3
18	80 – m	3b	1	0	3	39	53 – m	3b	0	0	3
19	70 – w	2a	0	0	3	40	44 – m	2a	0	0	3
20	52 – m	3b, Cis	0	0	3	41	53 – m	3b	2	0	3
21	80 – m	3b	0	0	3						

Tabelle 15: Patientennummer, Alter und Geschlecht,  
UICC-Klassifikation (von 2002) bei Erstdiagnose (mit T, N, M und G)

Bei allen 41 untersuchten Patienten lag das M-Stadium 0 vor, weshalb dieses Stadium bei der Einordnung nicht berücksichtigt wurde.

### 3.6.2 Histopathologische Auswertung der Lymphknotenproben

Die histopathologische Auswertung der pelvinen Lymphknotenproben erfolgte durch das pathologische Institut des Klinikums rechts der Isar der Technischen Universität München. Dabei wurde zwischen einer Lymphknotenprobe ohne Befund und einer Lymphknotenprobe mit Tumorzellen (Mikrometastase) unterschieden. Eine Lymphknotenprobe galt immer dann als positiv, wenn mindestens eines der beiden durch das pathologische Institut untersuchten Stücke (Punkt 2.3.3) als positiv klassifiziert wurde. Bei sechs der 41 Patienten wurden histopathologisch insgesamt 27 Lymphknoten als positiv (Lymphknotenmetastase) klassifiziert. Dies entspricht einem Anteil von 3,4%. Eine Übersicht ist Tabelle 16 zu entnehmen. Bei allen anderen Patienten waren sämtliche Lymphknotenproben histopathologisch unauffällig (pN0).

Pat.-Nr.	Gesamt-LKs	Anzahl histol.-pos. LKs	%	TNMG-Klassifikation
3	25	16	64%	pT3a, pN2, cM0, G3
15	8	2	25%	pT3a, pN2, cM0, G3
29	42	1	2%	pT3b, pN1, cM0, G3
34	13	4	31%	pT1, pN2, cM0, G3
37	10	2	20%	pT4a, pN2, cM0, G3
41	25	2	8%	pT3b, pN2, cM0, G3

Tabelle 16: Patientenummer, Gesamtanzahl der entnommenen Lymphknoten, Anzahl der histopathologisch positiven Lymphknotenproben (alle Zahlen inkl. LK-Teilstücke), prozentualer Anteil, TNMG-Klassifikation

### 3.6.3 Ergebnisse der spezifischen MUC7 nested-PCR der histopathologisch tumorfreien Lymphknoten

Eine detaillierte Übersicht über die Ergebnisse der MUC7 nested-PCR der histopathologisch tumorfreien Lymphknoten ist Tabelle 17 zu entnehmen. Insgesamt wurden 763 als pN0 klassifizierte Lymphknoten untersucht.

<b>Patient</b>									<b>1</b>					
TNMG-Klassifikation									pT3a, pN0, cM0, G3					
Entnommene Lymphknoten insgesamt									14					
Anteil MUC7 positiver Lymphknoten insgesamt (mit %-Anteil)									6			43%		
<b>Feld</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>7</b>	<b>8</b>	<b>9</b>	<b>10</b>	<b>11</b>	<b>12</b>	<b>13</b>	<b>14</b>
Gesamt LKs	-	-	-	3	1	1	2	1	4	-	2	-	-	-
MUC7 pos.				1	0	0	1	0	3		1			
<b>Patient</b>									<b>2</b>					
TNMG-Klassifikation									pT2, pN0, cM0, G3					
Entnommene Lymphknoten insgesamt									11					
Anteil MUC7 positiver Lymphknoten insgesamt (mit %-Anteil)									4			36%		
<b>Feld</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>7</b>	<b>8</b>	<b>9</b>	<b>10</b>	<b>11</b>	<b>12</b>	<b>13</b>	<b>14</b>
Gesamt LKs	-	-	-	-	2	-	4	-	3	-	2	-	-	-
MUC7 pos.					1		2		1		0			
<b>Patient</b>									<b>3</b>					
TNMG-Klassifikation									pT3a, pN2, cM0, G3					
Entnommene Lymphknoten insgesamt									9					
Anteil MUC7 positiver Lymphknoten insgesamt (mit %-Anteil)									6			67%		
<b>Feld</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>7</b>	<b>8</b>	<b>9</b>	<b>10</b>	<b>11</b>	<b>12</b>	<b>13</b>	<b>14</b>
Gesamt LKs	-	-	-	-	2	1	-	-	3	-	2	1	-	-
MUC7 pos.					1	1			3		1	0		
<b>Patient</b>									<b>4</b>					
TNMG-Klassifikation									pTa/Tis, pN0, cM0, G3					
Entnommene Lymphknoten insgesamt									12					
Anteil MUC7 positiver Lymphknoten insgesamt (mit %-Anteil)									6			50%		
<b>Feld</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>7</b>	<b>8</b>	<b>9</b>	<b>10</b>	<b>11</b>	<b>12</b>	<b>13</b>	<b>14</b>
Gesamt LKs	-	-	-	-	-	-	-	-	5	-	7	-	-	-
MUC7 pos.									3		3			

Tabelle 17: Ergebnisse der spezifischen MUC7 RT-PCR der histopathologisch tumorfreien Lymphknoten

<b>Patient</b>									<b>5</b>					
TNMG-Klassifikation									pT3a, pN0, cM0, G3					
Entnommene Lymphknoten insgesamt									13					
Anteil MUC7 positiver Lymphknoten insgesamt ( <i>mit %-Anteil</i> )									9			69%		
<b>Feld</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>7</b>	<b>8</b>	<b>9</b>	<b>10</b>	<b>11</b>	<b>12</b>	<b>13</b>	<b>14</b>
Gesamt LKs	-	-	-	-	4	-	4	-	2	-	3	-	-	-
MUC7 pos.					2		4		1		2			
<b>Patient</b>									<b>6</b>					
TNMG-Klassifikation									pTa/Tis, pN0, cM0, G3					
Entnommene Lymphknoten insgesamt									9					
Anteil MUC7 positiver Lymphknoten insgesamt ( <i>mit %-Anteil</i> )									4			44%		
<b>Feld</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>7</b>	<b>8</b>	<b>9</b>	<b>10</b>	<b>11</b>	<b>12</b>	<b>13</b>	<b>14</b>
Gesamt LKs	-	-	-	-	2	-	1	-	2	-	3	-	-	1
MUC7 pos.					1		0		0		2			1
<b>Patient</b>									<b>7</b>					
TNMG-Klassifikation									pT3b, pN0, cM0, G2					
Entnommene Lymphknoten insgesamt									21					
Anteil MUC7 positiver Lymphknoten insgesamt ( <i>mit %-Anteil</i> )									6			29%		
<b>Feld</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>7</b>	<b>8</b>	<b>9</b>	<b>10</b>	<b>11</b>	<b>12</b>	<b>13</b>	<b>14</b>
Gesamt LKs	-	1	1	-	6	7	3	2	1	-	-	-	-	-
MUC7 pos.		0	0		3	2	0	1	0					
<b>Patient</b>									<b>8</b>					
TNMG-Klassifikation									pTa/Tis, pN0, cM0, G3					
Entnommene Lymphknoten insgesamt									11					
Anteil MUC7 positiver Lymphknoten insgesamt ( <i>mit %-Anteil</i> )									8			73%		
<b>Feld</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>7</b>	<b>8</b>	<b>9</b>	<b>10</b>	<b>11</b>	<b>12</b>	<b>13</b>	<b>14</b>
Gesamt LKs	-	-	-	-	1	-	2	-	1	-	3	-	3	1
MUC7 pos.					1		1		0		3		2	1
<b>Patient</b>									<b>9</b>					
TNMG-Klassifikation									pTa/Tis, pN0, cM0, G2					
Entnommene Lymphknoten insgesamt									21					
Anteil MUC7 positiver Lymphknoten insgesamt ( <i>mit %-Anteil</i> )									12			57%		
<b>Feld</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>7</b>	<b>8</b>	<b>9</b>	<b>10</b>	<b>11</b>	<b>12</b>	<b>13</b>	<b>14</b>
Gesamt LKs	2	-	1	3	3	2	3	-	3	-	3	-	1	-
MUC7 pos.	0		1	0	2	2	1		2		3		1	

Tabelle 17 (Fortsetzung)



<b>Patient</b>									<b>10</b>					
TNMG-Klassifikation									pT4a, pN0, cM0, G3					
Entnommene Lymphknoten insgesamt									23					
Anteil MUC7 positiver Lymphknoten insgesamt ( <i>mit %-Anteil</i> )									5			22%		
<b>Feld</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>7</b>	<b>8</b>	<b>9</b>	<b>10</b>	<b>11</b>	<b>12</b>	<b>13</b>	<b>14</b>
Gesamt LKs	1	1	4	2	2	1	6	-	3	-	2	-	1	-
MUC7 pos.	1	0	1	0	1	0	2		0		0		0	
<b>Patient</b>									<b>11</b>					
TNMG-Klassifikation									pT2a, pN0, cM0, G3					
Entnommene Lymphknoten insgesamt									42					
Anteil MUC7 positiver Lymphknoten insgesamt ( <i>mit %-Anteil</i> )									26			62%		
<b>Feld</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>7</b>	<b>8</b>	<b>9</b>	<b>10</b>	<b>11</b>	<b>12</b>	<b>13</b>	<b>14</b>
Gesamt LKs	1	5	3	4	4	3	4	3	5	1	9	-	-	-
MUC7 pos.	1	0	0	4	2	1	2	3	5	0	8			
<b>Patient</b>									<b>12</b>					
TNMG-Klassifikation									pT3b, pN0, cM0, G3					
Entnommene Lymphknoten insgesamt									22					
Anteil MUC7 positiver Lymphknoten insgesamt ( <i>mit %-Anteil</i> )									17			77%		
<b>Feld</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>7</b>	<b>8</b>	<b>9</b>	<b>10</b>	<b>11</b>	<b>12</b>	<b>13</b>	<b>14</b>
Gesamt LKs	-	-	3	2	3	-	7	-	4	-	3	-	-	-
MUC7 pos.			3	2	2		7		1		2			
<b>Patient</b>									<b>13</b>					
TNMG-Klassifikation									pT4a/pTis, pN0, cM0, G3					
Entnommene Lymphknoten insgesamt									9					
Anteil MUC7 positiver Lymphknoten insgesamt ( <i>mit %-Anteil</i> )									5			56%		
<b>Feld</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>7</b>	<b>8</b>	<b>9</b>	<b>10</b>	<b>11</b>	<b>12</b>	<b>13</b>	<b>14</b>
Gesamt LKs	-	-	-	-	1	-	2	-	2	-	2	-	1	1
MUC7 pos.					1		2		0		2		0	0
<b>Patient</b>									<b>14</b>					
TNMG-Klassifikation									pT2a/pTis, pN0, cM0, G3					
Entnommene Lymphknoten insgesamt									15					
Anteil MUC7 positiver Lymphknoten insgesamt ( <i>mit %-Anteil</i> )									6			40%		
<b>Feld</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>7</b>	<b>8</b>	<b>9</b>	<b>10</b>	<b>11</b>	<b>12</b>	<b>13</b>	<b>14</b>
Gesamt LKs	-	-	-	-	2	-	6	-	1	-	2	-	2	2
MUC7 pos.					2		1		1		0		1	1

Tabelle 17 (Fortsetzung)

<b>Patient</b>									<b>15</b>					
TNMG-Klassifikation									pT3a, pN2, cM0, G3					
Entnommene Lymphknoten insgesamt									6					
Anteil MUC7 positiver Lymphknoten insgesamt ( <i>mit %-Anteil</i> )									3			50%		
<b>Feld</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>7</b>	<b>8</b>	<b>9</b>	<b>10</b>	<b>11</b>	<b>12</b>	<b>13</b>	<b>14</b>
Gesamt LKs	-	-	-	-	2	-	1	-	1	-	2	-	-	-
MUC7 pos.					2		0		0		1			
<b>Patient</b>									<b>16</b>					
TNMG-Klassifikation									pT2a/pTis, pN0, cM0, G3					
Entnommene Lymphknoten insgesamt									10					
Anteil MUC7 positiver Lymphknoten insgesamt ( <i>mit %-Anteil</i> )									2			20%		
<b>Feld</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>7</b>	<b>8</b>	<b>9</b>	<b>10</b>	<b>11</b>	<b>12</b>	<b>13</b>	<b>14</b>
Gesamt LKs	-	2	-	2	1	1	1	-	1	1	1	-	-	-
MUC7 pos.		0		1	0	0	0		1	0	0			
<b>Patient</b>									<b>17</b>					
TNMG-Klassifikation									pT1/pTis, pN0, cM0, G3					
Entnommene Lymphknoten insgesamt									16					
Anteil MUC7 positiver Lymphknoten insgesamt ( <i>mit %-Anteil</i> )									6			38%		
<b>Feld</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>7</b>	<b>8</b>	<b>9</b>	<b>10</b>	<b>11</b>	<b>12</b>	<b>13</b>	<b>14</b>
Gesamt LKs	-	1	2	1	2	2	1	-	1	1	-	3	-	2
MUC7 pos.		0	1	0	1	2	0		1	0		0		1
<b>Patient</b>									<b>18</b>					
TNMG-Klassifikation									pT3b, pN1, cM0, G3					
Entnommene Lymphknoten insgesamt									10					
Anteil MUC7 positiver Lymphknoten insgesamt ( <i>mit %-Anteil</i> )									2			20%		
<b>Feld</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>7</b>	<b>8</b>	<b>9</b>	<b>10</b>	<b>11</b>	<b>12</b>	<b>13</b>	<b>14</b>
Gesamt LKs	-	-	-	-	3	-	3	-	4	-	-	-	-	-
MUC7 pos.					1		0		1					
<b>Patient</b>									<b>19</b>					
TNMG-Klassifikation									pT2a, pN0, cM0, G3					
Entnommene Lymphknoten insgesamt									40					
Anteil MUC7 positiver Lymphknoten insgesamt ( <i>mit %-Anteil</i> )									19			48%		
<b>Feld</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>7</b>	<b>8</b>	<b>9</b>	<b>10</b>	<b>11</b>	<b>12</b>	<b>13</b>	<b>14</b>
Gesamt LKs	2	1	1	4	6	2	1	1	8	3	8	-	2	1
MUC7 pos.	0	0	1	2	2	0	0	0	2	3	7		1	1

Tabelle 17 (Fortsetzung)

<b>Patient</b>									<b>20</b>					
TNMG-Klassifikation									pT3b/pTis, pN0, cM0, G3					
Entnommene Lymphknoten insgesamt									18					
Anteil MUC7 positiver Lymphknoten insgesamt <i>(mit %-Anteil)</i>									10			56%		
<b>Feld</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>7</b>	<b>8</b>	<b>9</b>	<b>10</b>	<b>11</b>	<b>12</b>	<b>13</b>	<b>14</b>
Gesamt LKs	-	-	-	-	8	-	4	-	3	-	1	-	2	-
MUC7 pos.					4		1		3		1		1	
<b>Patient</b>									<b>21</b>					
TNMG-Klassifikation									pT3b, pN0, cM0, G3					
Entnommene Lymphknoten insgesamt									8					
Anteil MUC7 positiver Lymphknoten insgesamt <i>(mit %-Anteil)</i>									1			13%		
<b>Feld</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>7</b>	<b>8</b>	<b>9</b>	<b>10</b>	<b>11</b>	<b>12</b>	<b>13</b>	<b>14</b>
Gesamt LKs	-	-	2	-	3	1	-	-	1	-	1	-	-	-
MUC7 pos.			0		0	1			0		0			
<b>Patient</b>									<b>22</b>					
TNMG-Klassifikation									pT2a/pTis, pN0, cM0, G3					
Entnommene Lymphknoten insgesamt									20					
Anteil MUC7 positiver Lymphknoten insgesamt <i>(mit %-Anteil)</i>									0			0%		
<b>Feld</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>7</b>	<b>8</b>	<b>9</b>	<b>10</b>	<b>11</b>	<b>12</b>	<b>13</b>	<b>14</b>
Gesamt LKs	-	-	-	-	9	-	3	-	4	-	4	-	-	-
MUC7 pos.					0		0		0		0			
<b>Patient</b>									<b>23</b>					
TNMG-Klassifikation									pT1/pTis, pN0, cM0, G3					
Entnommene Lymphknoten insgesamt									31					
Anteil MUC7 positiver Lymphknoten insgesamt <i>(mit %-Anteil)</i>									17			55%		
<b>Feld</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>7</b>	<b>8</b>	<b>9</b>	<b>10</b>	<b>11</b>	<b>12</b>	<b>13</b>	<b>14</b>
Gesamt LKs	3	1	4	4	2	3	3	-	3	-	5	-	3	-
MUC7 pos.	3	1	2	4	1	1	2		1		1		1	
<b>Patient</b>									<b>24</b>					
TNMG-Klassifikation									pT4a/pTis, pN0, cM0, G2					
Entnommene Lymphknoten insgesamt									13					
Anteil MUC7 positiver Lymphknoten insgesamt <i>(mit %-Anteil)</i>									0			0%		
<b>Feld</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>7</b>	<b>8</b>	<b>9</b>	<b>10</b>	<b>11</b>	<b>12</b>	<b>13</b>	<b>14</b>
Gesamt LKs	-	-	-	-	3	-	4	-	3	-	1	-	1	1
MUC7 pos.					0		0		0		0		0	0

Tabelle 17 (Fortsetzung)

<b>Patient</b>									<b>25</b>					
TNMG-Klassifikation									pT1, pN0, cM0, G3					
Entnommene Lymphknoten insgesamt									19					
Anteil MUC7 positiver Lymphknoten insgesamt ( <i>mit %-Anteil</i> )									14			74%		
<b>Feld</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>7</b>	<b>8</b>	<b>9</b>	<b>10</b>	<b>11</b>	<b>12</b>	<b>13</b>	<b>14</b>
Gesamt LKs	-	-	1	1	3	3	3	1	2	1	3	-	1	-
MUC7 pos.			1	0	2	3	2	1	1	0	3		1	
<b>Patient</b>									<b>26</b>					
TNMG-Klassifikation									pT3b, pN0, cM0, G3					
Entnommene Lymphknoten insgesamt									21					
Anteil MUC7 positiver Lymphknoten insgesamt ( <i>mit %-Anteil</i> )									12			57%		
<b>Feld</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>7</b>	<b>8</b>	<b>9</b>	<b>10</b>	<b>11</b>	<b>12</b>	<b>13</b>	<b>14</b>
Gesamt LKs	-	-	-	-	4	-	7	-	5	-	4	-	1	-
MUC7 pos.					2		4		3		3		0	
<b>Patient</b>									<b>27</b>					
TNMG-Klassifikation									pT3b, pN0, cM0, G3					
Entnommene Lymphknoten insgesamt									39					
Anteil MUC7 positiver Lymphknoten insgesamt ( <i>mit %-Anteil</i> )									18			46%		
<b>Feld</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>7</b>	<b>8</b>	<b>9</b>	<b>10</b>	<b>11</b>	<b>12</b>	<b>13</b>	<b>14</b>
Gesamt LKs	3	-	3	5	2	4	3	-	11	-	6	-	1	1
MUC7 pos.	1		1	3	0	3	1		4		4		0	1
<b>Patient</b>									<b>28</b>					
TNMG-Klassifikation									pT3a, pN0, cM0, G3					
Entnommene Lymphknoten insgesamt									24					
Anteil MUC7 positiver Lymphknoten insgesamt ( <i>mit %-Anteil</i> )									14			58%		
<b>Feld</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>7</b>	<b>8</b>	<b>9</b>	<b>10</b>	<b>11</b>	<b>12</b>	<b>13</b>	<b>14</b>
Gesamt LKs	-	-	-	-	6	-	5	-	5	-	4	-	3	1
MUC7 pos.					3		4		3		1		3	0
<b>Patient</b>									<b>29</b>					
TNMG-Klassifikation									pT3b, pN1, cM0, G3					
Entnommene Lymphknoten insgesamt									41					
Anteil MUC7 positiver Lymphknoten insgesamt ( <i>mit %-Anteil</i> )									18			44%		
<b>Feld</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>7</b>	<b>8</b>	<b>9</b>	<b>10</b>	<b>11</b>	<b>12</b>	<b>13</b>	<b>14</b>
Gesamt LKs	-	-	-	1	3	2	5	1	11	-	8	2	4	4
MUC7 pos.				0	0	2	3	0	5		5	1	1	1

Tabelle 17 (Fortsetzung)

<b>Patient</b>									<b>30</b>					
TNMG-Klassifikation									pT2a, pN0, cM0, G3					
Entnommene Lymphknoten insgesamt									17					
Anteil MUC7 positiver Lymphknoten insgesamt ( <i>mit %-Anteil</i> )									13			76%		
<b>Feld</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>7</b>	<b>8</b>	<b>9</b>	<b>10</b>	<b>11</b>	<b>12</b>	<b>13</b>	<b>14</b>
Gesamt LKs	-	-	-	1	5	-	1	-	3	-	4	-	2	1
MUC7 pos.				1	4		1		3		2		1	1
<b>Patient</b>									<b>31</b>					
TNMG-Klassifikation									pT2a, pN0, cM0, G1					
Entnommene Lymphknoten insgesamt									27					
Anteil MUC7 positiver Lymphknoten insgesamt ( <i>mit %-Anteil</i> )									24			89%		
<b>Feld</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>7</b>	<b>8</b>	<b>9</b>	<b>10</b>	<b>11</b>	<b>12</b>	<b>13</b>	<b>14</b>
Gesamt LKs	1	-	2	2	3	1	2	1	6	-	5	1	2	1
MUC7 pos.	1		2	1	3	1	2	1	5		4	1	2	1
<b>Patient</b>									<b>32</b>					
TNMG-Klassifikation									pT1/pTis, pN0, cM0, G3					
Entnommene Lymphknoten insgesamt									21					
Anteil MUC7 positiver Lymphknoten insgesamt ( <i>mit %-Anteil</i> )									21			100%		
<b>Feld</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>7</b>	<b>8</b>	<b>9</b>	<b>10</b>	<b>11</b>	<b>12</b>	<b>13</b>	<b>14</b>
Gesamt LKs	-	-	1	2	2	3	2	1	2	2	3	-	2	1
MUC7 pos.			1	2	2	3	2	1	2	2	3		2	1
<b>Patient</b>									<b>33</b>					
TNMG-Klassifikation									pT2a, pN0, cM0, G3					
Entnommene Lymphknoten insgesamt									18					
Anteil MUC7 positiver Lymphknoten insgesamt ( <i>mit %-Anteil</i> )									17			94%		
<b>Feld</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>7</b>	<b>8</b>	<b>9</b>	<b>10</b>	<b>11</b>	<b>12</b>	<b>13</b>	<b>14</b>
Gesamt LKs	2	-	1	2	3	4	1	-	2	-	1	-	1	1
MUC7 pos.	2		1	2	3	4	1		2		1		0	1
<b>Patient</b>									<b>34</b>					
TNMG-Klassifikation									pT1, pN2, cM0, G3					
Entnommene Lymphknoten insgesamt									9					
Anteil MUC7 positiver Lymphknoten insgesamt ( <i>mit %-Anteil</i> )									5			56%		
<b>Feld</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>7</b>	<b>8</b>	<b>9</b>	<b>10</b>	<b>11</b>	<b>12</b>	<b>13</b>	<b>14</b>
Gesamt LKs	-	-	-	-	4	-	-	-	3	-	2	-	-	-
MUC7 pos.					3				1		1			

