Aus der ehem. Abteilung Zytopathologie
(Prof. Dr. med. M. Droese)
im Zentrum Pathologie
der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

Veränderungen am Protoonkogen MDM2 bei Urothelkarzinomen in Bezug auf bekannte Risikofaktoren – Relation von Umweltfaktoren und intrazellulärem Signalweg?

INAUGURAL – DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades

der Medizinischen Fakultät der
Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von

Matthias Daniel Woitow

aus

Cottbus

Göttingen 2009

Dekan:	Prof. Dr. med. C. Frömmel
I. Berichterstatter:	Prof. Dr. rer. nat. T. Schlott
II. Berichterstatter/in:	Prof. Dr. rer. nat. C. Gründker
III. Berichterstatter/in:	

Tag der mündlichen Prüfung:

Inhaltsverzeichnis

ABBILDUNGSVERZEICHNIS IV

TABELLENVERZEICHNIS V

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS VII

1. EINLEITUNG 1

1.1 Epidemiologie des Urothelkarzinoms 1

1.2 Tumorgenese des Urothelkarzinoms 2

1.2.1 Ätiologie 2

1.2.1.1 Einflüsse aus beruflicher Schadstoffexposition 2

1.2.1.2 Faktoren aus Ernährung und Genussmittelgebrauch 3

1.2.1.3 Sozialmedizinische, habituelle und hereditäre Faktoren 4

1.2.1.4 Koinzidente Erkrankungen 5

1.2.1.5 Faktoren aus der Behandlung koinzidenter Erkrankungen 5

1.2.2 Formale Pathologie, Progression und Prognose 5

1.3 Wachstum und das Zellzykluskonzept 8

1.4 Vereinfachter Überblick zum p53-MDM2-p14ARF-System 9

1.5 Charakterisierung von MDM2 9

1.5.1 Einordnung 9

1.5.2 MDM2-Genstruktur und Domänen 10

1.5.3 MDM2-Spleißvarianten 11

1.5.4 p53-abhängige und p53-unabhängige Funktionen von MDM2 12

1.5.5 MDM2 beim Harnblasenkarzinom 14

1.6 Ziele der Arbeit 15

2. MATERIAL UND METHODEN 17

2.1 Materialien 17

2.1.1 Patienten und Tumorgewebe 17

2.1.2 Eingesetzte Chemikalien 17

2.1.3 Verwendete kommerzielle Reaktionsansätze (sog. Kits) 17

2.1.4 Puffer und weitere Lösungen 18

2.1.5 Technisches Zubehör 18

2.1.6 Verbrauchsmaterialien 18

2.2 Methoden 18

2.2.1 Aufarbeitung des Untersuchungsgutes 18

2.2.1.1 Isolierung der RNA und DNA 18

2.2.1.2 Messungen der RNA-Konzentrationen im Photometer 19

2.2.1.3 Umschreibung der RNA in cDNA 20

2.2.1.4 Aufreinigung der DNA 20

2.2.2 Analyse genomischer Abschnitte von MDM2 und Transkriptionsanalyse 21

2.2.3 Analyse molekulargenetischer Veränderungen in Gensequenzen von MDM2 mittels automatisierter Sequenzierung 23

2.2.4 Untersuchung auf MDM2-Mikrosatelliteninstabilität 23

2.2.5 Darstellung der MDM2-mRNA durch *in-situ*-Hybridisierung (ISH) 24

2.2.5.1 Vorbereitende Arbeitsschritte 25

2.2.5.2 Herstellung der RNA-Sonden 25

2.2.5.3 Hybridisierung am Paraffinmaterial 26

2.2.5.4 Visualisierung 28

2.2.6 Immunhistochemischer Nachweis des Proteins MDM2 28

2.2.6.1 Herstellung und Vorbereitung der Schnitte 28

2.2.6.2 Färbeverfahren nach der APAAP-Methode 29

2.2.6.3 Charakterisierung des MDM2-Antikörpers 29

2.2.6.4 Das Vorgehen im Einzelnen 29

2.2.6.5 Lichtmikroskopische Auswertung immunhistochemischer Färbungen 30

2.2.7 Erhebung epidemiologischer Daten 30

3. ERGEBNISSE 31

3.1 Überblick 31

3.2 DNA-Untersuchungen von MDM2 32

3.2.1 Analyse eines kodierenden Abschnittes des MDM2-Genes (Exon 12) 32

3.2.2 Analyse zweier das MDM2-Gen flankierende Mikrosatelliten: MSI 12S80 und 12S83 33

3.3 RNA-Untersuchungen von MDM2 33

3.3.1 Relation von Ausbreitungs- und Differenzierungsgrad der HBCA zur Verteilung der Spleißvarianten von MDM2 34

3.3.2 Relation von Risikofaktoren (Anamnese) und MDM2-Varianten 36

3.3.3 Verteilungsmuster der Spleißvarianten bei Erst- vs. Rezidivtumor in Berücksichtigung der Tumorstadien 38

3.4 Exemplarische *in-situ*-Hybridisierungen von MDM2 am Paraffinmaterial 41

3.5 Immunhistochemische Untersuchung von MDM2 42

3.5.1 MDM2-Protein und Tumorstadium / Differenzierungsgrad 43
3.5.2 MDM2-Protein und MDM2-Spleißvariantenpositivität 43
3.5.3 MDM2-Protein bei Vorliegen definierter MDM2-Spleißvarianten 45
3.5.4 MDM2-Protein bei Erstmanifestation von Urothelkarzinomen bzw. Rezidiven 47

4. DISKUSSION 48

4.1 Epidemiologische Befunde 48

4.2 MDM2- Mutations- und Mikrosatellitenanalyse 48

4.3 MDM2-Spleißvarianten und MDM2-mRNA (fl) beim Urothelkarzinom 49
4.3.1 MDM2-Spleißvarianten in Relation zum Tumorprogress 50
4.3.2 Vorliegen einzelner MDM2-Spleißvarianten bei Tumorprogress 52
4.3.3 Vorliegen von MDM2-Spleißvarianten: Relation zur Exposition 52
4.3.4 MDM2-Spleißvarianten bei Erst- vs. Rezidivtumoren 54

4.4 Immunhistochemische Daten von MDM2 55
4.4.1 Immunhistochemischer MDM2-Nachweis in Relation zu Tumorprogress und MDM2-sv-Positivität 56
4.4.2 Immunhistochemischer MDM2-Nachweis in Relation zu einzelnen MDM2-sv 56

4.5 Diskussion der Datengrundlage 57
4.5.1 Datenauswertung und statistisches Niveau 58
4.5.2 Ausschlussgründe 58
4.5.3 Diskussion der histopathologischen Datengrundlage 59
4.5.4 Diskussion der Anamnese als Datengrundlage: Expositionsanamnese 60
4.5.5 Diskussion der genutzten methodischen Verfahren 61

4.6 Nicht dargestellte Befunde für p14ARF 61

4.7 Befunde anderer Arbeitsgruppen am identischen Patientenkollektiv 61

4.8 Spleißvarianten anderer Proteine und Einordnung 62

5. ZUSAMMENFASSUNG 63

6. ANHANG: TAB. 6.1 BIS 6.18 65

7. LITERATUR 77

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1: Inzidenz und Mortalität des HBCA nach Altersgruppen in Deutschland 2004. 1

Abb. 1.2: T-Klassifikation der Urothelkarzinome. 6

Abb. 1.3: Domänen des MDM2-Proteins im linearen Modell. 11

Abb. 2.1: Vorbereitung der RNA-Sondenherstellung über PCR-Verfahren. 25

Abb. 3.1: Heterozygote Mutation von MDM2 Exon 12. 32

Abb. 3.2: Mikrosatelliteninstabilität am MSI 12S83. 33

Abb. 3.3: Beispielhafte Darstellung der MDM2-RNA und Spleißvarianten mittels Agarose-Gel-Elektrophorese. 34

Abb. 3.4: Häufigkeit des Vorliegens zweier MDM2-Spleißvarianten in Relation zum Tumorstadium. 35

Abb. 3.5: Verteilung der Nicht-Rezidive vs. Rezidive bezüglich Tumorstadium und Differenzierungsgrad. 38

Abb. 3.6: Vorliegen ausgewählter Spleißvarianten nach Tumorstadien der HBCA. 39

Abb. 3.7: Darstellung selektionierter Spleißvarianten nach Differenzierungsgrad der HBCA. 40