Tabelle 17 (Fortsetzung)

<b>Patient</b>									<b>35</b>					
TNMG-Klassifikation									pT1, pN0, cM0, G3					
Entnommene Lymphknoten insgesamt									14					
Anteil MUC7 positiver Lymphknoten insgesamt <i>(mit %-Anteil)</i>									11			79%		
<b>Feld</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>7</b>	<b>8</b>	<b>9</b>	<b>10</b>	<b>11</b>	<b>12</b>	<b>13</b>	<b>14</b>
Gesamt LKs	-	-	-	-	1	-	3	-	2	3	3	2	-	-
MUC7 pos.					0		2		2	3	2	2		
<b>Patient</b>									<b>36</b>					
TNMG-Klassifikation									pTis, pN0, cM0, G3					
Entnommene Lymphknoten insgesamt									25					
Anteil MUC7 positiver Lymphknoten insgesamt <i>(mit %-Anteil)</i>									17			68%		
<b>Feld</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>7</b>	<b>8</b>	<b>9</b>	<b>10</b>	<b>11</b>	<b>12</b>	<b>13</b>	<b>14</b>
Gesamt LKs	-	-	-	-	5	-	7	-	5	-	5	-	1	2
MUC7 pos.					4		6		3		2		1	1
<b>Patient</b>									<b>37</b>					
TNMG-Klassifikation									pT4a, pN2, cM0, G3					
Entnommene Lymphknoten insgesamt									8					
Anteil MUC7 positiver Lymphknoten insgesamt <i>(mit %-Anteil)</i>									6			75%		
<b>Feld</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>7</b>	<b>8</b>	<b>9</b>	<b>10</b>	<b>11</b>	<b>12</b>	<b>13</b>	<b>14</b>
Gesamt LKs	-	-	-	-	1	-	1	-	4	-	1	-	-	1
MUC7 pos.					1		0		3		1			1
<b>Patient</b>									<b>38</b>					
TNMG-Klassifikation									pT1, pN0, cM0, G3					
Entnommene Lymphknoten insgesamt									15					
Anteil MUC7 positiver Lymphknoten insgesamt <i>(mit %-Anteil)</i>									10			67%		
<b>Feld</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>7</b>	<b>8</b>	<b>9</b>	<b>10</b>	<b>11</b>	<b>12</b>	<b>13</b>	<b>14</b>
Gesamt LKs	1	-	1	-	2	2	1	-	2	-	4	1	1	-
MUC7 pos.	1		0		1	0	0		2		4	1	1	
<b>Patient</b>									<b>39</b>					
TNMG-Klassifikation									pT3b, pN0, cM0, G3					
Entnommene Lymphknoten insgesamt									19					
Anteil MUC7 positiver Lymphknoten insgesamt <i>(mit %-Anteil)</i>									8			42%		
<b>Feld</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>7</b>	<b>8</b>	<b>9</b>	<b>10</b>	<b>11</b>	<b>12</b>	<b>13</b>	<b>14</b>
Gesamt LKs	2	-	2	1	3	2	3	-	1	-	1	2	1	1
MUC7 pos.	0		1	1	0	1	2		0		1	0	1	1

Tabelle 17 (Fortsetzung)

<b>Patient</b>									<b>40</b>					
TNMG-Klassifikation									pT2a, pN0, cM0, G3					
Entnommene Lymphknoten insgesamt									19					
Anteil MUC7 positiver Lymphknoten insgesamt ( <i>mit %-Anteil</i> )									11			58%		
<b>Feld</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>7</b>	<b>8</b>	<b>9</b>	<b>10</b>	<b>11</b>	<b>12</b>	<b>13</b>	<b>14</b>
Gesamt LKs	-	-	2	2	3	1	6	-	2	1	1	1	-	-
MUC7 pos.			1	1	2	1	3		1	1	0	1		
<b>Patient</b>									<b>41</b>					
TNMG-Klassifikation									pT3b, pN2, cM0, G3					
Entnommene Lymphknoten insgesamt									23					
Anteil MUC7 positiver Lymphknoten insgesamt ( <i>mit %-Anteil</i> )									13			57%		
<b>Feld</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>7</b>	<b>8</b>	<b>9</b>	<b>10</b>	<b>11</b>	<b>12</b>	<b>13</b>	<b>14</b>
Gesamt LKs	-	-	-	-	5	-	5	-	6	-	4	-	1	2
MUC7 pos.					4		2		3		3		1	0

Tabelle 17 (Fortsetzung)

Von den insgesamt 763 histopathologisch tumorfreien Lymphknoten zeigten 412 eine positive MUC7 Genexpression. Dies entspricht einem Anteil von 54,0%. Bei zwei Patienten waren alle untersuchten Lymphknotenproben MUC7 negativ.

### 3.6.4 Vergleich der pT-Klassifikation des Primärtumors mit dem Anteil der histopathologisch tumorfreien Lymphknoten mit positiver MUC7 Genexpression

Ausgehend vom pT-Stadium des Primärtumors kann ganz grundsätzlich zwischen oberflächlichen (pTa, pTis, pT1) und muskelinvasiv wachsenden Tumoren (pT2 - pT4) unterschieden werden. Teilt man das Patientenkollektiv dahingehend auf, ergeben sich die in Tabelle 18 abgebildeten Werte. In den histopathologisch tumorfreien Lymphknotenproben von Patienten mit einem oberflächlichen Tumor wurde öfter eine positive MUC7 Genexpression nachgewiesen, als bei Patienten mit muskelinvasiv wachsenden Tumoren. Patienten mit den Primärtumorstadien pTa, pT2b und pT4b kamen im Patientenkollektiv dieser Arbeit nicht vor.

<b>pT-Stadium</b>	<b>Anzahl Patienten</b>	<b>Anzahl Lymphknoten</b>	<b>MUC7 positiv</b>	<b>(%)</b>
pTa, pTis, pT1	12	203	131	64,5%
pT2 – pT4	29	560	281	50,2%

Tabelle 18: Anteil der histopathologisch tumorfreien Lymphknoten mit positiver MUC7 Genexpression mit Patientenanzahl und Anzahl der Lymphknoten in Bezug auf ein oberflächliches oder muskelinvasives pT-Stadium

Betrachtet man das Carcinoma in situ dabei als präinvasiven Tumor mit deutlicher Progressionsneigung und ordnet es den muskelinvasiven Tumoren hinzu, ergeben sich die in Tabelle 19 dargestellten Werte.

<b>pT-Stadium</b>	<b>Anzahl Patienten</b>	<b>Anzahl Lymphknoten</b>	<b>MUC7 positiv</b>	<b>(%)</b>
pTa, pT1	4	57	40	70,2%
pTis, pT2 – pT4	37	706	372	52,7%

Tabelle 19: Anteil der histopathologisch tumorfreien Lymphknoten mit positiver MUC7 Genexpression mit Patientenanzahl und Anzahl der Lymphknoten in Bezug auf ein oberflächliches oder muskelinvasives pT-Stadium (inkl. pTis)

Einzel betrachtet können neun verschiedenen pT-Stadien unterschieden werden (Tabelle 20). Lagen bei einem Patienten mehrere Stadien vor, galt für die Einteilung immer das höchste Stadium.

<b>pT-Klassifikation</b>		
pTa	pT2a	pT3b
pTis	pT2b	pT4a
pT1	pT3a	pT4b

Tabelle 20: pT-Klassifikation des Harnblasenkarzinoms nach UICC 2002

Die nachfolgende Tabelle (Tabelle 21) beinhaltet die Übersicht über die TNMG-Klassifikationen der Patienten, sowie den Anteil der histopathologisch tumorfreien Lymphknoten mit positiver MUC7 Genexpression des jeweiligen Patienten.



Patient	TNMG-Klassifikation	Gesamt LKs	MUC7 positiv	Anteil der MUC7 positiven LKs
1	pT3a, pN0, cM0, G3	14	6	43%
2	pT2a, pN0, cM0, G3	11	4	36%
3	pT3a, pN2, cM0, G3	9	6	67%
4	pT1a/Tis, pN0, cM0, G3	12	6	50%
5	pT3a, pN0, cM0, G3	13	9	69%
6	pT1a/Tis, pN0, cM0, G3	9	4	44%
7	pT3b, pN0, cM0, G2	21	6	29%
8	pT1a/Tis, pN0, cM0, G3	11	8	73%
9	pT1a/Tis, pN0, cM0, G2	21	12	57%
10	pT4a, pN0, cM0, G3	23	5	22%
11	pT2a, pN0, cM0, G3	42	26	62%
12	pT3b, pN0, cM0, G3	22	17	77%
13	pT4a/pTis, pN0, cM0, G3	9	5	56%
14	pT2a/pTis, pN0, cM0, G3	15	6	40%
15	pT3a, pN2, cM0, G3	6	3	50%
16	pT2a/pTis, pN0, cM0, G3	10	2	20%
17	pT1/pTis, pN0, cM0, G3	16	6	38%
18	pT3b, pN1, cM0, G3	10	2	20%
19	pT2a, pN0, cM0, G3	40	19	48%
20	pT3b/pTis, pN0, cM0, G3	18	10	56%
21	pT3b, pN0, cM0, G3	8	1	13%
22	pT2a/pTis, pN0, cM0, G3	20	0	0%
23	pT1/pTis, pN0, cM0, G3	31	17	55%
24	pT4a/pTis, pN0, cM0, G2	13	0	0%
25	pT1, pN0, cM0, G3	19	14	74%
26	pT3b, pN0, cM0, G3	21	12	57%
27	pT3b, pN0, cM0, G3	39	18	46%
28	pT3a, pN0, cM0, G3	24	14	58%
29	pT3b, pN1, cM0, G3	41	18	44%
30	pT2a, pN0, cM0, G3	17	13	76%
31	pT2a, pN0, cM0, G1	27	24	89%
32	pT1/pTis, pN0, cM0, G3	21	21	100%
33	pT2a, pN0, cM0, G3	18	17	94%
34	pT1, pN2, cM0, G3	9	5	56%
35	pT1, pN0, cM0, G3	14	11	79%
36	pTis, pN0, cM0, G3	25	17	68%
37	pT4a, pN2, cM0, G3	8	6	75%
38	pT1, pN0, cM0, G3	15	10	67%
39	pT3b, pN0, cM0, G3	19	8	42%
40	pT2a, pN0, cM0, G3	19	11	58%
41	pT3b, pN2, cM0, G3	23	13	57%

Tabelle 21: Übersicht über TNMG-Klassifikation die Anzahl und den Anteil der histopathologisch tumorfreen, MUC7 positiven Lymphknoten in der MUC7 nested-PCR

Die Häufigkeitsverteilung der histopathologisch tumorfreien Lymphknotenproben mit nachgewiesener MUC7 Genexpression im Vergleich mit dem pT-Stadium des Primärtumors ist Tabelle 22 zu entnehmen.

<b>pT-Stadium</b>	<b>Anzahl Patienten</b>	<b>Gesamt LKs</b>	<b>MUC7 positiv</b>	<b>Anteil MUC7 pos. Lymphknoten in % (Mittelwert und [Range])</b>
pTa	-	-	-	-
pTis	5	78	47	60,3% [44-73%]
pT1	7	125	84	67,2% [38-100%]
pT2a	10	219	122	55,7% [0-94%]
pT2b	-	-	-	-
pT3a	5	66	38	57,6% [43-69%]
pT3b	10	222	105	47,3% [13-77%]
pT4a	4	53	16	30,2% [0-75%]
pT4b	-	-	-	-

Tabelle 22: Häufigkeitsverteilung der histopathologisch tumorfreien, MUC7 positiven Lymphknoten nach pT-Stadien

Bei Berücksichtigung des N-Stadiums in der TNMG-Klassifikation, wobei alle Patienten mit N>0 einem weiteren Stadium zugeordnet wurden, ergaben sich folgende Ergebnisse, welche Tabelle 23 zu entnehmen sind.

<b>pT-Stadium</b>	<b>Anzahl Patienten</b>	<b>Gesamt LKs</b>	<b>MUC7 positiv</b>	<b>Anteil MUC7 pos. Lymphknoten in % (Mittelwert und [Range])</b>
pTa	-	-	-	-
pTis	5	78	47	60,3% [44-73%]
pT1	6	116	79	68,1% [38-100%]
pT2a	10	219	122	55,7% [0-94%]
pT2b	-	-	-	-
pT3a	3	51	29	56,9% [43-69%]
pT3b	7	148	72	48,6% [13-77%]
pT4a	3	45	10	22,2% [0-56%]
pT4b	-	-	-	-
jedes T mit N>0	7	106	53	50,0% [20-75%]

Tabelle 23: Häufigkeitsverteilung der histopathologisch tumorfreien, MUC7 positiven Lymphknoten nach pT-Stadien bei Berücksichtigung des Stadiums N>0 (jedes T)

Das Stadium "Jedes T mit N>0" bezieht sich hier auf Patienten, bei denen histopathologisch positive Lymphknotenproben in weiteren Gewebeproben entdeckt wurden. Alle Lymphknoten dieser Patienten, welche sowohl von unserer Arbeitsgruppe im Labor als auch von der Pathologie untersucht wurden, waren histopathologisch negativ.

Bei Aufteilung des Patientenkollektivs in zwei Gruppen, je nachdem ob eine ausgedehnte oder eingeschränkte Lymphadenektomie durchgeführt wurde, ergaben sich für die Häufigkeitsverteilung der histopathologisch tumorfreien Lymphknotenproben mit nachgewiesener MUC7 Genexpression im Vergleich mit dem pT-Stadium des Primärtumors die in den Tabellen 24 und 25 dargestellten Ergebnisse:

<b>pT-Stadium</b>	<b>Anzahl Patienten</b>	<b>Gesamt LKs</b>	<b>MUC7 positiv</b>	<b>Anteil MUC7 pos. Lymphknoten in % (Mittelwert und [Range])</b>
pTa	-	-	-	-
pTis	1	21	12	57,1% [57,1%]
pT1	5	102	68	66,7% [38-100%]
pT2a	6	156	99	63,5% [20-94%]
pT2b	-	-	-	-
pT3a	2	23	12	52,2% [43-67%]
pT3b	6	150	68	45,3% [13-77%]
pT4a	1	23	5	21,7% [21,7%]
pT4b	-	-	-	-

Tabelle 24: Häufigkeitsverteilung der histopathologisch tumorfreien, MUC7 positiven Lymphknoten nach pT-Stadien bei ausgedehnter Lymphadenektomie (21 Patienten)

<b>pT-Stadium</b>	<b>Anzahl Patienten</b>	<b>Gesamt LKs</b>	<b>MUC7 positiv</b>	<b>Anteil MUC7 pos. Lymphknoten in % (Mittelwert und [Range])</b>
pTa	-	-	-	-
pTis	4	57	35	61,4% [44-73%]
pT1	2	23	16	69,6% [56-79%]
pT2a	4	63	23	36,5% [0-76%]
pT2b	-	-	-	-
pT3a	3	43	26	60,5% [50-69%]
pT3b	4	72	37	51,4% [20-57%]
pT4a	3	30	11	36,7% [0-75%]
pT4b	-	-	-	-

Tabelle 25: Häufigkeitsverteilung der histopathologisch tumorfreien, MUC7 positiven Lymphknoten nach pT-Stadien bei eingeschränkter Lymphadenektomie (20 Patienten)

Bei Berücksichtigung des N-Stadiums in der TNMG-Klassifikation, wobei alle Patienten mit N>0 einem weiteren Stadium (10) zugeordnet wurden, ergaben sich folgende Ergebnisse, welche den Tabellen 26 und 27 zu entnehmen sind.

<b>pT-Stadium</b>	<b>Anzahl Patienten</b>	<b>Gesamt LKs</b>	<b>MUC7 positiv</b>	<b>Anteil MUC7 pos. Lymphknoten in % (Mittelwert und [Range])</b>
pTa	-	-	-	-
pTis	1	21	12	57,1% [57,1%]
pT1	5	102	68	66,7% [38-100%]
pT2a	6	156	99	63,5% [20-94%]
pT2b	-	-	-	-
pT3a	1	14	6	42,9% [42,9%]
pT3b	5	109	50	45,9% [13-77%]
pT4a	1	23	5	21,7% [21,7%]
pT4b	-	-	-	-
jedes T mit N>0	2	50	24	48,0% [44-67%]

Tabelle 26: Häufigkeitsverteilung der histopathologisch tumorfreien, MUC7 positiven Lymphknoten nach pT-Stadien und bei N>0 (ausgedehnte Lymphadenektomie, 21 Patienten)

pT-Stadium	Anzahl Patienten	Gesamt LKs	MUC7 positiv	Anteil MUC7 pos. Lymphknoten in % (Mittelwert und [Range])
pTa	-	-	-	-
pTis	4	57	35	61,4% [44-73%]
pT1	1	14	11	78,6% [78,6%]
pT2a	4	63	23	36,5% [0-76%]
pT2b	-	-	-	-
pT3a	2	37	23	62,2% [58-69%]
pT3b	3	49	24	49,0% [20-57%]
pT4a	2	22	5	22,7% [0-56%]
pT4b	-	-	-	-
jedes T mit N>0	4	46	27	58,7% [50-75%]

Tabelle 27: Häufigkeitsverteilung der histopathologisch tumorfreien, MUC7 positiven Lymphknoten nach pT-Stadien und bei N>0 (eingeschränkte Lymphadenektomie, 20 Patienten)

Auch hier gilt, dass sich das Stadium 10 "Jedes T mit N>0" auf Patienten bezieht, bei denen histopathologisch positive Lymphknotenproben in weiteren Gewebeproben entdeckt wurden. Alle Lymphknoten dieser Patienten, welche sowohl von unserer Arbeitsgruppe im Labor als auch von der Pathologie untersucht wurden, waren histopathologisch negativ.

### 3.6.5 Vergleich der pT-Klassifikation des Primärtumors mit der MUC7 Genexpression aller Lymphknotenproben

Bei der Aufteilung des Patientenkollektivs in zwei Gruppen mit oberflächlichen (pTa, pTis, pT1) und muskelinvasiv wachsenden Tumoren (pT2 – pT4) kann die Rate der MUC7 Genexpression mit dem Primärtumorstadium verglichen werden. Werden nun unabhängig von der Histologie alle MUC7 positiven Lymphknotenproben betrachtet, ergeben sich im Gegensatz zu Punkt 3.6.4, wo nur die histopathologisch negativen Lymphknoten einbezogen wurden, die in Tabelle 28 dargestellten Werte.

<b>pT-Stadium</b>	<b>Anzahl Patienten</b>	<b>Anzahl Lymphknoten</b>	<b>MUC7 positiv</b>	<b>(%)</b>
pTa, pTis, pT1	12	207	134	64,7%
pT2 – pT4	29	583	301	51,6%

Tabelle 28: Anteil der Lymphknoten mit positiver MUC7 Genexpression mit Patientenanzahl und Anzahl der Lymphknoten in Bezug auf ein oberflächliches oder muskelinvasives pT-Stadium

Betrachtet man auch bei diesem Vergleich das Carcinoma in situ als präinvasiven Tumor mit deutlicher Progressionsneigung und ordnet es den muskelinvasiven Tumoren hinzu, ergeben sich die in Tabelle 29 dargestellten Werte.

<b>pT-Stadium</b>	<b>Anzahl Patienten</b>	<b>Anzahl Lymphknoten</b>	<b>MUC7 positiv</b>	<b>(%)</b>
pTa, pT1	4	61	43	70,5%
pTis, pT2 – pT4	37	729	392	53,8%

Tabelle 29: Anteil der Lymphknoten mit positiver MUC7 Genexpression mit Patientenanzahl und Anzahl der Lymphknoten in Bezug auf ein oberflächliches oder muskelinvasives pT-Stadium (inkl. pTis)

Der Anteil MUC7 positiver Lymphknoten ist somit in allen Fällen in bei den oberflächlich wachsenden Tumoren höher als bei den muskelinvasiven Tumoren.

### 3.6.6 Ergebnisse der spezifischen MUC7 RT-PCR der histopathologisch positiven Lymphknoten

In 27 von 790 untersuchten Lymphknoten wurden histopathologisch Tumorzellen nachgewiesen. Eine detaillierte Übersicht über die Ergebnisse der spezifischen MUC7 RT-PCR der histopathologisch positiven Lymphknoten (Lymphknotenmetastasen) ist Tabelle 30 zu entnehmen.