Abb. 3.8: MDM2-ISH-Positivprobe. 41

Abb. 3.9: MDM2-ISH-Negativprobe. 41

Abb. 3.10: MDM2-Immunhistochemie. 42

Abb. 3.11: MDM2-Immunoreaktivität nach Ausbreitungs- und Differenzierungsgrad. 43

Abb. 3.12: MDM2-Immunoreaktivität nach Progress und MDM2-sv-Positivität. 44

Abb. 3.13: MDM2-immunhistochemisch positive Urothelkarzinome nach Vorliegen vs. Fehlen von MDM2-Spleißvarianten. 45

Tabellenverzeichnis

Tab. 2.1: **Rezeptur für die cDNA-Synthese.** **20**

Tab. 2.2: **Standard-PCR-Protokoll.** **22**

Tab. 2.3: **Endmarkierung der PCR-Fragmente mittels Sequenzierreaktion.** **23**

Tab. 2.4: **Synthese der sense- und antisense-Sonde (1).** **26**

Tab. 2.5: **Synthese der sense- und antisense-Sonde (2).** **26**

Tab. 3.1: **Verteilung von Alter, Geschlecht, Stadium und Grading bei 54 HBCA-Fällen.** .. **31**

Tab. 3.2: **Expressionen von MDM2-Spleißvarianten in Relation zum histopathologischen Befund.** **35**

Tab. 3.3: **Spleißvarianten in Relation zum Risikoprofil (Anamnese).** **36**

Tab. 3.4: **Spleißvarianten bei den exponierten HBCA-Patienten in Relation zum jeweiligen Karzinogen.** **37**

Tab. 3.5: **Spleißvarianten-positive Fälle bei 39 Nichtrezidiven und 15 Rezidiven.** **40**

Tab. 3.6: **MDM2-sv-positive vs. -negative Urothelkarzinome nach MDM2-Protein-Positivität.** **44**

Tab. 3.7: **MDM2-negative und -positive Urothelkarzinome nach MDM2-Spleißvarianten-Positivität und -Varianten sowie Tumorstadium.** **46**

Tab. 6.1: **Spleißvarianten in Relation zum histopathologischen Befund.** **65**

Tab. 6.2: **Übersicht über sämtliche Fälle nach MDM2-sv und MDM2-IHC.** **66**

Tab. 6.3: **Spleißvarianten in Relation zum Risikoprofil (Anamnese).** **67**

Tab. 6.4: **Spleißvarianten bei den exponierten HBCA-Patienten in Relation zum jeweiligen Karzinogen.** **68**

Tab. 6.5: **Spleißvarianten-positive Fälle bei 39 Nichtrezidiven und 15 Rezidiven.** **69**

Tab. 6.6: MDM2-Immunoreaktivität in Relation zu Tumorstadium, Differenzierungsgrad und Spleißvariantenstatus. ……69

Tab. 6.7: MDM2-sv-positive vs. -negative Urothelkarzinome nach MDM2-Protein-Positivität. ……..…70

Tab. 6.8: MDM2-negative und -positive Urothelkarzinome nach MDM2-sv-Positivität und einzelnen MDM2-Varianten sowie dem Tumorstadium. ……70

Tab. 6.9: Dauer des Nikotinkonsums bei Rauchern und ehemaligen Rauchern nach MDM2-sv. ……71

Tab. 6.10: Täglicher Nikotinkonsum bei Rauchern und ehemaligen Rauchern nach MDM2-sv. ……72