<b>Patient</b>									<b>3</b>					
TNMG-Klassifikation									pT3a, pN2, cM0, G3					
Entnommene Lymphknoten insgesamt									25					
Histologisch positiv klassifizierte Lymphknoten insgesamt									16					
Anteil MUC7 positiver LKs an den histologisch positiven LKs									13			82%		
<b>Feld</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>7</b>	<b>8</b>	<b>9</b>	<b>10</b>	<b>11</b>	<b>12</b>	<b>13</b>	<b>14</b>
Gesamt LKs	-	-	-	2	5	2	-	2	10	-	2	1	-	1
Histo pos.	-	-	-	2	3	1	-	2	7	-	-	-	-	1
Histo+MUC7 pos.				2	2	1		1	6					1
<b>Patient</b>									<b>15</b>					
TNMG-Klassifikation									pT3a, pN2, cM0, G3					
Entnommene Lymphknoten insgesamt									8					
Histologisch positiv klassifizierte Lymphknoten insgesamt									2					
Anteil MUC7 positiver LKs an den histologisch positiven LKs									2			100%		
<b>Feld</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>7</b>	<b>8</b>	<b>9</b>	<b>10</b>	<b>11</b>	<b>12</b>	<b>13</b>	<b>14</b>
Gesamt LKs	-	-	-	-	3	-	1	-	1	-	2	-	1	-
Histo pos.	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	1	-
Histo+MUC7 pos.					1								1	
<b>Patient</b>									<b>29</b>					
TNMG-Klassifikation									pT3b, pN1, cM0, G3					
Entnommene Lymphknoten insgesamt									42					
Histologisch positiv klassifizierte Lymphknoten insgesamt									1					
Anteil MUC7 positiver LKs an den histologisch positiven LKs									1			100%		
<b>Feld</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>7</b>	<b>8</b>	<b>9</b>	<b>10</b>	<b>11</b>	<b>12</b>	<b>13</b>	<b>14</b>
Gesamt LKs	-	-	-	1	3	2	5	1	12	-	8	2	4	4
Histo pos.	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-
Histo+MUC7 pos.									1					

Tabelle 30: Ergebnisse der spezifischen MUC7 RT-PCR der histopathologisch positiven Lymphknoten

<b>Patient</b>									<b>34</b>					
TNMG-Klassifikation									pT1, pN2, cM0, G3					
Entnommene Lymphknoten insgesamt									13					
Histologisch positiv klassifizierte Lymphknoten insgesamt									4					
Anteil MUC7 positiver LKs an den histologisch positiven LKs									3			75%		
<b>Feld</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>7</b>	<b>8</b>	<b>9</b>	<b>10</b>	<b>11</b>	<b>12</b>	<b>13</b>	<b>14</b>
Gesamt LKs	-	-	-	-	6	-	1	-	3	-	2	-	1	-
Histo pos.	-	-	-	-	2	-	1	-	-	-	-	-	1	-
Histo+MUC7 pos.					1		1						1	
<b>Patient</b>									<b>37</b>					
TNMG-Klassifikation									pT4a, pN2, cM0, G3					
Entnommene Lymphknoten insgesamt									10					
Histologisch positiv klassifizierte Lymphknoten insgesamt									2					
Anteil MUC7 positiver LKs an den histologisch positiven LKs									2			100%		
<b>Feld</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>7</b>	<b>8</b>	<b>9</b>	<b>10</b>	<b>11</b>	<b>12</b>	<b>13</b>	<b>14</b>
Gesamt LKs	-	-	-	-	1	-	2	-	5	-	1	-	-	1
Histo pos.	-	-	-	-	-	-	1	-	1	-	-	-	-	-
Histo+MUC7 pos.							1		1					
<b>Patient</b>									<b>41</b>					
TNMG-Klassifikation									pT3b, pN2, cM0, G3					
Entnommene Lymphknoten insgesamt									25					
Histologisch positiv klassifizierte Lymphknoten insgesamt									2					
Anteil MUC7 positiver LKs an den histologisch positiven LKs									2			100%		
<b>Feld</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>7</b>	<b>8</b>	<b>9</b>	<b>10</b>	<b>11</b>	<b>12</b>	<b>13</b>	<b>14</b>
Gesamt LKs	-	-	-	-	5	-	5	-	8	-	4	-	1	2
Histo pos.	-	-	-	-	-	-	-	-	2	-	-	-	-	-
Histo+MUC7 pos.									2					

Tabelle 30 (Fortsetzung)

Die spezifische MUC7 RT-PCR ergab bei 23 der 27 histologisch positiven Lymphknoten ein positives Ergebnis, was einem Anteil von 85,2% entspricht. Bei vier der sechs Patienten mit histopathologisch positiven Lymphknoten waren alle als Lymphknotenmetastasen klassifizierte Proben auch MUC7 positiv.

Die Häufigkeitsverteilung der Ergebnisse der spezifischen MUC7 RT-PCR bei den histologisch als positiv klassifizierten Lymphknoten ist Tabelle 31 zu entnehmen.



Ergebnis	Ergebnisse der MUC7 nested-PCR	Lymphknotenanzahl
positiv	positiv / positiv	11
	positiv / negativ / positiv	12
negativ	positiv / negativ / negativ	2
	negativ / negativ	2

Tabelle 31: Häufigkeitsverteilung der Ergebnisse der MUC7 nested-PCR bei den histologisch als positiv klassifizierten Lymphknoten

Somit zeigten 11 der 27 histologisch positiven Lymphknoten eine MUC7 Genexpression in jeder durchgeführten PCR, was einem Anteil von 40,7% entspricht. Alle anderen histologisch positiven Lymphknoten zeigten in mindestens einem der PCR-Durchgänge keine MUC7 Genexpression.

### 3.7 MUC7 Genexpression in Lymphknoten-Feldern

Die positive MUC7 Genexpression in Lymphknotenproben der einzelnen Lymphknoten-Felder im Gesamten, sowie aufgeteilt nach ausgedehnter und eingeschränkter Lymphadenektomie, ist den folgenden Tabellen und Abbildungen zu entnehmen. Hierbei wurden die histopathologisch positiv und negativ klassifizierten Lymphknoten gemeinsam betrachtet und zusammen ausgewertet. Wird die Unterscheidung zwischen eingeschränkter und ausgedehnter Lymphadenektomie nicht berücksichtigt, ergeben sich für die Verteilung der MUC7 positiven Lymphknoten folgende Zahlen, die Tabelle 32 und Abbildung 12 zu entnehmen sind.

Lymphadenektomie (41 Patienten)														
Entnommene Lymphknoten insgesamt										790				
MUC7 positive Lymphknoten insgesamt										435				
Feld	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Gesamt LKs	18	12	34	44	133	47	122	13	151	13	125	13	39	26
MUC7 pos.	10	1	17	27	68	29	63	8	82	9	77	6	23	15
Anteil in %	56	8	50	61	51	62	52	62	54	69	62	46	59	58

Tabelle 32: MUC7 Genexpression in den Lymphknoten-Feldern

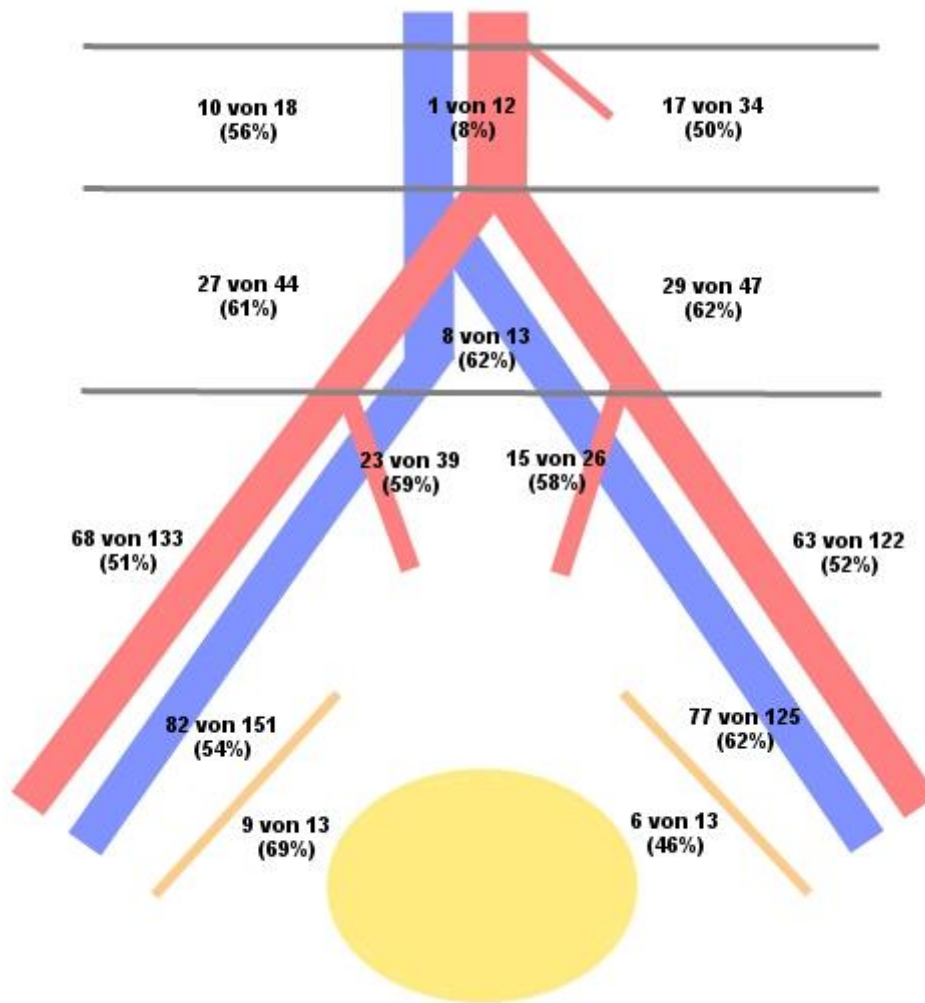


Abbildung 12: Prozentuale Verteilung der MUC7 positiven Lymphknoten des jeweiligen Feldes (790 Proben insgesamt, davon 435 Proben MUC7 positiv)

Ohne Berücksichtigung der Felder 2 und 8, da diese in der Körpermitte liegen, ergibt sich hier für die rechte Körperhälfte (Felder 1, 4, 5, 9, 10, 13) ein prozentualer Anteil von 55,0% MUC7 positiven Lymphknoten. Insgesamt wurden dort 398 Lymphknotenproben entnommen (davon waren 219 Proben MUC7 positiv). Für die linke Körperhälfte (Felder 3, 6, 7, 11, 12, 14) ergibt sich ein prozentualer Anteil von 56,4% MUC7 positiven Lymphknoten. Insgesamt wurden dort 367 Lymphknotenproben entnommen (davon waren 207 Proben MUC7 positiv).

Betrachtet man die Lymphknotenproben nur bei Patienten mit ausgedehnter Lymphadenektomie, ergeben sich folgende in Tabelle 33 und Abbildung 13 dargestellten Werte:

Ausgedehnte Lymphadenektomie (21 Patienten)														
Entnommene Lymphknoten insgesamt										498				
MUC7 positive Lymphknoten insgesamt										284				
Feld	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Gesamt LKs	18	12	34	44	62	47	57	13	84	13	68	13	20	13
MUC7 pos.	10	1	17	27	30	29	31	8	48	9	48	6	11	9
Anteil in %	56	8	50	61	48	62	54	62	57	69	71	46	55	69

Tabelle 33: MUC7 Genexpression in den Lymphknoten-Feldern bei ausgedehnter Lymphadenektomie

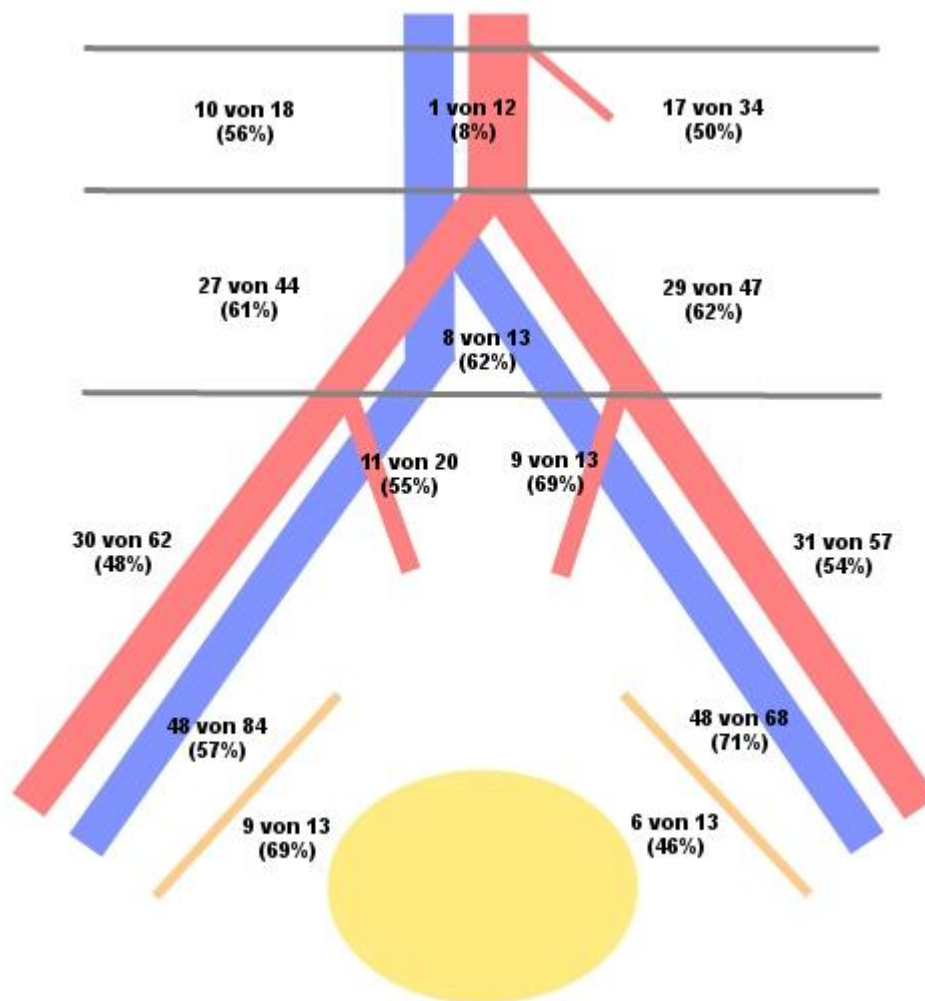


Abbildung 13: Prozentuale Verteilung der MUC7 positiven Lymphknoten des jeweiligen Feldes bei ausgedehnter Lymphadenektomie (498 Proben insgesamt, davon 284 Proben MUC7 positiv)

Betrachtet man die Lymphknotenproben nur bei Patienten mit eingeschränkter Lymphadenektomie, ergeben sich folgende Werte (Tabelle 34, Abbildung 14):

Eingeschränkte Lymphadenektomie (20 Patienten)						
Entnommene Lymphknoten insgesamt						292
MUC7 positive Lymphknoten insgesamt						151
Feld	5	7	9	11	13	14
Gesamt LKs	71	65	67	57	19	13
MUC7 pos.	38	32	34	29	12	6
Anteil in %	54	49	51	51	63	46

Tabelle 34: MUC7 Genexpression in den Lymphknoten-Feldern bei eingeschränkter Lymphadenektomie

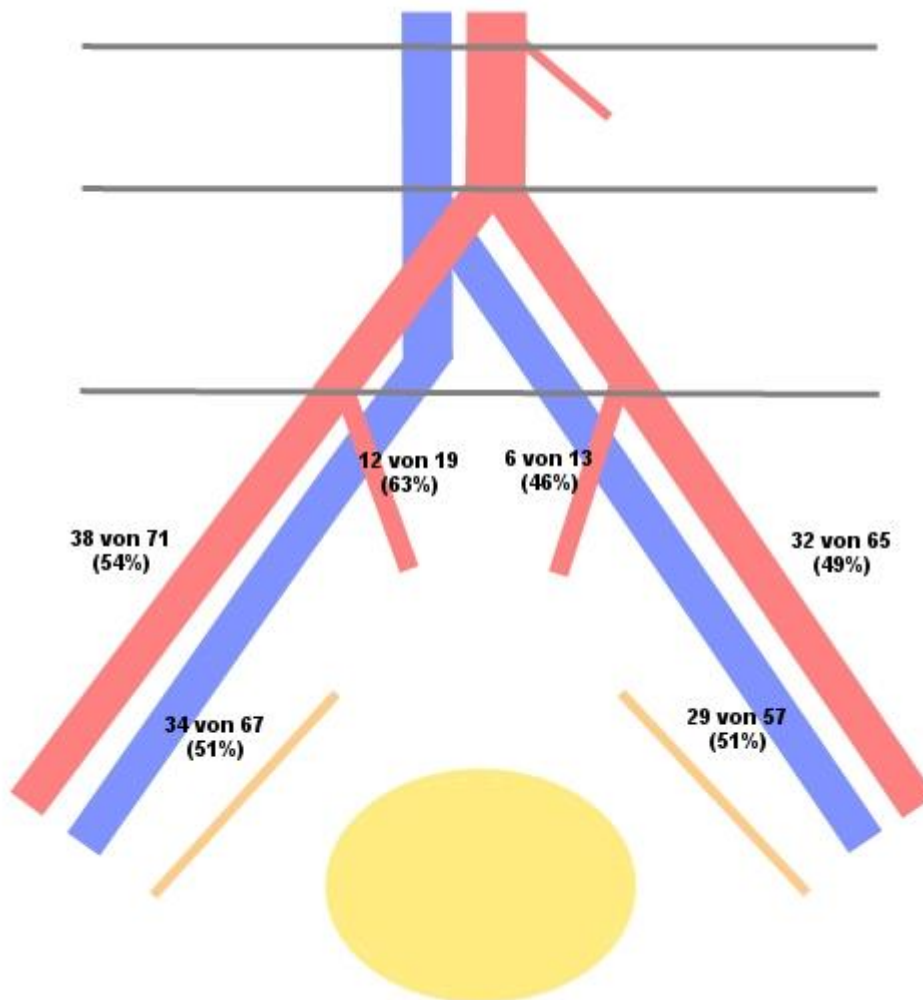


Abbildung 14: Prozentuale Verteilung der MUC7 positiven Lymphknoten des jeweiligen Feldes bei eingeschränkter Lymphadenektomie (292 Proben insgesamt, davon 151 Proben MUC7 positiv)

Der Mittelwert der MUC7 Genexpression in allen 14 Feldern bei ausgedehnter Lymphadenektomie beträgt 57% [Range: 8-71%]. Der Mittelwert der MUC7 Genexpression in allen sechs Feldern bei eingeschränkter Lymphadenektomie beträgt 52% [Range: 46-63%].

Des Weiteren wurde der Anteil der MUC7 positiven Lymphknoten vergleichend zwischen rechter und linker Körperhälfte untersucht. Die ausgedehnte und die eingeschränkte Lymphadenektomie wurden dabei getrennt voneinander betrachtet. Da bei der ausgedehnten Lymphadenektomie die Felder 2 und 8 in der Körpermitte liegen, wurden diese nicht in die Untersuchung mit eingeschlossen.

Bei der ausgedehnten Lymphadenektomie ergibt sich für die rechte Körperhälfte (Felder 1, 4, 5, 9, 10, 13) ein prozentualer Anteil von 56,0% MUC7 positiven Lymphknoten. Insgesamt wurden dort 241 Lymphknotenproben entnommen (davon waren 135 Proben MUC7 positiv). Für die linke Körperhälfte (Felder 3, 6, 7, 11, 12, 14) ergibt sich ein prozentualer Anteil von 60,3% MUC7 positiven Lymphknoten. Insgesamt wurden dort 232 Lymphknotenproben entnommen (davon waren 140 Proben MUC7 positiv). Analog dazu ergibt sich bei der eingeschränkten Lymphadenektomie für die rechte Körperhälfte (Felder 5, 9, 13) ein Anteil von 53,5% MUC7 positiver Lymphknoten. Insgesamt wurden dort 157 Lymphknotenproben entnommen (davon waren 84 Proben MUC7 positiv). Für die linke Körperhälfte (Felder 7, 11, 14) ergibt sich ein Anteil von 49,6% MUC7 positiver Lymphknoten. Insgesamt wurden dort 135 Lymphknotenproben entnommen (davon waren 67 Proben MUC7 positiv).

Betrachtet man die prozentuale Verteilung der 435 MUC7 positiven Lymphknoten bei 790 entnommenen Proben aus allen Feldern, ohne zwischen eingeschränkter und ausgedehnter Lymphadenektomie zu unterscheiden, ergeben sich folgende Zahlen, die Tabelle 35 und Abbildung 15 zu entnehmen sind.

Lymphadenektomie (41 Patienten)														
MUC7 positive Lymphknoten insgesamt										435				
Feld	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
MUC7 pos.	10	1	17	27	68	29	63	8	82	9	77	6	23	15
Anteil in %	2,3	0,2	3,9	6,2	15,6	6,7	14,5	1,8	18,9	2,1	17,7	1,4	5,3	3,5

Tabelle 35: Anteil der MUC7 positiven Lymphknoten des jeweiligen Lymphknotenfeldes

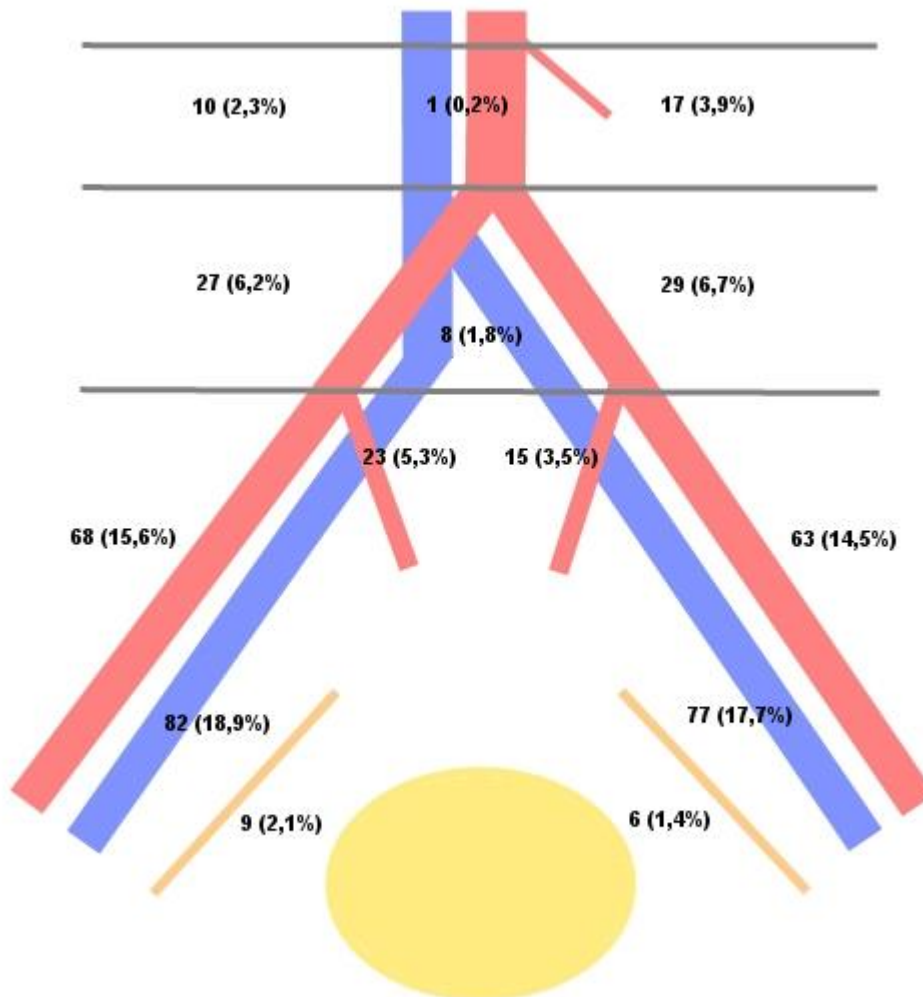


Abbildung 15: Prozentuale Verteilung der MUC7 positiven Lymphknoten des jeweiligen Lymphknotenfeldes (435 MUC7 positive Lymphknoten insgesamt)

### 3.8 Verteilung der histopathologisch positiven Lymphknoten

Betrachtet man den Anteil der histopathologisch positiven Lymphknoten an allen entnommenen Lymphknoten des jeweiligen Lymphknotenfeldes, ohne dabei zwischen eingeschränkter und ausgedehnter Lymphadenektomie zu unterscheiden (aufgrund der geringen Anzahl von 27 Lymphknoten) ergeben sich folgende Zahlen, die Tabelle 36 und Abbildung 16 zu entnehmen sind.

Lymphadenektomie (41 Patienten)														
Entnommene Lymphknoten insgesamt									790					
Histologisch positive Lymphknoten insgesamt									27					
Feld	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Gesamt LKs	18	12	34	44	133	47	122	13	151	13	125	13	39	26
Histo pos.	-	-	-	2	6	1	2	2	11	-	-	-	2	1
Anteil in %	0	0	0	4,5	4,5	2,1	1,6	15,4	7,3	0	0	0	5,1	3,8

Tabelle 36: Histologisch positive Lymphknoten in den einzelnen Lymphknotenfeldern

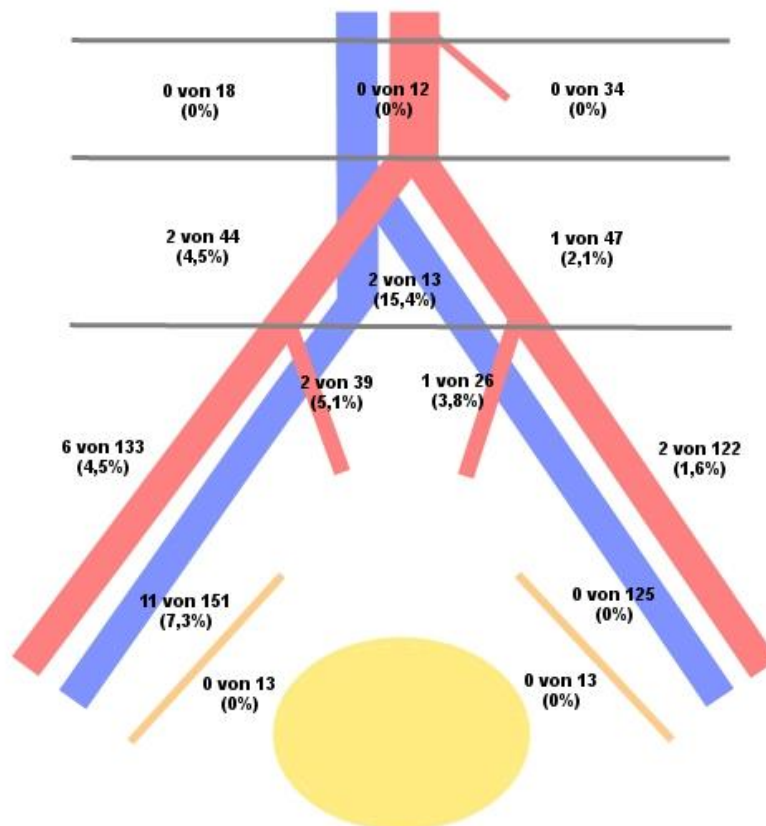


Abbildung 16: Prozentualer Anteil der histologisch positiven Lymphknoten des jeweiligen Feldes (790 Proben insgesamt, davon 27 Proben histologisch positiv)

Die Verteilung der histopathologisch positiven Lymphknoten (27 Stück) der jeweiligen Lymphknotenfelder insgesamt, ohne dabei zwischen eingeschränkter und ausgedehnter Lymphadenektomie zu unterscheiden, ist Tabelle 37 und Abbildung 17 zu entnehmen.

Lymphadenektomie (41 Patienten)														
Histologisch positive Lymphknoten insgesamt										27				
Feld	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Histo pos.	-	-	-	2	6	1	2	2	11	-	-	-	2	1
Anteil in %	0	0	0	7,4	22,2	3,7	7,4	7,4	40,8	0	0	0	7,4	3,7

Tabelle 37: Verteilung der histopathologisch positiven Lymphknoten

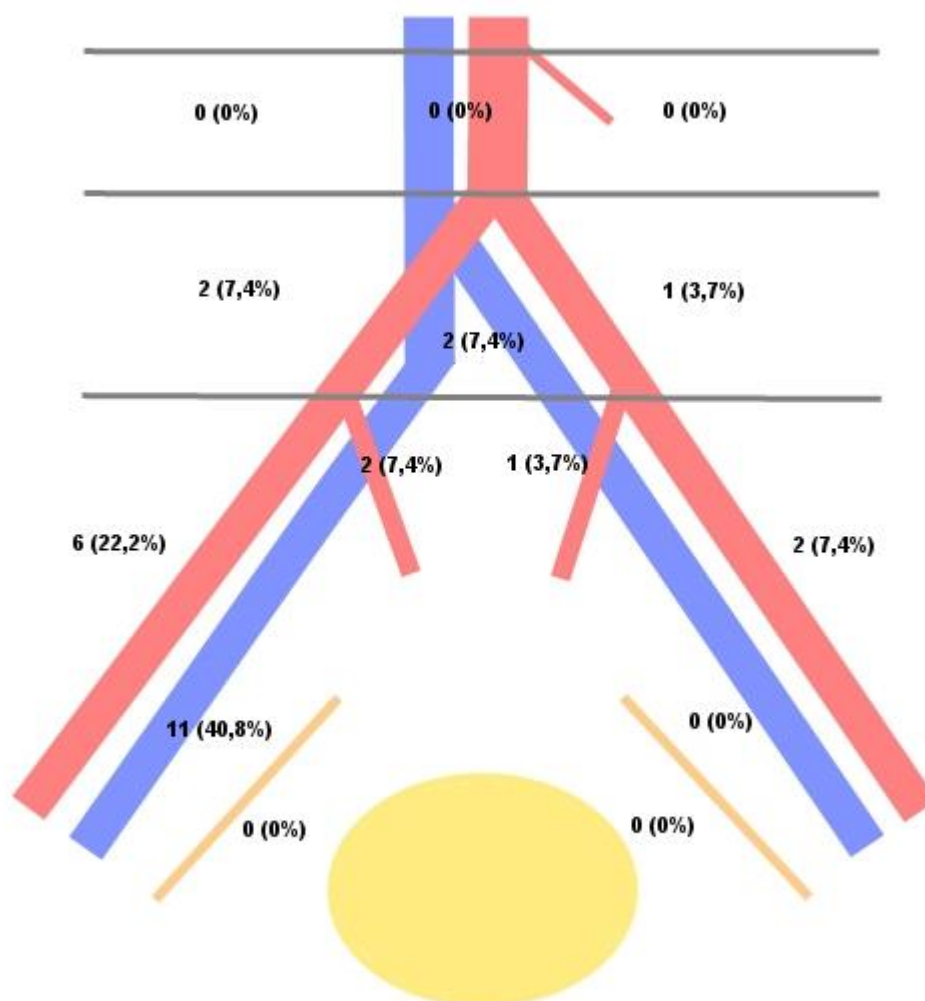


Abbildung 17: Prozentuale Verteilung der histopathologisch positiven Lymphknoten



Damit liegen 22 der 27 histopathologisch positiven Lymphknoten im eingeschränkten Lymphadenektomiefeld, was einem Anteil von 81,5% entspricht. Die restlichen 5 histopathologisch positiven Lymphknoten liegen in den Feldern 4, 6 und 8 des ausgedehnten Lymphadenektomiefeldes, was einem Anteil von 18,5% entspricht. In den Feldern 1, 2, 3, 10, 11 und 12 wurden histopathologisch keine Lymphknotenmetastasen nachgewiesen.

### **3.9 MUC7 Genexpression der histopathologisch tumorfreien Lymphknoten in den Differenzierungsgraden G1-G3**

Der Malignitäts- oder auch Differenzierungsgrad des Primärtumors aller in dieser Arbeit untersuchten Patienten wurde durch das Pathologische Institut des Klinikums rechts der Isar bestimmt. Von insgesamt 41 Patienten wurde bei einem Patient ein Tumor im Differenzierungsstadium G1 diagnostiziert, drei weitere Patienten zeigten Tumore im Stadium G2. Die Primärtumore der restlichen 37 Patienten wurden mit dem Stadium G3 klassifiziert. Die jeweiligen prozentualen Anteile der MUC7 positiven Lymphknoten sind Tabelle 38 zu entnehmen. Es ist anzumerken, dass seit Einführung der neuen WHO-Klassifikation die Malignitätsgrade nicht mehr mit G1-G3, sondern nur noch als 'High Grade' und 'Low Grade' angegeben werden (Eble et al., 2004).

<b>Grading</b>	<b>Anzahl Patienten</b>	<b>Anzahl LKs</b>	<b>MUC7 positiv</b>	<b>in % [Range]</b>
G1	1	27	24	89,0% [89,0%]
G2	3	55	18	32,7% [0-57%]
G3	37	681	370	54,3% [0-100%]

Tabelle 38: MUC7 Genexpression in den Differenzierungsgraden G1 bis G3, mit Anzahl der Patienten, Anzahl der histopathologisch tumorfreien Lymphknoten, Anzahl und Anteil (in %) der MUC7 positiven Lymphknoten

### **3.10 Zusammenfassung der Ergebnisse**

Im ersten Teil der Arbeit wurde in verschiedenen Harnblasenkarzinomzelllinien mit den Differenzierungsgraden G1-G3 eine MUC7 Genexpression nachgewiesen. Die Zelllinien CHO und Jurkat waren MUC7 negativ, ebenso wie alle peripher venösen Blutproben der gesunden Kontrollprobanden. Die Nachweisgrenzen der spezifischen MUC7 RT-PCR lagen bei mindestens 2,5ng Gesamt-RNA von Tumorzellen beziehungsweise einer Minimalanzahl von 2500 Tumorzellen in der untersuchten Probe.

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurden insgesamt 790 Lymphknotenproben von 41 Patienten untersucht. Zum einen wurde jede Probe histopathologisch auf Tumorzellen und somit das Vorliegen von (Mikro-)Metastasen überprüft. Zum anderen wurde jeder Lymphknoten mit der spezifischen MUC7 RT-PCR auf eine MUC7 Genexpression hin analysiert. Insgesamt zeigten 435 Lymphknoten und somit 55,1% aller 790 untersuchten Proben eine positive MUC7 Genexpression. Bei der histopathologischen Untersuchung wurden in 27 der 790 Lymphknoten Tumorzellen nachgewiesen, was einem Anteil von 3,4% entspricht. Von den übrigen 763 histopathologisch tumorfreien Lymphknoten zeigten 412 eine positive MUC7 Genexpression. Dies entspricht einem Anteil von 54,0%. Im direkten Vergleich wurde gegenüber der Histopathologie durch die spezifische MUC7 RT-PCR die ca. 16-fache Menge an Lymphknoten positiv getestet. Von den 27 histopathologisch positiven Lymphknoten waren 23 auch MUC7 positiv. Das entspricht einem Anteil von 85,2% und zeigt gleichzeitig die Sensitivität der in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchung.

Im Vergleich mit dem pT-Stadium des Primärtumors zeigten 64,5% aller Lymphknoten von Patienten mit einem oberflächlichen Harnblasentumor (pTa, pTis, pT1) eine positive MUC7 Genexpression. Im Vergleich dazu zeigten nur 50,2% aller Lymphknoten von Patienten mit muskelinvasiven Harnblasenkarzinomen (pT2 – pT4) eine positive MUC7 Genexpression. Ordnet man das Carcinoma in situ der Gruppe der muskelinvasiven Tumoren zu, zeigten 67,2% aller Lymphknoten von Patienten mit einem oberflächlichen Harnblasentumor (pT1) eine positive MUC7 Genexpression. Im Vergleich dazu

zeigten nur 51,4% aller Lymphknoten von Patienten mit muskelinvasiven Harnblasenkarzinomen (pT2 – pT4) eine positive MUC7 Genexpression.

Der Anteil der MUC7 positiven Lymphknoten in den Lymphadenektomiefeldern, betrug in allen 14 Feldern bei ausgedehnter Lymphadenektomie 57% [Range: 8-71%]. Der Mittelwert der MUC7 Genexpression in allen sechs Feldern bei eingeschränkter Lymphadenektomie betrug 52% [Range: 46-63%].

## 4 Diskussion

Das Ziel unserer Arbeitsgruppe war die Prüfung und Etablierung mehrerer geeigneter epithelialer Tumormarker zur Detektion okkulten Tumorzellen in Lymphknoten bei Harnblasenkarzinompatienten. Solch ein diagnostisches Verfahren, mit deutlich gesteigerter Sensitivität und Spezifität gegenüber den herkömmlichen Methoden würde es erlauben, alle Hochrisikopatienten einfacher und mit einer höheren Trefferquote zu identifizieren, damit diese einer aggressiveren Therapie und engmaschigeren Nachsorge zugeführt werden können, um letztendlich die Prognose des Krankheitsverlaufs zu verbessern. Der in der vorliegenden Arbeit getestete epitheliale Marker war das humane Mucin 7 (MUC7).

Bis heute wurde erst eine Arbeit veröffentlicht, in welcher die MUC7 Genexpression mit der spezifischen MUC7 RT-PCR in normalem und neoplastischem Harnblasengewebe untersucht wurde (Retz et al., 1998). Eine Untersuchung von Lymphknoten bei Patienten mit Harnblasenkarzinom mit der spezifischen MUC7 RT-PCR wurde bis heute ebenfalls nur von der Arbeitsgruppe um Retz untersucht (Retz et al., 2004).

Als Voraussetzung für eine Eignung von MUC7 als epitheliale Tumormarker zur Detektion disseminierter Tumorzellen in Lymphknotengewebe muss gewährleistet sein, dass MUC7 in anderen Geweben wie lymphatischem Gewebe, Bindegewebe, Muskelzellen und Zellen des hämatopoetischen Systems nicht exprimiert wird. Bisher konnte die Expression von MUC7, wie in der Einleitung unter Punkt 1.3.3 beschrieben, in Subpopulationen seröser Drüsen, in den Bronchien, in Pankreasgewebe, in Zellen der Konjunktiva und in Zellen des Gallengangskarzinoms nachgewiesen werden.

Im ersten Teil der Arbeit wurde die MUC7 Genexpression in Zelllinien von Blasenkarzinomen unterschiedlicher Differenzierungsgrade untersucht. Alle Blasenkarzinomzelllinien zeigten dabei eine konstante MUC7 Genexpression. Weiterhin wurden 15 Blutproben gesunder Probanden mit der spezifischen MUC7 RT-PCR untersucht. In keiner dieser untersuchten Proben war eine Genexpression nachweisbar. Diese Daten stimmen mit den bereits erwähnten Ergebnissen der

Arbeitsgruppe um Retz überein. Dort konnte mit der spezifischen MUC7 RT-PCR ebenfalls eine MUC7 Genexpression in Zelllinien von Harnblasenkarzinomen nachgewiesen werden (Retz et al., 1998). Dagegen zeigte keine der untersuchten venösen Blutproben gesunder Probanden einen MUC7 Nachweis (Retz et al., 2004). Die Arbeitsgruppe um Retz konnte weiterhin zeigen, dass MUC7 konstant in invasiv wachsenden Harnblasenkarzinomproben sowie beim Carcinoma in situ der Harnblase nachweisbar ist. Proben von oberflächlich wachsenden Karzinomen sowie von normalem Urothelgewebe zeigten ebenfalls keine MUC7 Genexpression.

Die Arbeitsgruppe um Kinjo konnte zeigen, dass MUC7 in peripher venösen Blutproben von Harnblasenkarzinompatienten nachweisbar ist und mit dem Invasionsstadium des Primärtumors korreliert. Blutproben von Patienten mit Harnwegsinfekten oder anderen nicht-malignen Erkrankungen zeigten keine MUC7 Genexpression (Kinjo et al., 2004).

Vom Gesamtbild der in dieser Arbeit durchgeführten Voruntersuchungen und den in der Literatur beschriebenen Ergebnissen betrachtet, erfüllt MUC7 die Voraussetzungen als potentieller epithelialer Tumormarker. Daher konnte die klinische Anwendung von MUC7 zur Detektion von disseminierten Tumorzellen in Lymphknotengewebe von Patienten mit Urothelkarzinom mit der spezifischen MUC7 RT-PCR getestet werden.

#### **4.1 Sensitivität und Spezifität der Nachweismethode**

Zur Bestimmung der Sensitivität wurden in dieser Arbeit reproduzierbare Verdünnungsreihen mit der Gesamt-RNA der T24 Harnblasenkarzinomzelllinie erstellt. Der Nachweis einer MUC7 Genexpression gelang ab einer Menge von 2,5ng T24-RNA. In der Zellverdünnungsreihe, bei welcher Proben mit verschiedenen Konzentrationen von T24-Zellen erstellt wurden, wurde eine Mindestmenge von 2500 Zellen benötigt, um ein MUC7 Amplifikationsprodukt nachzuweisen. Die Arbeitsgruppe um Kinjo zeigte im Gegensatz dazu eine wesentlich höhere Sensitivität beim Nachweis von MUC7 positiven Zellen. Dort gelang in 1ml Blut der Nachweis bereits ab zwei Zellen, welche das MUC7 Gen exprimierten (Kinjo et al., 2004). In einer Arbeit aus dem Jahr 2004 war eine positive MUC7 Genexpression erst ab einer Gesamt-RNA-Menge von 30ng

erkennbar (Retz et al., 2004). Die Sensitivität der MUC7 RT-PCR in der vorliegenden Arbeit war mit 2,5ng zwölfmal höher, als in der von Retz publizierten Studie. Dadurch lässt sich möglicherweise auch der mit 54% hier wesentlich höhere Anteil der histopathologisch tumorfreien, MUC7 positiven Lymphknoten erklären. In der Arbeit von Retz waren mit 29% nur ungefähr halb so viele der histopathologisch tumorfreien Lymphknoten MUC7 positiv. Dieser Unterschied der Detektionsrate könnte in den unterschiedlichen RT-PCR Versuchsbedingungen begründet liegen. Dies betrifft beispielsweise die Primer-Auswahl oder auch das PCR-Temperatur-Zeitprofil (Retz et al., 2004). Weiterhin bleibt zu bedenken, dass disseminierte Tumorzellen nicht grundsätzlich mit einer Metastasierung gleichzusetzen sind, selbst wenn sie molekularbiologisch detektiert werden können. Tatsächlich führen nur 0,02% aller zirkulierenden Tumorzellen zu einer histologisch nachweisbaren Metastase (Chambers et al., 2002). Die Bedingungen, warum es in mesenchyalem Gewebe zu einer Tumorzellproliferation kommt, sind bis heute noch weitgehend unklar. Analysen an einzelnen Tumorzellen konnten zeigen, dass viele der disseminierten Tumorzellen nicht proliferieren, sondern als ruhende Tumorzellen lange Zeit im Gewebe verharren können (Pantel et al., 1997).

Zur Überprüfung der Spezifität wurden in dieser Arbeit 15 Blutproben von gesunden Probanden untersucht. Keine dieser Proben zeigte eine MUC7 Genexpression. Dieses Resultat stimmt mit den Ergebnissen der bereits erwähnten Arbeiten von Retz und Kinjo überein, in welchen die untersuchten Blutproben gesunder Probanden MUC7 negativ waren (Kinjo et al., 2004, Retz et al., 2004).

#### **4.2 Genexpression von MUC7 in pelvinen Lymphknoten von Patienten mit Urothelkarzinom der Harnblase**

Die Genexpression von MUC7 in pelvinen Lymphknoten von Patienten mit Urothelkarzinom der Harnblase wurde mit der spezifischen MUC7 RT-PCR bei insgesamt 790 Lymphknotenproben von 41 Patienten untersucht.

#### **4.2.1 MUC7 Genexpression der histopathologisch tumorfreien pelvinen Lymphknoten (pN0)**

Von den insgesamt 790 in dieser Arbeit untersuchten Lymphknotenproben waren 763 Proben (96,6%) histopathologisch tumorfrei (pN0). Von diesen 763 Lymphknoten zeigten 412 eine positive MUC7 Genexpression, was einem Anteil von 54,0% entspricht.

Das Patientenkollektiv umfasste zwölf Patienten mit einem oberflächlichen Harnblasenkarzinom, von denen insgesamt 203 Lymphknoten mit der spezifischen MUC7 RT-PCR untersucht wurden. Davon waren 131 Lymphknoten (64,5%) MUC7 positiv. Bei den restlichen 29 Patienten mit einem invasiven Blasenkarzinom wurden insgesamt 560 histopathologisch tumorfreie Lymphknoten mit der spezifischen MUC7 RT-PCR untersucht. Davon waren 281 Lymphknoten (50,2%) MUC7 positiv. Würden Patienten mit einem Carcinoma in situ der Harnblase der Gruppe der Patienten mit muskelinvasiven Tumoren hinzugerechnet werden, würden zu den verbliebenen sieben Patienten mit einem oberflächlichen Harnblasentumor (alle im Stadium pT1) insgesamt 125 Lymphknoten zählen, wovon 84 MUC7 positiv (67,2%) waren. Bei den anderen 34 Patienten mit einem Carcinoma in situ oder einem muskelinvasiven Primärtumor (Stadium pT2a-pT4b) wären von insgesamt 638 Lymphknoten 328 MUC7 positiv (51,4%). Somit war die Detektionsrate von MUC7 bei Patienten mit muskelinvasiven Harnblasentumoren und dem Carcinoma in situ niedriger als bei Patienten mit oberflächlich wachsenden Harnblasentumoren.

Auch unter Einbeziehung der histopathologisch positiven Lymphknoten war die MUC7 Detektionsrate bei den oberflächlich wachsenden Harnblasentumoren grundsätzlich höher als bei den muskelinvasiven Tumoren, auch unabhängig davon zu welcher Gruppe das Primärtumorstadium pTis gerechnet wurde.

Der MUC7 Nachweis in Lymphknotenproben war in dieser Arbeit somit unabhängig vom Tumorstadium (Punkt 3.6.5). Dieses Ergebnis stimmt teilweise mit den Ergebnissen der Arbeitsgruppe um Retz von 1998 überein, in welcher mit Hilfe der spezifischen MUC7 RT-PCR der Nachweis von Tumorzellen in Knochenmarksproben von Harnblasenkarzinompatienten untersucht wurde. Die

MUC7 Detektionsrate stand dabei in keinem Zusammenhang zum Tumorstadium. Im Gegensatz dazu konnte die Arbeitsgruppe um Retz 2004 zeigen, dass MUC7 in nur 18% der histopathologisch tumorfreien Lymphknoten bei Patienten mit oberflächlich wachsendem Harnblasenkarzinomen (pT1 und pTis) nachweisbar war, aber in 32% der Lymphknoten bei Patienten mit invasivem Harnblasenkarzinom (Retz et al., 2004).