Tab. 6.11: Semiquanititative MDM2-IHC bei Rezidiven vs. Nicht-Rezidiven. ……...72

Tab. 6.12: Semiquantitative MDM2-IHC nach Prognosefaktor. ……73

Tab. 6.13: Verwendete Chemikalien. ……..…74

Tab. 6.14: PCR – *Primer*, Reaktionsbedingungen und Größe der Amplikons. ……...75

Tab. 6.15: Verwendete kommerzielle Reaktionsansätze (sog. Kits). ….……75

Tab. 6.16: Verwendete Puffer und weitere Lösungen. ….……..……75

Tab. 6.17: Technisches Zubehör. ……76

Tab. 6.18: Verbrauchsmaterial. ……76

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
bp	Basenpaare
bspw.	beispielsweise
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
Da	Dalton
ddNTPs	Didesoxyribonukleosid-Triphosphate
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dNTPs	Desoxyribonukleosid-Triphophate
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
engl.	englisch
ER	Exraucher
et al.	et alli (lat.), und andere
etc.	et cetera (lat.), und so weiter
FA	Familienanamnese
G	Grading, Differenzierungsgrad
h	Stunde(n)
HBCA	Harnblasenkarzinom(e)
IHC	Immunhistochemie
ISH	*in-situ*-Hybridisierung
k	Kilo (10^3)
Kap.	Kapitel
KG	Kontrollgruppe
l	Liter
LOH	*loss of heterozygoty* (Verlust der Heterozygotät bei MSI)
m	Meter
M	Mol, molar
MDM2	*murine double minute 2*
min, auch „ ’ “	Minute(n)
mRNA	messenger-RNA (sog. Botenribonukleinsäure)
MS bzw. MSI	Mikrosatelliten bzw. Mikrosatelliten-Loci
mw	Mittelwert
µ	Mikro (10^{-6})
N	Gesamtzahl
n	Größe der Untergruppe

neg, auch „ - “	negativ
nm	Nanometer (10^{-9})
NR	Nichtraucher
o.g.	oben genannte(r)
p	Piko (10^{-12})
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
pos, auch „ + “	positiv
PUNLMP	papilläre urotheliale Neoplasie niedrig malignen Potentials
py	*packyear*, Packungsjahre bei Rauchern
	(Konsumdauer in Jahren multipliziert mit Packungen je Tag)
R	Raucher
Rez	Rezidiv(e)
rpm	*rounds per minute* (Umdrehungen pro Minute)
RT	Raumtemperatur
s, auch „ ’’ “	Sekunde(n)
sog.	so genannte, so genannter
St.	Stück
STR’s	*short tandem repeat*, Mikrosatelliten
sv	Spleißvariante(n)
Tab.	Tabelle
Temp.	Temperatur
u.a.	unter anderem, unter anderen
UICC	*International Union Against Cancer*
usw.	und so weiter
UV-Licht	ultraviolettes Licht
UV-Filter	Filter, die ultraviolettes Licht blockieren
V	Volt
vgl.	vergleiche
vs.	versus (lat.), gegen, gegenüber
v/v	Volumenprozent
z.B.	zum Beispiel

1. Einleitung

Das Harnblasenkarzinom stellt eine der häufigsten malignen Erkrankungen weltweit dar. Mit dem demographischen Wandel und der damit verbundenen höheren Lebenserwartung steigt die Zahl der Krebserkrankungen in der Bevölkerung. Diese Altersabhängigkeit sowie eine höhere Erkrankungsinzidenz des männlichen Geschlechts belegten große Analysen auch für das Karzinom der ableitenden Harnwege.

Urothelkarzinome stellen eine ausgesprochen heterogene Gruppe von Erkrankungen dar. Etwa 20 – 30 % der Fälle weisen eine hohe genetische Instabilität mit der Folge frühen muskelinvasiven Wachstums und entsprechend rapide progredientem klinischem Verlauf auf.

Die Identifikation prognoserelevanter Faktoren aus Umwelt und Genen ist seit Jahren Gegenstand intensiver klinischer, epidemiologischer und genetischer Forschung.

1.1 Epidemiologie des Urothelkarzinoms

Die Inzidenz der malignen Erkrankung der ableitenden Harnwege (mitteleuropäisch in der Regel Urothelkarzinome) hängt von ethnisch-geographischen Faktoren, dem Alter und dem Geschlecht ab. Pro Jahr erkranken ca. 356.000 Menschen (274.000 Männer, 83.000 Frauen) weltweit neu am Harnblasenkarzinom (HBCA), in der Folge versterben davon etwa 130.000 Patienten an dieser Erkrankung (WHO-Statistik des Jahres 2002, nach Parkin 2008, S. 16).