Die niedrigste Nachweisrate MUC7 positiver Lymphknoten lag erstaunlicherweise bei den Patienten mit Primärtumoren im Stadium pT4. Eine Erklärung dafür wäre die bei diesen Tumoren mögliche fortgeschrittene Entdifferenzierung des Tumorgewebes und somit der eventuelle Verlust einer MUC7 Genexpression. Eine weitere mögliche Erklärung dieser unerwarteten Ergebnisse wäre die Detektion einer MUC7 Genexpression in Zellen des hämatopoetischen Systems, welche bei jeder Lymphknotenprobe zwangsläufig mit verarbeitet wurden. Während der Aufarbeitung der Lymphknoten im Rahmen der Zystektomie konnte das Lymphknotengewebe zwar vom umliegenden Fett- und Bindegewebe befreit werden, eine vollständige Befreiung von Blut war jedoch nicht möglich. Auch wenn in dieser Arbeit und in anderen bereits erwähnten Studien aus der Literatur gezeigt wurde, dass peripher venöse Blutproben gesunder Probanden keine MUC7 Genexpression aufweisen, galt dies nicht für das Patientenkollektiv dieser Arbeit. Wie bereits erwähnt, konnte die Arbeitsgruppe um Kinjo im Jahr 2004 zeigen, dass MUC7 in peripher venösen Blutproben von Harnblasenkarzinompatienten nachweisbar ist (Kinjo et al., 2004). Es wäre daher denkbar, dass aufgrund einer Kontamination mit Blut und darin enthaltenen zirkulierenden Tumorzellen einige der getesteten Lymphknotenproben eine falsch positive MUC7 Genexpression zeigten.

Neben MUC7 untersuchten die Arbeitsgruppen um Retz 2004 und Ribal 2006 auch andere epitheliale Marker in Lymphknoten von Harnblasenkarzinompatienten. Retz et al. untersuchten die Genexpression von CK20 und MUC2, Ribal et al. die Genexpression von CK20. Die Arbeitsgruppe um Retz konnte in Bezug auf das Humane Muzin 2 (MUC2) zeigen, dass von 217 histopathologisch negativen Lymphknoten zwar 69 Proben eine MUC2 Genexpression aufwiesen (31,8%), dies aber in keinem Zusammenhang zum Tumorstadium stand und auf der anderen Seite bei den 33 histopathologisch als Metastasen klassifizierten Lymphknoten nur



21 (64%) MUC2 positiv waren. Weiterhin wurde der epithelie Marker CK20 untersucht. Dabei zeigten drei der fünf histopathologisch als Metastasen klassifizierten Lymphknoten eine positive CK20 Genexpression. Der zwei anderen Lymphknoten wurden histopathologisch reevaluiert. Dabei zeigte eine der Lymphknotenproben eine Metastase im paranodalen Fettgewebe, die andere Probe aber eine eindeutige Metastase im Lymphknoten selbst. Trotzdem konnte bei diesem Lymphknoten auch eine wiederholte RT-PCR keine CK20 Genexpression nachweisen. Von 151 histopathologisch tumorfreien Lymphknoten zeigten 20 (13,2%) eine positive CK20 Genexpression,

Die Arbeitsgruppe um Ribal konnte zeigen, dass bei 24 von 54 untersuchten Patienten histopathologisch positive Lymphknoten nachweisbar waren, demgegenüber aber 40 von den 54 Patienten eine positive CK20 Genexpression in den untersuchten Lymphknoten aufwiesen. Des Weiteren konnte eine Korrelation zwischen Tumorstadium und der Genexpression von CK20 nachgewiesen werden. Während 20% der Patienten mit einem Primärtumor im Stadium T2 CK20 positive Lymphknoten hatten, waren es bei den Patienten mit muskelinvasivem Primärtumor in den Stadien T3 und T4 80% (Ribal et al., 2006).

Die Arbeitsgruppe um Kinjo konnte zeigen, dass bei Patienten mit einem oberflächlichen Blasen-tumor bei 38% der peripher venösen Blutproben eine positive MUC7 Genexpression auftrat. Bei Patienten mit einem muskelinvasiven Blasen-tumor gelang der MUC7 Nachweis sogar bei 78% aller Blutproben ( $p = 0,042$ ). Ein signifikanter Zusammenhang zwischen der MUC7 Genexpression und jedem einzelnen Tumorstadium war allerdings nicht nachweisbar ( $p > 0,05$ ) (Kinjo et al., 2004).

In Bezug auf das Grading (G1-G3) war die MUC7 Detektionsrate in der hier vorliegenden Arbeit aktuell unabhängig vom jeweiligen Stadium (Punkt 3.9), wobei das Ergebnis für die Stadien G1 und G2 aufgrund der sehr geringen Patientenanzahl und somit geringen Stichprobengröße kritisch betrachtet werden muss. Die große Streubreite der Ergebnisse spricht ebenfalls gegen einen Zusammenhang zwischen Malignitätsgrad und Anteil der MUC7 positiven Lymphknoten. Die Arbeitsgruppe um Kinjo konnte hingegen bei den untersuchten periphervenösen Blutproben einen signifikanten Zusammenhang zwischen dem

Stadium G1 und G3 ( $p = 0,007$ ) sowie dem Stadium G2 und G3 ( $p = 0,025$ ) nachweisen (Kinjo et al., 2004).

#### **4.2.2 MUC7 Genexpression der histopathologisch als Metastasen klassifizierten pelvinen Lymphknoten (pN1, pN2)**

Von den insgesamt 790 in dieser Arbeit untersuchten Lymphknotenproben konnten 27 Proben (3,4%) histopathologisch als Metastase klassifiziert werden. Möglicherweise würde sich dieser Anteil erhöhen, wenn zur histopathologischen Untersuchung Serienschnitte des kompletten Lymphknotens eingesetzt werden würden (Ibcsg, 1990). Von den histopathologisch positiven Lymphknoten zeigten 23 eine positive MUC7 Genexpression. Dies entspricht einem Anteil von 85,2%, welcher somit höher ist als die MUC7 Genexpressionsrate der histopathologisch tumorfreien Lymphknoten mit 54,0%. Diese Ergebnisse stehen den Ergebnissen der Arbeitsgruppe um Retz gegenüber, in der alle fünf histopathologisch als Metastase klassifizierten Lymphknoten auch eine positive MUC7 Genexpression zeigten (100%). Allerdings ist der Stichprobenumfang sehr gering und das Untersuchungsergebnis muss deshalb kritisch betrachtet werden (Retz et al., 2004).

Der Einsatz von MUC7 als geeignetem epithelialen Tumormarker zur Detektion okkulten Tumorzellen in Lymphknoten ist fragwürdig, wenn histopathologisch eindeutig als Metastasen klassifizierte Lymphknoten in der spezifischen MUC7 RT-PCR nicht ebenfalls als positiv identifiziert werden können. Weiterhin zeigten zwölf der 23 molekularbiologisch positiven Lymphknoten in mindestens einem der PCR Durchgänge keine MUC7 Genexpression. Die möglichen Gründe für diese Ergebnisse werden im Folgenden erläutert.

##### **A. Verlust der MUC7 Genexpression bei entdifferenzierten Tumorzellen:**

Entdifferenzierte Tumorzellen können im Vergleich zum normalen Ursprungsgewebe oder auch zu hochdifferenzierten Tumorzellen teilweise ein vollständig verändertes Genexpressionsmuster aufweisen, wie zahlreiche Daten aus der Literatur belegen (Ho et al., 1993, Kim et al., 1996, Reis et al., 1999). Theoretisch könnten diese Veränderungen zu einem Verlust der Genexpression von MUC7 führen. Dies könnte ein Grund für die fehlende MUC7 Genexpression in

vier der histopathologisch positiven Lymphknoten sein. Möglicherweise ist dies auch der Grund für den niedrigen Anteil der MUC7 positiven Lymphknoten bei Patienten mit lokal sehr weit fortgeschrittenen Blasen Tumoren (pT4-Stadium). Gegen diese Argumente spricht, dass im ersten Teil dieser Arbeit alle getesteten Blasenkarzinomzelllinien unabhängig vom Differenzierungsgrad eine konstante MUC7 Genexpression aufwiesen.

#### B. Fokalität der Tumorzellen im Lymphknoten:

Durch die Teilung der untersuchten Lymphknoten ist es möglich, dass nur eine der beiden Lymphknotenhälften eine Tumordinfiltration aufwies und somit nur dieser Teil als Metastase klassifiziert werden konnte. Möglicherweise ist dies der Grund, warum vier der histopathologisch als Metastase klassifizierten Lymphknoten keine MUC7 Genexpression aufwiesen. Eine molekularbiologische Untersuchung des gesamten Lymphknotens wäre daher wünschenswert, wobei aber dann auf eine histopathologische Untersuchung verzichtet werden müsste. Eine mögliche Alternative wäre die RNA-Extraktion von Lymphknotengewebe aus Paraffinblöcken, nachdem im ersten Schritt die konventionelle histopathologische Untersuchung des Lymphknotens durchgeführt wurde. Nachteil dabei ist die erfahrungsgemäß geringere Ausbeute an Gesamt-RNA im Gegensatz zur RNA-Extraktion aus Frischgewebe.

#### C. Punktmutationen im Primerbindungsbereich:

Eine Mutation oder ein Polymorphismus im Bereich der Primerbindungsstelle würde die Amplifikation der cDNA während der PCR verhindern, da eine Hybridisierung der Primer mit der cDNA nur unzureichend stattfinden könnte. Um diese Problem auszuschließen, wäre eine Sequenzanalyse der Primerbindungsstellen auf der Ebene der genomischen DNA eine mögliche Option.

Auch wenn die Ergebnisse dieser Arbeit den Einsatz von MUC7 zur Detektion von Mikrometastasen in Lymphknoten nicht unterstützen, sollte die Methodik an sich weiterhin untersucht und evaluiert werden. Unserer Arbeitsgruppe gelang beispielsweise mit einem anderen epithelialen Marker, dem Cytokeratin 20 (CK20), bei allen histopathologisch als Metastase klassifizierten Lymphknoten auch einen Tumorzellnachweis mit Hilfe der RT-PCR zu erbringen.

### **4.3 Bedeutung der Verteilung der Lymphknotenmikrometastasen**

Im Hinblick auf die Behandlungsstrategie des Harnblasenkarzinoms stellt sich die Frage, ob es die Prognose des Krankheitsverlaufs signifikant verbessert, wenn die begleitende Lymphadenektomie bei der Zystektomie sich nicht auf das Standardlymphadenektomiefeld beschränkt, sondern im erweiterten Lymphadenektomiefeld durchgeführt wird. Ausschlaggebend ist dabei die Verteilung der Lymphknotenmikrometastasen. Zu beachten ist, dass eine Erhöhung der Morbidität bei einer ausgedehnten Lymphadenektomie im Vergleich mit der Standardlymphadenektomie in den bislang dazu publizierten Untersuchungen nicht nachgewiesen werden konnte und somit diese erweiterte chirurgische Therapie selbst zu keiner Prognoseverschlechterung führt (Leissner et al., 2000, Leissner et al., 2004, Steven et al., 2007).

Die bislang publizierten Untersuchungen in Bezug auf die Größe des Lymphadenektomiefeldes bei der Zystektomie wurden retrospektiv und ohne Vergleichsgruppe erhoben. Dennoch zeigte sich in jeder dieser Erhebungen ein deutlicher Überlebensvorteil für die Patientengruppe mit ausgedehnter Lymphadenektomie (Leissner et al., 2004, Dhar et al., 2008). Dabei ist noch unklar, ob für dieses Phänomen die Entfernung nicht entdeckter Lymphknotenmetastasen eine Rolle spielt oder ob es durch eine Stadien-Migration (Will-Rogers-Effekt) zu einer vermeintlichen Überlebensverbesserung kommt, wenn Patienten durch mehr entdeckte Lymphknotenmetastasen einer anderen Prognosegruppe und somit möglicherweise effektiveren Therapie zugeführt werden.

Die LEA-Studie der Arbeitsgemeinschaft Urologische Onkologie der deutschen Krebsgesellschaft, in deren Rahmen unter anderem diese Arbeit entstand, untersucht erstmals prospektiv und randomisiert Zystektomiepatienten, im Hinblick auf die progressionsfreie Überlebenszeit in Abhängigkeit von der Ausdehnung des Lymphadenektomiegebietes (eingeschränkte versus ausgedehnte Lymphadenektomie).

In dieser Arbeit weist die Verteilung der histopathologisch nachgewiesenen Lymphknotenmetastasen deutliche Unterschiede im Vergleich mit der Verteilung der MUC7 Genexpression aller untersuchten Proben auf. Der Großteil der

histopathologisch nachgewiesenen Lymphknotenmetastasen lag mit 81,5% im eingeschränkten Lymphadenektomiegebiet (Felder 5, 7, 9, 11, 13, 14). Es konnten weiterhin keine Lymphknotenmetastasen oberhalb der Iliacabifurkation sowie in den tiefen obturatorischen Gruppen nachgewiesen werden (Abb. 17, Seite 83). Der Nachweis einer MUC7 Genexpression in den Lymphknoten als möglicher Nachweis einer vorliegenden Mikrometastasierung gelang demgegenüber in Proben aus allen 14 Lymphknotenfeldern. Im Durchschnitt waren in jedem Feld 57,1% der untersuchten Lymphknoten MUC7 positiv [Range: 46-69%]. Einzige Ausnahme bildete dabei das Lymphknotenfeld 2 (interaortocavale Gruppe), wo nur 8% der dort entnommenen Proben eine MUC7 Genexpression aufwiesen (Abb. 12, Seite 77).

Ein Vergleich mit anderen Arbeiten zur Lokalisation von Mikrometastasen in Lymphknoten ist schwierig, da es kein einheitliches Schema gibt, nach welcher die Lymphknoten exakten topographischen Feldern zugeordnet werden. Die in dieser Arbeit verwendete Einteilung der Felder nach der Schema der LEA-Studie findet sich in ähnlicher Form nur in den Arbeiten von Leissner (Leissner, 2005) und Jensen (Jensen et al., 2010).

Ein signifikanter Unterschied in der Detektionsrate von MUC7 positiven Lymphknoten zwischen dem ausgedehnten (284 von 498 Lymphknoten = 57%) und eingeschränkten (151 von 292 Lymphknoten = 52%) Lymphadenektomiefeld konnte in dieser Arbeit nicht nachgewiesen werden. Die Arbeitsgruppe um Seiler konnte ebenfalls keinen signifikanten Zusammenhang zwischen histopathologischem Befund und Entnahmeort von Lymphknoten feststellen (Seiler et al., 2010).

Ein signifikanter Unterschied in der Verteilung der MUC7 Genexpression zwischen der linken und der rechten Körperhälfte konnte mit dieser Arbeit nicht nachgewiesen werden. Auf der rechten Seite wurden insgesamt 398 Lymphknoten entnommen, von denen 219 MUC7 positiv waren (55%). Auf der linken Seite wurden insgesamt 367 Lymphknoten entnommen, von denen 207 MUC7 positiv waren (56,4%). Die in der Mitte liegenden Felder 2 und 8 wurden für den Seitenvergleich nicht berücksichtigt. Auch andere Arbeiten fanden keinen Hinweis darauf, dass Metastasen bevorzugt eine Körperseite befallen. Allein Leissner konnte zeigen, dass je nach Lokalisation des Primärtumors ein bestimmter

Metastasierungsweg erfolgt, wobei dies für die rechte und linke Körperhälfte gleichermaßen gilt (Leissner, 2005).

Einzig die Unterscheidung zwischen histopathologischer Detektionsrate von Mikrometastasen und der MUC7 Genexpressionsrate der untersuchten Lymphknoten zeigte in dieser Arbeit einen signifikanten Unterschied. Während von 790 untersuchten Lymphknoten 27 histopathologisch positiv waren (3,4%), waren 435 Lymphknoten MUC7 positiv (55%). Dies ist aber nicht weiter verwunderlich, da eine nested RT-PCR ein hochsensitives Verfahren ist, mit welchem bereits minimalste Mengen eines amplifizierten Gens nachgewiesen werden können.

Wenn zukünftige Untersuchungen die Eignung von MUC7 als prognostischem epithelalem Tumormarker zeigen, würden die Ergebnisse dieser Arbeit dafür sprechen, im Rahmen des chirurgischen Behandlungskonzeptes des Harnblasenkarzinoms, die ausgedehnte Lymphadenektomie durchzuführen, da die Detektionsrate von MUC7 in den Feldern der ausgedehnten Lymphadenektomie ähnlich hoch war wie in den Feldern der eingeschränkten Lymphadenektomie.

#### **4.4 Prognostische Bedeutung der Genexpression von MUC7 in pelvinen Lymphknoten von Patienten mit Urothelkarzinom der Harnblase**

Die MUC7 Genexpressionsrate der in dieser Arbeit untersuchten Lymphknotenproben konnte aufgrund des noch zu geringen Zeitintervalls noch nicht mit den klinischen Nachsorgedaten der Patienten verglichen werden. Ein besonderes Augenmerk wäre dabei auf die progressionsfreie Überlebensrate, die tumorspezifische Überlebensrate sowie die Gesamtüberlebensrate zu richten. Um die prognostische Bedeutung einer Detektion disseminierter Tumorzellen in Lymphknoten mit der spezifischen MUC7 RT-PCR zu beurteilen, bleibt der Vergleich der Ergebnisse dieser Arbeit mit den noch zu erhebenden Nachsorgedaten über einen Zeitraum von fünf oder zehn Jahren abzuwarten.

Auch wenn die vorliegenden Ergebnisse nicht für einen Einsatz von MUC7 als diagnostischem Tumormarker zur Detektion disseminierter Tumorzellen in Lymphknoten von Harnblasenkarzinompatienten sprechen, bleibt ein sinnvoller Einsatz dieses epithelialen Markers zu Prognosezwecken weiterhin möglich. Die Arbeitsgruppe um Copp konnte 2006 zeigen, dass Patienten mit einem

Harnblasenkarzinom bei einem positiven Uroplakin II Nachweis (UPII) in den bei der Zystektomie entnommenen Lymphknoten eine deutlich höhere Rezidiv- und Progressionsrate aufwiesen als Patienten ohne UPII Genexpression (Copp et al., 2006). Die Arbeitsgruppe um Rosenberg konnte im Jahr 2002 eine Korrelation zwischen einem positiven Cytokeratin 20 Nachweis (CK-20) in Lymphknoten bei Kolonkarzinomen und einer damit einhergehenden niedrigeren 5-Jahresüberlebensrate herstellen (Rosenberg et al., 2002).

Der Vergleich einer MUC7 Genexpression in Lymphknoten von Tumorpatienten mit den dazugehörigen klinischen Nachsorgedaten wurde bis heute noch in keiner Arbeit untersucht. Die Arbeitsgruppe um Retz evaluierte MUC7 in Knochenmarksproben von Harnblasenkarzinomen als Prognosemarker in Bezug auf die Gesamtüberlebensrate. Auch wenn die Ergebnisse keinen signifikanten Unterschied zeigten, so war der MUC7 Nachweis paradoxerweise bei denjenigen Patienten höher, die im Verlauf einen günstigeren Krankheitsverlauf zeigten. Der ebenfalls untersuchte Marker CK20 zeigte zwar eine höhere progressionsfreie und tumorspezifische Überlebensrate bei CK20-negativen Patienten, allerdings war der Unterschied zur CK20-positiven Patientengruppe ebenfalls nicht statistisch signifikant ( $p = 0,092$ ) (Retz et al., 2004).

#### **4.5 Limitierende Faktoren**

An dieser Stelle werden die möglichen limitierenden Faktoren dieser Arbeit diskutiert, welche eine Erklärung für die teilweise unerwarteten Ergebnisse liefern können. Jegliche angewandte Methodik wurde zum Ausschluss von Fehlerquellen im Vorhinein ausführlich getestet als auch während des laufenden Projektes reevaluiert.

##### **4.5.1 Effekte und methodische Problematik der Materialgewinnung sowie der Materialaufarbeitung**

Die Blutentnahme für die in dieser Arbeit untersuchten 15 Blutproben gesunder Probanden erfolgte durch eine für diese Maßnahme ausgebildete Fachkraft. Somit bestanden keine Qualitätsunterschiede zwischen den verschiedenen Proben. Obwohl für MUC7 keine kutane Genexpression beschrieben ist, wurden die ersten

5ml jeder Blutprobe grundsätzlich verworfen, um eine Kontamination mit anderen Zellen, welche nicht zum hämatopoetischen System gehören, auszuschließen.

Die Entnahme der Lymphknoten erfolgte während der Zystektomie als standardisiertes Verfahren durch den jeweils diensthabenden Operateur und stets unter sterilen Bedingungen. Da während einer laufenden Operation kein Austausch der Arbeitswerkzeuge erfolgte, konnte eine Verschleppung von Tumorzellen, gerade bei einer Verletzung von Lymphknotengewebe, von einem Lymphknotenfeld zum anderen nicht gänzlich ausgeschlossen werden. Die anschließende unmittelbare Aufarbeitung wurde nach einem festgelegten Schema von jeweils einer Person aus unserer Arbeitsgruppe durchgeführt. Die Weiterverarbeitung jeder Lymphknotenprobe erfolgte innerhalb von 10 Minuten nach der Entnahme durch den Operateur. Nach der Befreiung des jeweiligen Lymphknotens von überschüssigem Binde- und Fettgewebe wurden eine Vermessung und eine Katalogisierung durchgeführt. Die Größe der Lymphknotenproben musste mindestens 7mm betragen, da sie sonst für die Halbierung und die zusätzliche Abtrennung eines kleinen Seitenteils für die histopathologische Untersuchung zu klein gewesen wären. Jeder Lymphknoten wurde mit einem neuen sterilen Skalpell geteilt und die für die Histopathologie bestimmten Anteile in Formalin fixiert. Durch die festgelegte Mindestgröße von 7mm pro Lymphknoten, wodurch ein mindestens 3mm großer Anteil im Labor weiterverarbeitet werden konnte, war die extrahierte RNA-Menge nur bei 11 der 804 Lymphknoten zu gering um eine RT-PCR durchzuführen. Dennoch besteht in dieser Mindestgrößenanforderung ein grundsätzliches Problem, da natürlich auch in kleineren Lymphknoten eine Mikrometastasierung vorliegen kann. Für die Zukunft wäre eine verbesserte Technik zur Aufarbeitung von kleineren Proben wünschenswert.