In Deutschland steht das Urothelkarzinom bei Männern mit 8,6 % an Platz 4 und bei Frauen mit 3,5 % an Platz 8 der Liste maligner Erkrankungen (Altwein 2007). Jährlich

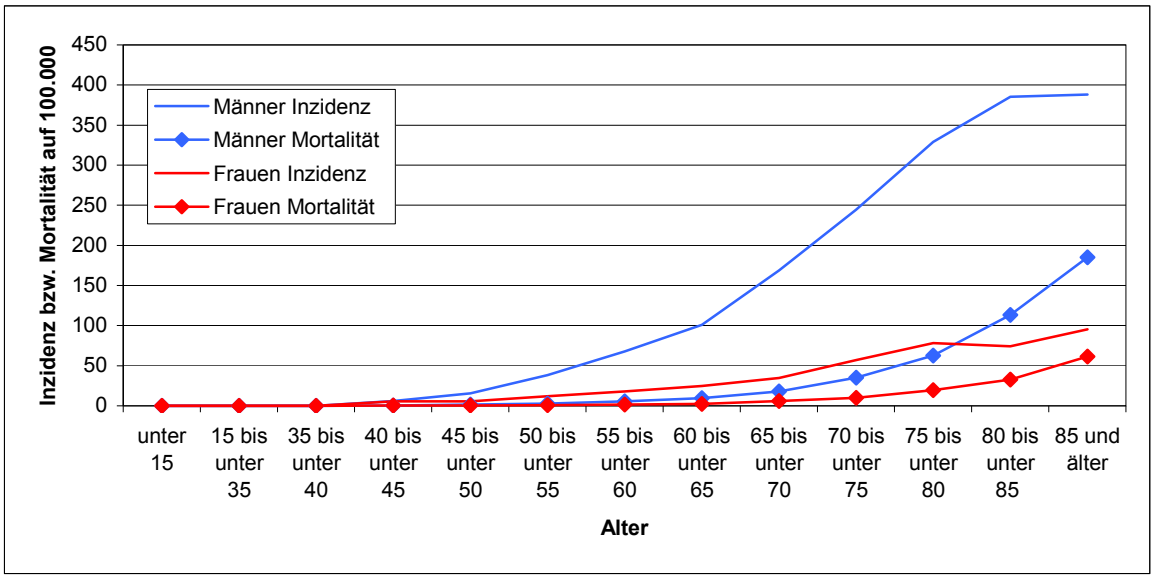

Abb. 1.1: Inzidenz und Mortalität des HBCA nach Altersgruppen in Deutschland 2004. (Daten aus der Schätzung des Robert-Koch-Institutes, nach Batzler et al. 2008, S. 84).

erkranken etwa 24.750 bis 28.750 Menschen deutschlandweit an einer bösartigen Erkrankung der Harnblase, etwa 5000 sterben daran (Batzler et al. 2008). Männer sind etwa dreimal häufiger betroffen als Frauen (Hölzel 1996, Boring et al. 1993). Das Urothelkarzinom ist eine Erkrankung des fortgeschrittenen Lebensalters, die höchste Zahl an Neuerkrankungen wird im Alter zwischen 60 und 80 Jahren beobachtet. Bei Diagnosestellung sind Männer im Mittel 70, Frauen im Mittel 72 Jahre alt.
Für Amerika wird die jährliche Inzidenz mit 25,7 Männern bzw. 6,2 Frauen auf 100.000 Einwohner angegeben (Anton-Culver et al. 1992). In Großbritannien stieg die Inzidenz zwischen 1971 und 1998 um fast 60 %, dabei nahm die Zahl der Patientinnen überproportional zu (Hayne et al. 2004), auch hatten erkrankte Frauen eine signifikant erhöhte Mortalitätsrate, wahrscheinlich durch die späte Diagnosestellung bedingt (Micheli et al. 1998).
Ähnliche Trends zeigen die Niederlande (Kiemeney et al. 1996) mit einem Anstieg der altersstandardisierten Inzidenz bei Männern von 6,2 : 100.000 auf 12,6 : 100.000 bis zum Jahre 1990 und einem Rückgang der Erkrankungsrate in den Folgejahren, sowie Schweden mit einer Steigerung von 14,6 auf 33,5 bei 100.000 Männern bzw. 4,8 auf 8,8 bei 100.000 Frauen zwischen 1960 und 1993 (Thörn et al. 1997).