Der für die Weiterverarbeitung im Labor bestimmte Teil der Lymphknotenprobe wurde in autoklavierter Aluminiumfolie flüssigkeitsdicht verpackt und in Flüssigstickstoff kryokonserviert. Dies sollte eine Degradation von RNA so weit wie möglich verhindern, ebenso wie die bis zur RNA-Extraktion durchgeführte Lagerung der Lymphknotenproben bei -80°C. Während der RNA-Extraktion wurden die tiefgefrorenen Proben grundsätzlich einzeln und so schnell wie möglich verarbeitet, um eine RNA-Degradation weitestgehend zu verhindern. Um eine Kontamination



der Proben untereinander auszuschließen, wurden ausschließlich in Diethylpyrocarbonat (DEPC) autoklavierte Materialien verwendet, welche nach jeder Lymphknotenprobe ausgetauscht wurden. Obwohl alle verwendeten Gefäße und Arbeitswerkzeuge vor ihrer Verwendung in Flüssigstickstoff gekühlt wurden, konnte bis zur Überführung in RNazol ein kurzzeitiges Auftauen der Probe, und somit eine RNA-Degradation, vor allem während der Zerstoßung im Mikrodismembrator, nicht immer vollständig verhindert werden.

Grundsätzlich kann eine Tumordinfiltration einer Gewebeprobe nicht nur in dem im Fokus stehenden Gewebestück sondern sowohl in den umliegenden Gefäßen als auch im paranodalen Fettgewebe vorliegen. Daher sollte für zukünftige Untersuchungen diskutiert werden, ob eine RNA-Extraktion immer das die Probe umgebende gefäßdurchsetzte Gewebe miteinbezieht, um eine eventuelle Tumordinfiltration dieser Strukturen zu erfassen.

#### **4.5.2 Methodische Problematik der RT-PCR Methode**

Die Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) ist trotz der heutzutage standardisierten Technik sowohl in der Ausführung als auch in der Auswertung der Ergebnisse durchaus kritisch zu beurteilen. Allein schon aufgrund der hohen Anzahl der einzelnen Arbeitsschritte sind größte Sorgfältigkeit und Konzentration während des gesamten Arbeitsablaufs obligat. Die PCR ist eine hochsensitive Methode, mit welcher durch Vervielfältigung bereits kleinste Mengen einer spezifischen Nukleotid-Sequenz nachgewiesen werden können. Eine Verdoppelung des PCR-Zyklus, wie bei der in dieser Arbeit angewandten nested-PCR führt zu einer weiteren Erhöhung der Sensitivität. Bereits geringste Kontaminationen mit anderen Nukleinsäuren in einer der verwendeten Reagenzien können zu einem falsch positiven Ergebnis führen. Daher wurde zu jedem PCR-Ansatz grundsätzlich eine Negativkontrolle durchgeführt, bei welcher die Proben-cDNA durch CHO-cDNA und Aqua bidest. ersetzt wurde. Bei allen durchgeführten Versuchen zeigte eine einzige Negativkontrolle PCR-Produkte in der Auswertung. Dieser Ansatz wurde verworfen und mit neuen Materialien wiederholt. Im zweiten Durchgang war diese Negativkontrolle dann ohne Amplifikationsprodukte. Eine Kontamination der für diese Arbeit verwendeten Reagenzien ist damit unwahrscheinlich.

Des Weiteren kann eine minimale Kontamination mit genomischer DNA trotz einer exakten Ausführung der standardisierten RNA-Extraktionsmethode nie gänzlich ausgeschlossen werden. Deshalb wurde ein sogenannter "Exon-spanning"-Primer verwendet, in diesem Fall der Primer 10F (Punkt 2.7.5), welcher eine Intron-Exon-Grenze überspannte. Somit konnte gewährleistet werden, dass eine Kontamination mit genomischer DNA anhand der unterschiedlichen Größen der PCR-Produkte von cDNA und genomischer DNS sicher erkannt werden konnte. Einige wenige Proben zeigten mehrere PCR-Produkte, welche durch Sequenzierung als genomische DNA identifiziert werden konnte (Punkt 3.2). Aufgrund der geringeren Lauflänge war eine Verwechslung mit der MUC7-Bande aber nicht möglich.

Neben einer Verunreinigung der Probe besteht aber auch die Möglichkeit der Degradation oder des Verlustes von RNA, was sich in einem falsch negativen Ergebnis ausdrücken würde. Des Weiteren können Fehler während der RT-Reaktion oder der PCR auftreten und zu einem verfälschten Ergebnis führen. Um solche Fehler weitgehend ausschließen zu können, wurde zunächst die erfolgreiche Durchführung jeder RT-Reaktion mit einer Beta-Actin-PCR überprüft. Dies gelang bei allen Proben aus den Zelllinien und allen peripher venösen Blutproben der gesunden Probanden. Drei der 804 im Labor untersuchten Lymphknotenproben (0,37%) zeigten keine Beta-Actin-Genexpression und wurden deshalb nicht weiter verarbeitet.

#### **4.5.3 Methodische Problematik der Auswertung**

Die Auswertung der spezifischen MUC7 RT-PCR erfolgte durch die Gelelektrophorese anhand der Darstellung der Amplifikationsprodukte. Eine Schwierigkeit stellten dabei die manchmal nur sehr schwach abgebildeten Banden dar. Die Darstellung der Banden ist grundsätzlich abhängig von verschiedenen Faktoren, wie der Gelstärke, dem Interkalierungsgrad der Proben-DNA mit Ethidiumbromid sowie der Belichtungszeit mit UV-Licht. Trotz der standardisierten Methodik können minimale Abweichungen dieser Parameter zwischen verschiedenen Agarosegelen nicht ausgeschlossen werden. Im Rahmen der Auswertung wurden die kaum erkennbaren Banden nur dann als positiv gewertet, wenn sie in beiden voneinander unabhängigen Durchgängen der MUC7 RT-PCR zu erkennen waren. Traf dies nur auf einen Durchgang zu, wurde die

Lymphknotenprobe als MUC7 negativ klassifiziert und kein dritter Durchgang durchgeführt. Die Unterscheidung zwischen einer schwachen und einer starken Ausprägung der Bandendarstellung unterliegt dabei der subjektiven Entscheidung des Betrachters. Aus diesem Grund ist nicht auszuschließen, dass einige wenige Proben möglicherweise falsch klassifiziert wurden. Im Zweifelsfall wurden die Ergebnisse auch von anderen in der Technik der PCR erfahrenen Personen gesehen und bewertet.

Um die MUC7 Genexpression jeder Lymphknotenprobe möglichst genau analysieren zu können, wurden, wie unter Punkt 2.10 beschrieben, immer mindestens zwei voneinander unabhängige Durchgänge der MUC7 RT-PCR angefertigt. Bei Abweichungen zwischen den Durchgängen wurde eine dritte Analyse durchgeführt, welche das endgültige Ergebnis festlegte. Dabei ist anzumerken, dass weitere voneinander unabhängige Untersuchungen der jeweils selben Lymphknotenprobe das Ergebnis auch wieder verändern könnten und dabei die Anzahl der Durchgänge nur durch die Endlichkeit des Probenmaterials limitiert gewesen wäre. Die hier verwendete Methodik der Auswertung sollte daher in Zukunft weiterhin diskutiert und wenn erforderlich auch modifiziert werden.

Eine Möglichkeit für zukünftige Untersuchungen einer MUC7 Genexpression in Lymphknoten oder anderen Gewebeproben stellt die Methode der quantitativen PCR dar, eine Weiterentwicklung der qualitativen PCR. Im Gegensatz zu der in dieser Arbeit eingesetzten qualitativen PCR, welche für den alleinigen Nachweis einer Genexpression ausreicht, kann mit der quantitativen PCR zusätzlich die Menge der ursprünglich eingesetzten Templates bestimmt werden. Dadurch lässt sich ermitteln, in welchem Ausmaß und in welcher Form ein Gen abgelesen wird (Higuchi et al., 1992, Higuchi et al., 1993). Dies könnte der Festlegung einer objektiven Nachweisgrenze dienen, wenn sich herausstellt, dass nicht nur das alleinige Vorhandensein sondern auch eine bestimmte Mindestgröße sowie die Art der MUC7 Genexpression für die Prognose des individuellen Krankheitsverlaufes eine entscheidende Rolle spielen.

#### **4.6 Schlussfolgerung und Ausblick**

Der aktuelle Standard des Lymphknotenstaging bei einer Tumorerkrankung ist nach wie vor die histopathologische Untersuchung. Das humane Muzin 7 (MUC7) scheint nach den vorliegenden Daten aus dieser Arbeit nur begrenzt als diagnostischer Epithelmarker zur Detektion okkulten Tumorzellen in Lymphknoten beim Harnblasenkarzinom geeignet zu sein.

Neben den Ergebnissen dieser Arbeit und den Daten der Arbeitsgruppe um Retz liegen in der aktuellen Literatur noch keine weiteren Studien zur Detektion disseminierter Tumorzellen mit der spezifischen MUC7 RT-PCR in Lymphknoten bei Harnblasenkarzinomen vor. Aufgrund dieser vergleichsweise noch geringen Stichprobengröße und den Ergebnissen aller bisher durchgeführten Untersuchungen zur Eignung von MUC7 erscheint eine weitere Analyse dieses Muzins als potentieller epithelialer Tumormarker beim Harnblasenkarzinom sowohl in diagnostischer als auch prognostischer Hinsicht sinnvoll.

Die prognostische Bedeutung von Lymphknoten mit positiver MUC7 Genexpression bei Blasenkarzinompatienten nach radikaler Zystektomie wird erst in nachfolgenden Langzeitbeobachtungen an einem größeren Patientenkollektiv beurteilbar sein. Dabei stellt sich vor allem die Frage, ob es einen Zusammenhang zwischen dem MUC7-Nachweis und der Rezidivrate gibt. Auch der Zeitpunkt des Rezidivs könnte möglicherweise in Korrelation zur MUC7-Detektion stehen. Sollte sich MUC7 in einer multivariaten Analyse dabei als unabhängiger Prognosefaktor herausstellen, könnten die qualitative MUC7 RT-PCR Technik oder auch die quantitative real-time MUC7 RT-PCR in Zukunft ergänzend zur klassischen histopathologischen Untersuchung eingesetzt werden, um besonders die Hochrisikopatienten besser zu erkennen und einer geeigneten Behandlung zuführen zu können.

Da diese Arbeit im Rahmen der LEA-Studie durchgeführt wurde, stellt sich auch die Frage, ob die ausgedehnte Lymphadenektomie zu einer Outcomeverbesserung führt und ob der MUC7-Nachweis die zum jetzigen Zeitpunkt noch offene Schlussfolgerung unterstützt.

## 5 Zusammenfassung

Das Harnblasenkarzinom ist mit einem Anteil von 3% aller malignen Tumorerkrankungen nach dem Prostatakarzinom die zweithäufigste bösartige Tumorerkrankung des Urogenitalsystems. Trotz modernster diagnostischer und therapeutischer Möglichkeiten der Urologie, insbesondere im operativen Bereich, entwickeln bis zu 50% der Patienten mit lokal fortgeschrittenem Harnblasenkarzinom nach radikaler Zystektomie eine systemische Tumorprogression. Mögliche Ursache hierfür könnte eine zum Zeitpunkt der Operation bereits vorhandene lymphogene oder hämatogene Metastasierung sein, welche weder klinisch noch histopathologisch nachweisbar ist und deshalb auch nicht durch lokale Therapiemaßnahmen beeinflusst werden kann. Der frühzeitige Nachweis disseminierter Tumorzellen in Lymphknoten von Harnblasenkarzinompatienten zur Identifizierung von Hochrisikopatienten ist deshalb von entscheidender therapeutischer und prognostischer Relevanz. So könnte man diese Gruppe beispielweise schon frühzeitig einer adjuvanten Chemotherapie zuführen. Das Ziel dieser Arbeit war die Etablierung einer molekularbiologischen Detektionsmethode zum Nachweis von disseminierten Tumorzellen in pelvinen Lymphknoten von Harnblasenkarzinompatienten nach der radikalen Zystektomie. Als potentieller epithelialer Marker wurde das humane Mucin 7 (MUC7) gewählt. Mittels der spezifischen MUC7 RT-PCR wurde die Genexpression von MUC7 in den Lymphknotenproben der Harnblasenkarzinompatienten analysiert.

MUC7 ist ein hochmolekulares Glykoprotein und gehört zur Gruppe der Muzine, welche zum gegenwärtigen Zeitpunkt 23 verschiedene Typen umfasst. Muzine sind integraler Bestandteil vieler Schleimhautoberflächen, werden aber auch von verschiedenen Drüsen sezerniert. Die Hauptaufgabe der Muzine liegt in ihrer protektiven Funktion. MUC7 gehört zur Gruppe der sezernierten Muzine und ist beispielsweise Bestandteil des menschlichen Speichels. Eine Expression von MUC7 kommt im normalen Urothel, oberflächlichen Blasentumoren sowie mesenchyalem Gewebe, Blut oder Lymphknoten normalerweise nicht vor. Nur bei

invasiv wachsenden Harnblasenkarzinomen sowie dem Carcinoma in situ der Harnblase konnte eine konstanten MUC7 Genexpression nachgewiesen werden.

Im ersten Teil dieser Arbeit wurde die MUC7 Genexpression zunächst in Blasenkarzinomzelllinien verschiedener Differenzierungsgrade sowie in den Vergleichszelllinien CHO und Jurkat und in peripher venösen Blutproben gesunder Probanden untersucht. Die Ergebnisse zeigten, dass MUC7 eine konstante Genexpression in allen Blasenkarzinomzelllinien der Differenzierungsgrade G1 bis G3 aufwies. Demgegenüber konnten in den Kontrollzelllinien sowie den peripher venösen Blutproben keine PCR Amplifikationsprodukte nachgewiesen werden.

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurde zur Detektion disseminierter Tumorzellen die MUC7 Genexpression in insgesamt 790 Lymphknotenproben aus einem Patientenkollektiv von 41 Patienten analysiert. Die erste Aufarbeitung der Lymphknoten erfolgte dabei während der Zystektomie mit begleitender Lymphadenektomie. Dabei wurden nach der Entfernung des umliegenden Binde- und Fettgewebes eine Hälfte des Lymphknotens sowie ein kleines Stück der anderen Hälfte in Formalin fixiert, um später durch die konventionelle Histopathologie auf Lymphknotenmetastasen untersucht zu werden. Der verbleibende Teil des Lymphknotens wurde kryokonserviert, um anschließend nach der erfolgreichen RNA-Isolierung mit Hilfe der spezifischen MUC7 RT-PCR die Genexpression von MUC7 zu analysieren.

Von den 790 untersuchten Lymphknoten wurden 27 Lymphknoten (3,4%) in der klassischen Histopathologie als Metastase klassifiziert. Von diesen 27 Lymphknoten zeigten 23 Lymphknoten (85,2%) eine positive MUC7 Genexpression. Die anderen vier histopathologisch als Metastase klassifizierten Lymphknoten zeigten auch nach wiederholten PCR-Analysen kein MUC7 Amplifikationsprodukt. 763 der 790 Lymphknotenproben waren in der klassischen Histopathologie tumorfrei. Trotzdem zeigten 412 der 763 histopathologisch negativen Lymphknoten eine positive MUC7 Genexpression (54,0%), wobei nur zwei der 41 untersuchten Patienten gänzlich ohne MUC7 Nachweis in den untersuchten Lymphknoten waren. Die Detektionsrate von MUC7 war dabei aktuell unabhängig vom jeweiligen Primärtumorstadium (pT) und ebenfalls unabhängig

vom Malignitätsgrad, wobei manche Ergebnisse je nach Einordnung aufgrund der teilweise geringen Stichprobengröße kritisch zu betrachten sind.

Die Ergebnisse dieser Arbeit sprechen nicht dafür, dass die Detektion okkulten Tumorzellen mit der spezifischen MUC7 RT-PCR in pelvischen Lymphknoten von Blasen-Tumorpatienten die klassische Histopathologie ersetzen kann. Trotzdem erscheint eine weitere Analyse von MUC7 als epithelialer Tumormarker zur Detektion disseminierter Tumorzellen sinnvoll, da im Vergleich zu den Ergebnissen dieser Arbeit die Daten der Arbeitsgruppen um Retz und Kinjo eine mögliche Eignung von MUC7 erkennen lassen und bis heute insgesamt noch keine weiteren Daten in der Literatur dazu vorliegen. Ein Vergleich der Ergebnisse der spezifischen MUC7 RT-PCR mit den klinischen Nachsorgedaten steht noch aus. Im Langzeitverlauf muss sich in multivariaten Analysen zeigen, ob die zusätzliche MUC7 RT-PCR, sei es im quantitativen oder qualitativen Ansatz, zusätzlich zur Histopathologie eine geeignete Methode zur besseren Einschätzung der Prognose darstellt. Eine stetige Verbesserung der RT-PCR Technik sowie Eignungsuntersuchungen weiterer epithelialer Tumormarker zur Detektion disseminierter Tumorzellen in Lymphknoten von Harnblasenkarzinompatienten erscheinen auch in Bezug auf andere Daten aus der Literatur sinnvoll.

## 6 Literaturverzeichnis

Alos, L., Lujan, B., Castillo, M., Nadal, A., Carreras, M., Caballero, M., De Bolos, C., Cardesa, A.; Expression of membrane-bound mucins (MUC1 and MUC4) and secreted mucins (MUC2, MUC5AC, MUC5B, MUC6 and MUC7) in mucoepidermoid carcinomas of salivary glands. *Am. J. Surg. Pathol.* 29 (2005) 806 - 813

Arai, T., Nakano, T., Fukuhisa, K., Kasamatsu, T., Tsunematsu, R., Masubuchi, K., Yamauchi, K., Hamada, T., Fukuda, T., Noguchi, H.; Second cancer after radiation therapy for cancer of the uterine cervix. *Cancer* 67 (1991) 398 - 405

Badalament, R.A., Franklin, G.L., Page, C.M., Dasani, B.M., Wientjes, M.G., Drago, J.R.; Enhancement of bacillus Calmette-Guerin attachment to the urothelium by removal of the rabbit bladder mucin layer. *J. Urol.* 147 (1992) 482 - 485

Baier, G., Telford, D., Gulbins, E., Yamada, N., Kawakami, T., Altman, A.; Improved specificity of RT-PCR amplifications using nested cDNA primers. *Nucleic Acids Res.* 21 (1993) 1329-1330

Baker, G.L., Kahl, L.E., Zee, B.C., Stolzer, B.L., Agarwal, A.K., Medsger, T.A.Jr.; Malignancy following treatment of rheumatoid arthritis with cyclophosphamide. Long-term case-control follow-up study. *Am. J. Med.* 83 (1987) 1 - 9

Bartman, A.E., Buisine, M.P., Aubert, J.P., Niehans, G.A., Toribara, N.W., Kim, Y.S., Kelly, E.J., Crabtree, J.E., Ho, S.B.; The MUC6 secretory mucin gene is expressed in a wide variety of epithelial tissues. *J. Pathol.* 186 (1998) 398 - 405

Bassi, P., Ferrante, G.D., Piazza, N., Spinadin, R., Carando, R., Pappagallo, G., Pagano, F.; Prognostic factors of outcome after radical cystectomy for bladder cancer: a retrospective study of a homogeneous patient cohort. *J. Urol.* 161 (1999) 1494 - 1497

Bobek, L.A., Liu, J., Sait, S.N., Shows, T.B., Bobek, Y.A., Levine, M.J.; Structure and chromosomal localization of the human salivary mucin gene, MUC7. *Genomics* 31 (1996) 277 - 282

Bobek, L.A., Tsai, H., Biesbrock, A.R., Levine, M.J.; Molecular cloning, sequence, and specificity of expression of the gene encoding the low molecular weight human salivary mucin (MUC7). *J. Biol. Chem.* 268 (1993) 20563 - 20569

Bohle, A., Durek, C.; Use of BCG in superficial urinary bladder carcinoma. *Urologe A.* 40 (2001) 403 - 409

Bolscher, J.G., Groenink, J., Van Der Kwaak, J.S., Van Den Keijbus, P.A., Van 't Hof, W., Veerman, E.C., Nieuw Amerongen, A.V.; Detection and quantification of MUC7 in submandibular, sublingual, palatine, and labial saliva by anti-peptide antiserum. *J. Dent. Res.* 78 (1999) 1362 - 1369



Botteman, M.F., Pashos, C.L., Redaelli, A., Laskin, B., Hauser, R.; The health economics of bladder cancer: a comprehensive review of the published literature. *Pharmacoeconomics* 21 (2003) 1315 - 1330

Bruno, L.S., Li, X., Wang, L., Soares, R.V., Siqueira, C.C., Oppenheim, F.G., Troxler, R.F., Offner, G.D.; Two-hybrid analysis of human salivary mucin MUC7 interactions. *Biochim. Biophys. Acta* 1746 (2005) 65 - 72

Calmels, S., Ohshima, H., Vincent, P., Gounot, A.M., Bartsch, H.; Screening of microorganisms for nitrosation catalysis at pH 7 and kinetic studies on nitrosamine formation from secondary amines by *E. coli* strains. *Carcinogenesis* 6 (1985) 911 - 915

Cardillo, M.R., Castagna, G., Memeo, L., De Bernardinis, E., Di Silverio, F.; Epidermal growth factor receptor, MUC-1 and MUC-2 in bladder cancer. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* 19 (2000) 225 - 233

Case, R.A., Hosker, M.E., McDonald, D., Pearson, J.T.; Tumours of the urinary bladder in workmen engaged in the manufacture and use of certain dyestuff intermediates in the British chemical industry. The role of aniline, benzidine, alpha-naphthylamine, and beta-naphthylamine. *Br. J. Ind. Med.* 11 (1954) 75 - 104

Chambers, A.F., Groom, A.C., Macdonald, I.C.; Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites. *Nat. Rev. Cancer* 2 (2002) 563 - 572

Chen, Y., Zhao, Y.H., Kalaslavadi, T.B., Hamati, E., Nehrke, K., Le, A.D., Ann, D.K., Wu, R.; Genome-wide search and identification of a novel gel-forming mucin MUC19 / MUC19 in glandular tissues. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 30 (2004) 155 - 165

Chomczynski, P., Sacchi, N.; Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 162 (1987) 156 - 159

Claude, J.C., Frentzel-Beyme, R.R., Kunze, E.; Occupation and risk of cancer of the lower urinary tract among men. A case-control study. *Int. J. Cancer* 41 (1988) 371 - 379

Cookson, M.S., Herr, H.W., Zhang, Z.F., Soloway, S., Sogani, P.C., Fair, W.R.; The treated natural history of high risk superficial bladder cancer: 15-year outcome. *J. Urol.* 158 (1997) 62 - 67

Copp, H.L., Chin, J.L., Conaway, M., Theodorescu, D.; Prospective evaluation of the prognostic relevance of molecular staging for urothelial carcinoma. *Cancer* 107 (2006) 60 - 66

De Vere White, R.; Re: defining optimal therapy for muscle-invasive bladder cancer. *Eur. Urol.* 53 (2008) 1295 - 1296

Dekker, J., Rossen, J.W., Buller, H.A., Einerhand, A.W.; The MUC family: an obituary. *Trends Biochem. Sci.* 27 (2002) 126 - 131

Devine, P.L., Mckenzie, I.F.; Mucins: structure, function, and associations with malignancy. *Bioessays* 14 (1992) 619 - 625

Dhar, N.B., Campbell, S.C., Zippe, C.D., Derweesh, I.H., Reuther, A.M., Fergany, A., Klein, E.A.; Outcomes in patients with urothelial carcinoma of the bladder with limited pelvic lymph node dissection. *BJU Int.* 98 (2006) 1172 - 1175

Dhar, N.B., Klein, E.A., Reuther, A.M., Thalmann, G.N., Madersbacher, S., Studer U.E.; Outcome after radical cystectomy with limited or extended pelvic lymph node dissection. *J. Urol.* 179 (2008) 873 - 878

Eble, J.N., Sauter, G., Epstein, J.I., Sesterhenn, I.A. "World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs." IARC Press, Lyon, 2004

Ewing, J.; Metastasis. In: "Neoplastic Diseases. A Treatise on Tumors." Saunders, W.B. (Hrsg.), Philadelphia & London, 1928, third edition, 77 - 89

Fan, H., Bobek, L.A.; Regulation of Human MUC7 Mucin Gene Expression by Cigarette Smoke Extract or Cigarette Smoke and *Pseudomonas aeruginosa* Lipopolysaccharide in Human Airway Epithelial Cells and in MUC7 Transgenic Mice. *Open Respir. Med. J.* 4 (2010) 63 - 70

Feil, G., Bichler, K.H., Paulgen-Nelde, H.J., Hennenlotter, J., Zumbargel, A., Stenzl, A.; ImmunoCyt - a new urine test in diagnosis of bladder cancer. *Urologe A.* 42 (2003) 531 - 537

Feinberg, A.P., Vogelstein, B.; A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal. Biochem.* 132 (1983) 6 - 13

Fidler, I.J.; The pathogenesis of cancer metastasis: the 'seed and soil' hypothesis revisited. *Nat. Rev. Cancer* 3 (2003) 453 - 458

Filshie, R.J., Zannettino, A.C., Makrynika, V., Gronthos, S., Henniker, A.J., Bendall, L.J., Gottlieb, D.J., Simmons, P.J., Bradstock, K.F.; MUC18, a member of the immunoglobulin superfamily, is expressed on bone marrow fibroblasts and a subset of hematological malignancies. *Leukemia* 12 (1998) 414 - 421

Frank, I., Chevillat, J.C., Blute, M.L., Lohse, C.M., Nehra, A., Weaver, A.L., Karnes R.J., Zincke, H.; Transitional cell carcinoma of the urinary bladder with regional lymph node involvement treated by cystectomy: clinicopathologic features associated with outcome. *Cancer* 97 (2003) 2425 - 2431

Freiha, F., Reese, J., Torti, F.M.; A randomized trial of radical cystectomy versus radical cystectomy plus cisplatin, vinblastine and methotrexate chemotherapy for muscle invasive bladder cancer. *J. Urol.* 155 (1996) 495 - 499; discussion 499 - 500

Geavlete, B., Multescu, R., Georgescu, D., Geavlete, P.; Hexvix blue light fluorescence cystoscopy - a promising approach in diagnosis of superficial bladder tumors. *J. Med. Life* 1 (2008) 355 - 362

Gendler, S.J., Lancaster, C.A., Taylor-Papadimitriou, J., Duhig, T., Peat, N., Burchell, J., Pemberton, L., Lalani, E.N., Wilson, D.; Molecular cloning and expression of human tumor-associated polymorphic epithelial mucin. *J. Biol. Chem.* 265 (1990) 15286 - 15293

Gendler, S.J., Spicer, A.P., Lalani, E.N., Duhig, T., Peat, N., Burchell, J., Pemberton, L., Boshell, M., Taylor-Papadimitriou, J.; Structure and biology of a carcinoma-associated mucin, MUC1. *Am. Rev. Respir. Dis.* 144 (1991) S42 - 47

Gipson, I.K., Ho, S.B., Spurr-Michaud, S.J., Tisdale, A.S., Zhan, Q., Torlakovic, E., Pudney, J., Anderson, D.J., Toribara, N.W., Hill, J.A.; Mucin genes expressed by human female reproductive tract epithelia. *Biol. Reprod.* 56 (1997) 999 - 1011

Globocan, International Agency for Research on Cancer (WHO) "Cancer Incidence and Mortality Worldwide 2008", Lyon, France, 2010

Godfrey, T.E., Raja, S., Finkelstein, S.D., Gooding, W.E., Kelly, L.A., Luketich, J.D.; Prognostic value of quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction in lymph node-negative esophageal cancer patients. *Clin. Cancer Res.* 7 (2001) 4041 - 4048

Golka, K., Rettenmeier, A.W., Goebell, P.J.; The causes of urinary bladder cancer and possibilities of prevention. *Urologe A.* 45 (2006) 361 - 367

Goodell, C.A., Belisle, J.A., Gubbels, J.A., Migneault, M., Rancourt, C., Connor, J., Kunnimalaiyaan, M., Kravitz, R., Tucker, W., Zwick, M., Patankar, M.S.; Characterization of the tumor marker muc16 (ca125) expressed by murine ovarian tumor cell lines and identification of a panel of cross-reactive monoclonal antibodies. *J. Ovarian Res.* 2 (2009) 8

Grossman, H.B., Natale, R.B., Tangen, C.M., Speights, V.O., Vogelzang, N.J., Trump, D.L., Devere White, R.W., Sarosdy, M.F., Wood, D.P.Jr., Raghavan, D., Crawford, E.D.; Neoadjuvant chemotherapy plus cystectomy compared with cystectomy alone for locally advanced bladder cancer. *N. Engl. J. Med.* 349 (2003) 859 - 866

Gum, J.R., Byrd, J.C., Hicks, J.W., Toribara, N.W., Lampport, D.T., Kim, Y.S.; Molecular cloning of human intestinal mucin cDNAs. Sequence analysis and evidence for genetic polymorphism. *J. Biol. Chem.* 264 (1989) 6480 - 6487

Gum, J.R., Hicks, J.W., Swallow, D.M., Lagace, R.L., Byrd, J.C., Lampport, D.T., Siddiki, B., Kim, Y.S.; Molecular cloning of cDNAs derived from a novel human intestinal mucin gene. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 171 (1990) 407 - 415

Gusterson, B.; Are micrometastases clinically relevant? *Br. J. Hosp. Med.* 47 (1992) 247 - 248

Guyonnet Duperat, V., Audie, J.P., Debailleul, V., Laine, A., Buisine, M.P., Galiegue-Zouitina, S., Pigny, P., Degand, P., Aubert, J.P., Porchet, N.; Characterization of the human mucin gene MUC5AC: a consensus cysteine-rich domain for 11p15 mucin genes? *Biochem. J.* 305 (Pt 1) (1995) 211 - 219

Hampel, H., Korschenhausen, D.A., Schwarz, M.J., Frenzel, K.H., Johnson, J.P., Penning, R., Ackenheil, M., Muller, N.; Detection of the novel cell adhesion molecule MUC18 in human brain tissue. *Neuroimmunomodulation* 4 (1997) 57 - 61

Harris, R.E., Chen-Backlund, J.Y., Wynder, E.L.; Cancer of the urinary bladder in blacks and whites. A case-control study. *Cancer* 66 (1990) 2673 - 2680

Hattrup, C.L., Gendler, S.J.; Structure and function of the cell surface (tethered) mucins. *Annu. Rev. Physiol.* 70 (2008) 431 - 457

Hautmann, R.E.; Symptome. In: "Urologie", Springer, Heidelberg, 2010, 4th edition, 216

Hautmann, R.E., Gschwend, J.E., De Petriconi, R.C., Kron, M., Volkmer, B.G.; Cystectomy for transitional cell carcinoma of the bladder: results of a surgery only series in the neobladder era. *J. Urol.* 176 (2006) 486 - 492

Herr, H.W.; Extent of surgery and pathology evaluation has an impact on bladder cancer outcomes after radical cystectomy. *Urology* 61 (2003) 105 - 108

Herr, H.W.; The value of a second transurethral resection in evaluating patients with bladder tumors. *J. Urol.* 162 (1999) 74 - 76

Herr, H.W., Bochner, B.H., Dalbagni, G., Donat, S.M., Reuter, V.E., Bajorin, D.F.; Impact of the number of lymph nodes retrieved on outcome in patients with muscle invasive bladder cancer. *J. Urol.* 167 (2002) 1295 - 1298

Herr, H.W., Dotan, Z., Donat, S.M., Bajorin, D.F.; Defining optimal therapy for muscle invasive bladder cancer. *J. Urol.* 177 (2007) 437 - 443

Higuchi, R., Dollinger, G., Walsh, P.S., Griffith, R.; Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Biotechnology (NY)* 10 (1992) 413 - 417

Higuchi, R., Fockler, C., Dollinger, G., Watson, R.; Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology (NY)* 11 (1993) 1026 - 1030

Higuchi, T., Orita, T., Nakanishi, S., Katsuya, K., Watanabe, H., Yamasaki, Y., Waga, I., Nanayama, T., Yamamoto, Y., Munger, W., Sun, H.W., Falk, R.J., Jennette, J.C., Alcorta, D.A., Li, H., Yamamoto, T., Saito, Y., Nakamura, M.; Molecular cloning, genomic structure, and expression analysis of MUC20, a novel mucin protein, up-regulated in injured kidney. *J. Biol. Chem.* 279 (2004) 1968 - 1979

Ho, S.B., Niehans, G.A., Lyftogt, C., Yan, P.S., Cherwitz, D.L., Gum, E.T., Dahiya, R., Kim, Y.S.; Heterogeneity of mucin gene expression in normal and neoplastic tissues. *Cancer Res.* 53 (1993) 641 - 651

Hollingsworth, M.A., Swanson, B.J.; Mucins in cancer: protection and control of the cell surface. *Nat. Rev. Cancer* 4 (2004) 45 – 60

Husmann, G., Kaatsch, P., Katalinic, A., Bertz, J., Haberland, J., Kraywinkel, K., Wolf, U. "Krebs in Deutschland 2005/2006, Häufigkeiten und Trends", Robert-Koch-Institut (Hrsg.) und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (Hrsg), Berlin, 2010, 7. Ausgabe

IBCSG "Prognostic importance of occult axillary lymph node micrometastases from breast cancers. International (Ludwig) Breast Cancer Study Group." *Lancet* 335 (1990) 1565 - 1568

Inoue, K., Slaton, J.W., Kim, S.J., Perrotte, P., Eve, B.Y., Bar-Eli, M., Radinsky, R., Dinney, C.P.; Interleukin 8 expression regulates tumorigenicity and metastasis in human bladder cancer. *Cancer Res.* 60 (2000) 2290 - 2299

Itoh, Y., Kamata-Sakurai, M., Denda-Nagai, K., Nagai, S., Tsuiji, M., Ishii-Schrade, K., Okada, K., Goto, A., Fukayama, M., Irimura, T.; Identification and expression of human epiglycanin/MUC21: a novel transmembrane mucin. *Glycobiology* 18 (2008) 74 - 83

Jensen, J.B., Ulhøi, B.P., Jensen, K.M.; Lymph node mapping in patients with bladder cancer undergoing radical cystectomy and lymph node dissection to the level of the inferior mesenteric artery. *BJU Int.* 106 (2010) 199 - 205

Jocham, D., Durek, C.; Treatment of superficial bladder tumor. *Urologe A.* 40 (2001) 460 - 463

Jocham, D., Stepp, H., Waidelich, R.; Photodynamic diagnosis in urology: state-of-the-art. *Eur. Urol.* 53 (2008) 1138 - 1148

Jumblatt, M.M., McKenzie, R.W., Steele, P.S., Emberts, C.G., Jumblatt, J.E.; MUC7 expression in the human lacrimal gland and conjunctiva. *Cornea* 22 (2003) 41 - 45

Kang, H.M., Kim, N., Park, Y.S., Hwang, J.H., Kim, J.W., Jeong, S.H., Lee, D.H., Lee, H.S., Jung, H.C., Song, I.S.; Effects of *Helicobacter pylori* Infection on gastric mucin expression. *J. Clin. Gastroenterol.* 42 (2008) 29 - 35

Kerschner, J.E., Khampang, P., Erbe, C.B., Kolker, A., Cioffi, J.A.; Mucin gene 19 (MUC19) expression and response to inflammatory cytokines in middle ear epithelium. *Glycoconj. J.* 26 (2009) 1275 - 1284

Kim, Y.S., Gum, J.Jr., Brockhausen, I.; Mucin glycoproteins in neoplasia. *Glycoconj. J.* 13 (1996) 693 - 707

Kinjo, M., Okegawa, T., Horie, S., Nutahara, K., Higashihara, E.; Detection of circulating MUC7-positive cells by reverse transcription-polymerase chain reaction in bladder cancer patients. *Int. J. Urol.* 11 (2004) 38 - 43

Kinoshita, M., Nakamura, T., Ihara, M., Haraguchi, T., Hiraoka, Y., Tashiro, K., Noda, M.; Identification of human endomucin-1 and -2 as membrane-bound O-sialoglycoproteins with anti-adhesive activity. *FEBS Lett.* 499 (2001) 121 - 126

Konety, B.R., Getzenberg, R.H.; Urine based markers of urological malignancy. *J. Urol.* 165 (2001) 600 - 611

Kraus, S., Abel, P.D., Nachtmann, C., Linsenmann, H.J., Weidner, W., Stamp, G.W., Chaudhary, K.S., Mitchell, S.E., Franke, F.E., Lalani El, N.; MUC1 mucin and trefoil factor 1 protein expression in renal cell carcinoma: correlation with prognosis. *Hum. Pathol.* 33 (2002) 60 - 67

Lapensee, L., Paquette, Y., Bleau, G.; Allelic polymorphism and chromosomal localization of the human oviductin gene (MUC9). *Fertil. Steril.* 68 (1997) 702 - 708

Lehmann, J., Retz, M., Hack, M., Siemer, S., Stockle, M.; Systemic chemotherapy for transitional cell carcinoma of the urothelium. *Onkologie* 26 Suppl. 4 (2003) 18 - 25

Lehmann, J., Retz, M., Stockle, M.; Chemotherapy in the post-MVAC era: the case for adjuvant chemotherapy. *World J. Urol.* 20 (2002) 144 - 150

Leikauf, G.D., Borchers, M.T., Prows, D.R., Simpson, L.G.; Mucin apoprotein expression in COPD. *Chest* 121 (2002) 166S - 182S

Leissner, J.; Lymphadenectomy for bladder cancer. Diagnostic and prognostic significance as well as therapeutic benefit. *Urologe A.* 44 (2005) 638 - 644

Leissner, J., Allhoff, E.P., Hohenfellner, R., Wolf, H.K.; Significance of pelvic lymphadenectomy for the prognosis after radical cystectomy. *Zentralbl. Chir.* 127 (2002) 315 - 321

Leissner, J., Ghoneim, M.A., Abol-Enein, H., Thuroff, J.W., Franzaring, L., Fisch, M., Schulze, H., Managadze, G., Allhoff, E.P., El-Baz, M.A., Kastendieck, H., Buhtz, P., Kropf, S., Hohenfellner, R., Wolf, H.K.; Extended radical lymphadenectomy in patients with urothelial bladder cancer: results of a prospective multicenter study. *J. Urol.* 171 (2004) 139 - 144

Leissner, J., Hohenfellner, R., Thuroff, J.W., Wolf, H.K.; Lymphadenectomy in patients with transitional cell carcinoma of the urinary bladder; significance for staging and prognosis. *BJU Int.* 85 (2000) 817 - 823

Li, S., Intini, G., Bobek, L.A.; Modulation of MUC7 mucin expression by exogenous factors in airway cells in vitro and in vivo. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 35 (2006) 95 - 102

Liefers, G.J., Cleton-Jansen, A.M., Van De Velde, C.J., Hermans, J., Van Krieken, J.H., Cornelisse, C.J., Tollenaar, R.A.; Micrometastases and survival in stage II colorectal cancer. *N. Engl. J. Med.* 339 (1998) 223 - 228

Linden, S.K., Florin, T.H., Mcguckin, M.A.; Mucin dynamics in intestinal bacterial infection. *PLOS One* 3 (2008) e3952

Liu, B., Rayment, S., Oppenheim, F.G., Troxler, R.F.; Isolation of human salivary mucin MG2 by a novel method and characterization of its interactions with oral bacteria. *Arch. Biochem. Biophys.* 364 (1999) 286 - 293

Madersbacher, S., Hochreiter, W., Burkhard, F., Thalmann, G.N., Danuser, H., Markwalder, R., Studer, U.E.; Radical cystectomy for bladder cancer today - a homogeneous series without neoadjuvant therapy. *J. Clin. Oncol.* 21 (2003) 690 - 696

Matsuyama, T., Ishikawa, T., Mogushi, K., Yoshida, T., Iida, S., Uetake, H., Mizushima, H., Tanaka, H., Sugihara, K.; MUC12 mRNA expression is an independent marker of prognosis in stage II and stage III colorectal cancer. *Int. J. Cancer* 127 (2010) 2292 - 2299

Mccredie, M., Stewart, J.H., Ford, J.M., Maclennan, R.A.; Phenacetin-containing analgesics and cancer of the bladder or renal pelvis in women. *Br. J. Urol.* 55 (1983) 220 - 224

Mcguckin, M.A., Hurst, T.G., Ward, B.G.; Heterogeneity in production, secretion and glycosylation of MUC1 epithelial mucin by primary cultures of ovarian carcinoma. *Int. J. Cancer* 63 (1995) 412 - 418

Mehrotra, R., Thornton, D.J., Sheehan, J.K.; Isolation and physical characterization of the MUC7 (MG2) mucin from saliva: evidence for self-association. *Biochem. J.* 334 (Pt 2) (1998) 415 - 422

Melnick, M., Chen, H., Zhou, Y., Jaskoll, T.; An alternatively spliced Muc10 glycoprotein ligand for putative L-selectin binding during mouse embryonic submandibular gland morphogenesis. *Arch. Oral Biol.* 46 (2001) 745 - 757

Moll, R., Lowe, A., Laufer, J., Franke, W.W.; Cytokeratin 20 in human carcinomas. A new histodiagnostic marker detected by monoclonal antibodies. *Am. J. Pathol.* 140 (1992) 427 - 447

Moniaux, N., Junker, W.M., Singh, A.P., Jones, A.M., Batra, S.K.; Characterization of human mucin MUC17. Complete coding sequence and organization. *J. Biol. Chem.* 281 (2006) 23676 - 23685

Morrison, A.S., Cole, P.; Epidemiology of bladder cancer. *Urol. Clin. North. Am.* 3 (1976) 13 - 29

Mostafa, M.H., Helmi, S., Badawi, A.F., Tricker, A.R., Spiegelhalder, B., Preussmann, R.; Nitrate, nitrite and volatile N-nitroso compounds in the urine of *Schistosoma haematobium* and *Schistosoma mansoni* infected patients. *Carcinogenesis* 15 (1994) 619 - 625

Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G., Erlich, H.; Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 51 (Pt 1) (1986) 263 - 273

Mustacchi, P., Shimkin, M.B.; Cancer of the bladder and infestation with *Schistosoma hematobium*. *J. Natl. Cancer Inst.* 20 (1958) 825 - 842

Nieder, A.M., Lee, D.J.; Re: The causal role of cigarette smoking in bladder cancer initiation and progression, and the role of urologists in smoking cessation. *J. Urol.* 180 (2008) 2713

Nielsen, P.A., Bennett, E.P., Wandall, H.H., Therkildsen, M.H., Hannibal, J., Clausen, H.; Identification of a major human high molecular weight salivary mucin (MG1) as tracheobronchial mucin MUC5B. *Glycobiology* 7 (1997) 413 - 419

Nieuwenhuijzen, J.A., Pos, F., Moonen, L.M., Hart, A.A., Horenblas, S.; Survival after bladder-preservation with brachytherapy versus radical cystectomy; a single institution experience. *Eur. Urol.* 48 (2005) 239 - 245

Nishino, Y., Yasuda, M., Yokoi, S., Ehara, H., Yamamoto, N., Takahashi, Y., Ishihara, S., Deguchi, T., Kawada, Y., Takeda, A., Sakai, S., Takeuchi, T., Taniguchi, M., Minoshima, K., Hamamoto, Y., Kanimoto, Y., Nakano, M., Fujihira, S., Nezasa, S., Matsuda, T., Nagatani, Y., Maeda, S., Tamaki, M., Saito, A., Komeda, H.; Bacillus Calmette-Guerin intravesical instillation treatment for carcinoma in situ of the bladder. *Gan To Kagaku Ryoho* 26 (1999) 1869 - 1873

Paget S.; The distribution of secondary growths in cancer of the breast. *Lancet* 1 (1889) 99 - 101

Paik, M.L., Scolieri, M.J., Brown, S.L., Spirnak, J.P., Resnick, M.I.; Limitations of computerized tomography in staging invasive bladder cancer before radical cystectomy. *J. Urol.* 163 (2000) 1693 - 1696

Pallesen, L.T., Berglund, L., Rasmussen, L.K., Petersen, T.E., Rasmussen, J.T.; Isolation and characterization of MUC15, a novel cell membrane-associated mucin. *Eur. J. Biochem.* 269 (2002) 2755 - 2763

Pallesen, L.T., Pedersen, L.R., Petersen, T.E., Knudsen, C.R., Rasmussen, J.T.; Characterization of human mucin (MUC15) and identification of ovine and caprine orthologs. *J. Dairy Sci.* 91 (2008) 4477 - 4483

Pantel, K., Von Knebel Doeberitz, M., Izbicki, J.R., Riethmuller, G.; Disseminated tumor cells: diagnosis, prognostic relevance, phenotyping and therapeutic strategies. *Chirurg* 68 (1997) 1241 - 1250



- Parsons, C.L., Shrom, S.H., Hanno, P.M., Mulholland, S.G.; Bladder surface mucin. Examination of possible mechanisms for its antibacterial effect. *Invest. Urol.* 16 (1978) 196 - 200
- Perez, B.H., Gipson, I.K.; Focus on Molecules: human mucin MUC16. *Exp. Eye Res.* 87 (2008) 400 - 401
- Porchet, N., Pigny, P., Buisine, M.P., Debailleul, V., Degand, P., Laine, A., Aubert, J.P.; Human mucin genes: genomic organization and expression of MUC4, MUC5AC and MUC5B. *Biochem. Soc. Trans.* 23 (1995) 800 - 805
- Pratt, W.S., Crawley, S., Hicks, J., Ho, J., Nash, M., Kim, Y.S., Gum, J.R., Swallow D.M.; Multiple transcripts of MUC3: evidence for two genes, MUC3A and MUC3B. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 275 (2000) 916 - 923
- Ramasubbu, N., Reddy, M.S., Bergey, E.J., Haraszthy, G.G., Soni, S.D., Levine, M.J.; Large-scale purification and characterization of the major phosphoproteins and mucins of human submandibular-sublingual saliva. *Biochem. J.* 280 (Pt 2) (1991) 341 - 352
- Ray, E.R., Chatterton, K., Khan, M.S., Thomas, K., Chandra, A., O'Brien, T.S.; Hexylaminolaevulinate 'blue light' fluorescence cystoscopy in the investigation of clinically unconfirmed positive urine cytology. *BJU Int.* 103 (2009) 1363 - 1367
- Rehn, L.; Blasengeschwülste bei Fuchsinarbeitern. *Arch. Klin. Chir.* 50 (1895) 588 - 600
- Reis, C.A., David, L., Correa, P., Carneiro, F., De Bolos, C., Garcia, E., Mandel, U., Clausen, H., Sobrinho-Simoes, M.; Intestinal metaplasia of human stomach displays distinct patterns of mucin (MUC1, MUC2, MUC5AC, and MUC6) expression. *Cancer Res.* 59 (1999) 1003 - 1007
- Retz, M., Lehmann, J., Roder, C., Plotz, B., Harder, J., Eggers, J., Pauluschke, J., Kalthoff, H., Stockle, M.; Differential mucin MUC7 gene expression in invasive bladder carcinoma in contrast to uniform MUC1 and MUC2 gene expression in both normal urothelium and bladder carcinoma. *Cancer Res.* 58 (1998) 5662 - 5666
- Retz, M., Lehmann, J., Szysnik, C., Zwank, S., Venzke, T., Roder, C., Kalthoff, H., Basbaum, C., Stockle, M.; Detection of occult tumor cells in lymph nodes from bladder cancer patients by MUC7 nested RT-PCR. *Eur. Urol.* 45 (2004) 314 - 319
- Retz, M., Lehmann, J., Wullich, B., Stockle, M.; After-care of bladder carcinoma. *Urologe A.* 40 (2001) 480 - 484
- Ribal, M.J., Mengual, L., Marin, M., Algaba, F., Ars, E., Fernandez, P.L., Oliva, R., Villavicencio, H., Alcaraz, A.; Molecular staging of bladder cancer with RT-PCR assay for CK20 in peripheral blood, bone marrow and lymph nodes: comparison with standard histological staging. *Anticancer Res.* 26 (2006) 411 - 419

Rose, M.C., Voynow, J.A.; Respiratory tract mucin genes and mucin glycoproteins in health and disease. *Physiol. Rev.* 86 (2006) 245 - 278

Rosenberg, R., Hoos, A., Mueller, J., Baier, P., Stricker, D., Werner, M., Nekarda, H., Siewert, J.R.; Prognostic significance of cytokeratin-20 reverse transcriptase polymerase chain reaction in lymph nodes of node-negative colorectal cancer patients. *J. Clin. Oncol.* 20 (2002) 1049 - 1055

Rübber, H.; Ätiologie und Risikofaktoren, Onkologische Kennzeichen, Neuroendokrine Tumoren/kleinzellige Karzinome. In: "Uroonkologie", Springer (Hrsg.), Berlin, 2009, 5th edition, 397 - 401, 455

Ruggieri, M.R., Balagani, R.K., Rajter, J.J., Hanno, P.M.; Characterization of bovine bladder mucin fractions that inhibit *Escherichia coli* adherence to the mucin deficient rabbit bladder. *J. Urol.* 148 (1992) 173 - 178

Ruggieri, M.R., Hanno, P.M., Samadzadeh, S., Johnson, E.W., Levin, R.M.; Heparin inhibition of increased bacterial adherence following overdistension, ischemia and partial outlet obstruction of the rabbit urinary bladder. *J. Urol.* 136 (1986) 132 - 135

Sasaki, M., Yamato, T., Nakanuma, Y.; Expression of sialyl-Tn, Tn and T antigens in primary liver cancer. *Pathol. Int.* 49 (1999) 325 - 331

Schmahl, D., Habs, M., Lorenz, M., Wagner, I.; Occurrence of second tumors in man after anticancer drug treatment. *Cancer Treat. Rev.* 9 (1982) 167 - 194

Schoder, H., Larson, S.M.; Positron emission tomography for prostate, bladder, and renal cancer. *Semin. Nucl. Med.* 34 (2004) 274 - 292

Schwartz, D.A.; Helminths in the induction of cancer II. *Schistosoma haematobium* and bladder cancer. *Trop. Geogr. Med.* 33 (1981) 1 - 7

Seiler, R., Von Gunten, M., Thalmann, G.N., Fleischmann, A.; Pelvic lymph nodes: distribution and nodal tumour burden of urothelial bladder cancer. *J. Clin. Pathol.* 63 (2010) 504 - 507

Seraj, M.J., Thomas, A.R., Chin, J.L., Theodorescu, D.; Molecular determination of perivesical and lymph node metastasis after radical cystectomy for urothelial carcinoma of the bladder. *Clin. Cancer Res.* 7 (2001) 1516 - 1522

Shankar, V., Pichan, P., Eddy, R.L.Jr., Tonk, V., Nowak, N., Sait, S.N., Shows, T.B., Schultz, R.E., Gotway, G., Elkins, R.C., Gilmore, M.S., Sachdev, G.P.; Chromosomal localization of a human mucin gene (MUC8) and cloning of the cDNA corresponding to the carboxy terminus. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 16 (1997) 232 - 241

Sharma, P., Dudus, L., Nielsen, P.A., Clausen, H., Yankaskas, J.R., Hollingsworth, M.A., Engelhardt, J.F.; MUC5B and MUC7 are differentially expressed in mucous and serous cells of submucosal glands in human bronchial airways. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 19 (1998) 30 - 37

Sheryka, E., Wheeler, M.A., Hausladen, D.A., Weiss, R.M.; Urinary interleukin-8 levels are elevated in subjects with transitional cell carcinoma. *Urology* 62 (2003) 162 - 166

Shrom, S.H., Parsons, C.L., Mulholland, S.G.; Vesical defense: further evidence for a charge-related mucosal anti-adherence mechanism. *Surg. Forum* 29 (1978) 632 - 633

Sievert, K.D., Amend, B., Nagele, U., Schilling, D., Bedke, J., Horstmann, M., Hennenlotter, J., Kruck, S., Stenzl, A.; Economic aspects of bladder cancer: what are the benefits and costs? *World J. Urol.* 27 (2009) 295 - 300

Singhal, A., Hakomori, S.; Molecular changes in carbohydrate antigens associated with cancer. *Bioessays* 12 (1990) 223 - 230

Skinner, D.G., Daniels, J.R., Russell, C.A., Lieskovsky, G., Boyd, S.D., Nichols, P., Kern, W., Sakamoto, J., Krailo, M., Groshen, S.; The role of adjuvant chemotherapy following cystectomy for invasive bladder cancer: a prospective comparative trial. *J. Urol.* 145 (1991) 459 - 464

Sobin, L.H., Wittekind, C. "TNM Classification of Malignant Tumours", John Wiley & Sons (Hrsg.), New York, 2002, 6th edition, 199 - 202

Sonesson, M., Wickstrom, C., Kinnby, B., Ericson, D., Matsson, L.; Mucins MUC5B and MUC7 in minor salivary gland secretion of children and adults. *Arch. Oral Biol.* 53 (2008) 523 - 527

Stein, J.P., Grossfeld, G.D., Ginsberg, D.A., Esrig, D., Freeman, J.A., Figueroa, A.J., Skinner, D.G., Cote, R.J.; Prognostic markers in bladder cancer: a contemporary review of the literature. *J. Urol.* 160 (1998) 645 - 659

Stein, J.P., Lieskovsky, G., Cote, R., Groshen, S., Feng, A.C., Boyd, S., Skinner, E., Bochner, B., Thangathurai, D., Mikhail, M., Raghavan, D., Skinner, D.G.; Radical cystectomy in the treatment of invasive bladder cancer: long-term results in 1,054 patients. *J. Clin. Oncol.* 19 (2001) 666 - 675

Steven, K., Poulsen, A.L.; Radical cystectomy and extended pelvic lymphadenectomy: survival of patients with lymph node metastasis above the bifurcation of the common iliac vessels treated with surgery only. *J. Urol.* 178 (2007) 1218 - 1223

Stöckle, M., Meyenburg, W., Wellek, S., Voges, G.E., Rossmann, M., Gertenbach, U., Thuroff, J.W., Huber, C., Hohenfellner, R.; Adjuvant polychemotherapy of nonorgan-confined bladder cancer after radical cystectomy revisited: long-term results of a controlled prospective study and further clinical experience. *J. Urol.* 153 (1995) 47 - 52

Stöckle, M., Wellek, S., Meyenburg, W., Voges, G.E., Fischer, U., Gertenbach, U., Thuroff, J.W., Huber, C., Hohenfellner, R.; Radical cystectomy with or without adjuvant polychemotherapy for non-organ-confined transitional cell carcinoma of the urinary bladder: prognostic impact of lymph node involvement. *Urology* 48 (1996) 868 - 875

Suttman, H., Kamradt, J., Lehmann, J., Stockle, M.; Improving the prognosis of patients after radical cystectomy. Part I: the role of lymph node dissection. *BJU Int.* 100 (2007) 1221 - 1224

Syrigos, K.N., Deonarain, D.M., Karayiannakis, A., Waxman, J., Krausz, T., Pignatelli, M.; Epithelial mucin expression in bladder cancer: correlation with pathological and clinical parameters. *Urol. Res.* 28 (2000) 241 - 245

Takahashi, A., Tsukamoto, T., Tobisu, K., Shinohara, N., Sato, K., Tomita, Y., Komatsubara, S., Nishizawa, O., Igarashi, T., Fujimoto, H., Nakazawa, H., Komatsu, H., Sugimura, Y., Ono, Y., Kuroda, M., Ogawa, O., Hirao, Y., Hayashi, T., Tsushima, T., Kakehi, Y., Arai, Y., Ueda, S., Nakagawa, M.; Radical cystectomy for invasive bladder cancer: results of multi-institutional pooled analysis. *Jpn. J. Clin. Oncol.* 34 (2004) 14 - 19

Toribara, N.W., Gum, J.R.Jr., Culhane, P.J., Lagace, R.E., Hicks, J.W., Petersen, G.M., Kim, Y.S.; MUC-2 human small intestinal mucin gene structure. Repeated arrays and polymorphism. *J. Clin. Invest.* 88 (1991) 1005 - 1013

Utsunomiya, T., Yonezawa, S., Sakamoto, H., Kitamura, H., Hokita, S., Aiko, T., Tanaka, S., Irimura, T., Kim, Y.S., Sato, E.; Expression of MUC1 and MUC2 mucins in gastric carcinomas: its relationship with the prognosis of the patients. *Clin. Cancer Res.* 4 (1998) 2605 - 2614

Vinall, L.E., Hill, A.S., Pigny, P., Pratt, W.S., Toribara, N., Gum, J.R., Kim, Y.S., Porchet, N., Aubert, J.P., Swallow, D.M.; Variable number tandem repeat polymorphism of the mucin genes located in the complex on 11p15.5. *Hum. Genet.* 102 (1998) 357 - 366

Voges, G.E., Tauschke, E., Stockle, M., Alken, P., Hohenfellner, R.; Computerized tomography: an unreliable method for accurate staging of bladder tumors in patients who are candidates for radical cystectomy. *J. Urol.* 142 (1989) 972 - 974

Walsh, M.D., Hohn, B.G., Thong, W., Devine, P.L., Gardiner, R.A., Samarasinghe, M.L., MCGuckin, M.A.; Mucin expression by transitional cell carcinomas of the bladder. *Br. J. Urol.* 73 (1994) 256 - 262

Walsh, M.D., Mcguckin, M.A., Devine, P.L., Hohn, B.G., Wright, R.G.; Expression of MUC2 epithelial mucin in breast carcinoma. *J. Clin. Pathol.* 46 (1993) 922 - 925

Weitz, J., Kienle, P., Magener, A., Koch, M., Schrodell, A., Willeke, F., Autschbach, F., Lacroix, J., Lehnert, T., Herfarth, C., Von Knebel Doeberitz, M.; Detection of disseminated colorectal cancer cells in lymph nodes, blood and bone marrow. *Clin. Cancer Res.* 5 (1999) 1830 - 1836

Williams, S.J., Mcguckin, M.A., Gotley, D.C., Eyre, H.J., Sutherland, G.R., Antalis, T.M.; Two novel mucin genes down-regulated in colorectal cancer identified by differential display. *Cancer Res.* 59 (1999) 4083 - 4089

Williams, S.J., Wreschner, D.H., Tran, M., Eyre, H.J., Sutherland, G.R., Mcguckin, M.A.; Muc13, a novel human cell surface mucin expressed by epithelial and hemopoietic cells. *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 18327 - 18336

Wu, A.M., Csako, G., Herp, A.; Structure, biosynthesis, and function of salivary mucins. *Mol. Cell Biochem.* 137 (1994) 39 - 55

Wu, G.J., Wu, M.W., Wang, S.W., Liu, Z., Qu, P., Peng, Q., Yang, H., Varma, V.A., Sun, Q.C., Petros, J.A., Lim, S.D., Amin, M.B.; Isolation and characterization of the major form of human MUC18 cDNA gene and correlation of MUC18 over-expression in prostate cancer cell lines and tissues with malignant progression. *Gene* 279 (2001) 17 - 31

Yamaguchi, N., Watanabe, S., Okubo, T., Takahashi, K.; Work-related bladder cancer risks in male Japanese workers: estimation of attributable fraction and geographical correlation analysis. *Jpn. J. Cancer Res.* 82 (1991) 624 - 631

Yang, X.J., Lecksell, K., Epstein, J.I.; Can immunohistochemistry enhance the detection of micrometastases in pelvic lymph nodes from patients with high-grade urothelial carcinoma of the bladder? *Am. J. Clin. Pathol.* 112 (1999) 649 - 653

Zhang, S., Zhang, H.S., Reuter, V.E., Slovin, S.F., Scher, H.I., Livingston, P.O.; Expression of potential target antigens for immunotherapy on primary and metastatic prostate cancers. *Clin. Cancer Res.* 4 (1998) 295 - 302

## 7 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Darstellung der Tumorlokalisation gemäß UICC 2002  
Schematische Darstellung  
([http://www.medizin-medien.at/mm/mm005/blasenkarz\\_grafik.jpg](http://www.medizin-medien.at/mm/mm005/blasenkarz_grafik.jpg))  
(<http://www.blasenkrebs-shb.de/images/medizinisches/TNM-Blase.jpg>)  
Stand: 12.11.2010

Abbildung 2: Lokalisation des MUC7 Gens auf Chromosom 4  
Genetics Home Reference, U.S. National Library of Medicine  
(<http://ghr.nlm.nih.gov/dynamicImages/chromomap/MUC7.jpeg>)  
Stand: 25.10.2011

Die Abbildungen 3-17 wurden selbst erstellt.

## 8 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen Personen bedanken, die diese Arbeit erst ermöglicht haben.

Ich danke Herrn Univ.-Prof. Dr. Jürgen E. Gschwend, an dessen Klinik ich meine Forschungen und diese Arbeit durchführen durfte.

Ich danke Frau apl. Prof. Dr. Margitta Retz, leitende Oberärztin im Bereich Urologische Onkologie des Universitätsklinikums rechts der Isar in München, für die Überlassung des Themas und für ihre stets vorhandene Unterstützung.

Ich danke Herrn Dr. Michael Autenrieth, Oberarzt der Urologischen Klinik und Poliklinik der Technischen Universität München, für die Einbindung und sehr gute Betreuung dieser Arbeit im Rahmen der von ihm durchgeführten LEA-Studie.

Ein besonderer Dank gilt meinem Betreuer Herrn Dr. rer. nat. Roman Nawroth, Leiter des Forschungslabors der Urologischen Klinik und Poliklinik der Technischen Universität München, für die in allen wissenschaftlichen Belangen herausragende und stets höchst kompetente Hilfe. Es gab kein Hindernis, welches Herr Nawroth nicht aus dem Weg zu räumen verstanden hätte. Die Tür zu seinem Büro stand stets für mich offen.

Ein weiterer besonderer Dank geht an Frau Monika Moissel für die ausgezeichnete und sehr zeitintensive Unterstützung während des gesamten labortechnischen Handlungsablaufs. Auch wenn es sie sicherlich das ein oder andere graue Haar gekostet haben mag, hatte Frau Moissel neben all der Arbeit mit ihren eigenen Projekten jederzeit ein offenes Ohr für mich und wenn nötig auch eine helfende Hand.

Ein ganz herzlicher Dank geht an meine Mitstreiter aus unserer Arbeitsgruppe, Frau Saskia Semmlack, Frau Friederike Lier und Herrn Christoph Oehler. Wir haben das Projekt als Kollegen begonnen und nach vielen gemeinsamen Höhen und Tiefen als Freunde das Ziel erreicht. Ich wünsche allen eine erfolgreiche Zukunft im ärztlichen Beruf.

Von ganzem Herzen danke ich meinen Eltern Angela Große Wiesmann und Heinrich Große Wiesmann, welche mich sowohl beruflich als auch privat in jeder Lebenslage uneingeschränkt unterstützt haben und stets vom Gelingen meiner Dissertation überzeugt waren. Auch als Korrekturleser waren sie mir eine willkommene Hilfe.

Ein herzlicher Dank gilt auch meinen anderen Familienmitgliedern, welche mich ebenfalls an vielen Stellen während meiner Berufsausbildung unterstützt und gefördert haben. Im Besonderen sind dabei zu nennen: Meine Großmütter Hannelore Rösener und Toni Große Wiesmann, meine Tante Anne Große Wiesmann, meine beiden Onkel Klaus Große Wiesmann und Gregor Große Wiesmann und natürlich mein Bruder Philip Große Wiesmann.

Ich danke meinen besten Freunden, die jederzeit ein offenes Ohr hatten, aufmunternde Worte für mich bereit hielten und für deren Freundschaft ich von ganzem Herzen dankbar bin: Jan Stromp, Philipp Aschoff, Babak Nohadani, Christine und Alexander Kopp, Helena Henrich, Holger Benschaid, Hendrik und Jessica Kerstan, Daniel Rasmussen, Cindy Hutcap, Matthias Mayer, Isabel Kieseewetter, Kai Semrau, Ronald Mayer und Jasmin Moussalli.

Ich danke allen Mitarbeitern der pflegerischen und operativen Bereiche der Klinik für Urologie am Klinikum rechts der Isar für die kompetente und freundliche Hilfe und die kollegiale Atmosphäre.

Abschließend möchte ich den vielen ungenannten Patienten danken, durch deren vertrauensvolle Einwilligung diese Arbeit erst ermöglicht wurde.



## 9 Lebenslauf

### **Persönliche Daten:**

Name: Jan Henrik Große Wiesmann  
Geburtsdatum: 04.06.1980  
Geburtsort: Wuppertal  
Anschrift: Humboldtstr. 16, 42283 Wuppertal

### **Schulbildung:**

1986 bis 1990 Grundschule in Haßlinghausen  
1990 bis 1999 Städtisches Gymnasium in Gevelsberg  
1999 Allgemeine Hochschulreife

### **Zivildienst und Berufsausbildung:**

07/1999 bis 07/2000 Zivildienst als Rettungssanitäter beim DRK Schwelm  
10/2000 bis 12/2001 Berufsausbildung zum Rettungsassistenten in Köln  
01/2002 bis 04/2002 Rettungsassistent in Festanstellung beim DRK Schwelm

### **Hochschulstudium:**

04/2002 Beginn des Studiums der Humanmedizin an der  
Ludwig-Maximilians-Universität München  
08/2004 Ärztliche Vorprüfung  
10/2004 bis 06/2009 Studium der Humanmedizin an der  
Technischen Universität München  
06/2009 Staatsexamen im Fach Humanmedizin  
06/2009 bis 02/2011 Promotionsstudium an der Technischen Universität  
München

### **Famulaturen während des Studiums:**

02/2005 Anästhesiologie, Klinikum rechts der Isar München  
08/2005 Mund-Kiefer-Gesichtschirurgie, Charité Berlin  
02/2007 Gynäkologie, Praxis Dr. Stromp Tübingen  
09/2007 Urologie, Klinikum rechts der Isar München

**Praktisches Jahr:**

02/2008 bis 06/2008 Innere Medizin, Rotkreuzkrankenhaus München

06/2008 bis 10/2008 Kinderchirurgie, Krankenhaus München-Schwabing

10/2008 bis 01/2009 Anästhesiologie, Klinikum rechts der Isar München

**Dissertation:**

04/2007 bis 01/2014 Dissertation mit dem Thema " Nachweis von disseminierten Tumorzellen anhand der Genexpression von MUC7 in pelvinen Lymphknoten bei Patienten mit Urothelkarzinom der Harnblase als neuem diagnostischem Tumormarker" an der Urologischen Klinik und Poliklinik am Klinikum rechts der Isar der TU München

**Weitere Studententätigkeiten:**

10/2004 bis 02/2008 Fachschaftsmitglied der Fakultät für Medizin

2005 bis 2007 Gründer und Leiter des „Arbeitskreis Notfallmedizin“

2005 bis 2006 Gewählter Studentenvertreter für das Studienjahr

2006 bis 2007 Gewählter Studentenvertreter für das Studienjahr

04/2005 bis 02/2008 Mitglied der Bundesvertretung der Medizinstudierenden in Deutschland (bvmd e.V.)

05/2006 bis 05/2007 Leiter der bundesweiten bvmd-Arbeitsgruppe „Medizin und Menschenrechte“ sowie Mitglied im Vorstand der bvmd e.V.

09/2008 Organisator des IPOKRATES Students Seminar „Integrated Physiology“ am Klinikum rechts der Isar mit Prof. R. Schwartzstein (Dekan der Harvard Medical University, USA) sowie Prof. H. Manning und Prof. J. Leiter (Dartmouth Medical School, USA)

**Berufliche Tätigkeit:**

seit 02/2011 Assistenzarzt an der Klinik für Anästhesiologie, Notfallmedizin, Intensivmedizin und Schmerztherapie am HELIOS-Klinikum Wuppertal



Manchmal vermag uns ein durch den Asphalt brechender Löwenzahn die tägliche Frage nach dem Sinn des Lebens eindrücklicher und überzeugender zu beantworten, als eine ganze Bibliothek philosophischer Schriften.

*(unbekannt)*