1.2 Tumorgenese des Urothelkarzinoms

1.2.1 Ätiologie

Seit der Publikation über „Blasengeschwülste bei Fuchsinarbeitern“ (Rehn 1895) stellt das Harnblasenkarzinom den Paradigmatumor einer chemisch induzierten Karzinogenese dar. Nach großen epidemiologischen Analysen sind zahlreiche unterschiedlichste Einflussgrößen aus Arbeitsleben, Genussmittelgebrauch, sozialem Status, Medikamenteneinnahme und Habitus von Relevanz mit unterschiedlicher Reliabilität und Validität für die Entwicklung solcher Tumore, wobei teilweise widersprüchliche Daten bezüglich der Blasenkarzinogenität einzelner Faktoren vorliegen.

1.2.1.1 Einflüsse aus beruflicher Schadstoffexposition

Die erwerbsmäßige Beschäftigung in metallbearbeitender, Gummi-, Kunststoff-, Farb- bzw. farbenverarbeitender, Druck- und Textilindustrie sowie im Bergbau geht ebenso wie der Kontakt mit Lösungsmitteln, Chrom, Zink, Arsen oder aromatischen Aminen mit einem erhöhten Risiko einher, am Harnblasenkarzinom zu erkranken (Chen CJ et al. 1985, Claude et al. 1986, Bates et al. 1992, Steenland et Palu 1999, Kälble 2001). Die ursprünglich eingesetzten Azofarbstoffe hatten dabei möglicherweise bereits nach

Expositionsdauern von weniger als einem Jahr transformierende Effekte (Case et al. 1954, Claude et al. 1988, Yamaguchi et al. 1991, Kvam et al. 2005).
Während nach Daten von Mastrangelo et al. (2002) die Beschäftigung in Textilfärbereien die Inzidenz eindeutig erhöht, belegen Zahlen von Serra et al. (2000) einen Effekt der Arbeit in der Textilindustrie nur bei höchstgradiger Exposition. Polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe (PAH) wurden wie Farben und Lösungsmittel in der Mehrzahl der Arbeiten (meist Fall-Kontroll-Studien) als Harnblasenkarzinogene angegeben (z.B. Gordon et al. 2004), wohingegen eine über 30 Jahre geführte Kohortenstudie keine erhöhte Morbidität durch PAH (Moulin et al. 2000), selbst in Koexposition mit Aluminium (Carta et al. 2004) zeigen konnte, und auch bei Arbeitnehmern der australischen Mineralölindustrie die Inzidenz des HBCA nicht erhöht war (Gun et al. 2006).
Obwohl die Beschäftigung in Hochrisikoberufen per definitionem die Wahrscheinlichkeit für das Auftreten eines HBCA erhöht, besteht regelhaft offenbar kein Einfluss auf Tumorstadium, Differenzierungsgrad oder Invasivität (Sturgeon et al. 1994).

1.2.1.2 Faktoren aus Ernährung und Genussmittelgebrauch

Unter den Genussmitteln gilt das inhalative Zigarettenrauchen als entscheidender Risikofaktor (z.B. Claude et al. 1988) und wird als Causa für die Entwicklung jedes zweiten Harnblasenkarzinoms angesehen (Blumentals et al. 2004). Die Dosis- und Zeitdauer-determiniert erhöhte Karzinominzidenz (Ugnat et al. 2004) nimmt nach Konsumbeendigung über die Jahre langsam ab (Lopez-Abente et al. 1991, Slattery et al. 1988, Claude et al. 1986). Golka et al. (2006) konnten bereits wenige Jahre nach Beendigung des Nikotinkonsums eine rückläufige Inzidenz demonstrieren.
Eine große europäische Kohortenstudie (> 429.000 Menschen) gibt für Raucher ein vierfach erhöhtes Risiko an, am HBCA zu erkranken, während ehemalige Raucher immerhin noch ein mehr als zweifach erhöhtes Risiko aufweisen. Der Beginn des Nikotinkonsums im frühen Jugendalter steigerte die Inzidenz zusätzlich (Bjerregaard et al. 2006). Ältere Studien implizieren den Einfluss des Rauchens auf den Anstieg der Inzidenz lediglich für männliches Rauchverhalten (Augustine et al. 1988), während Castelao et al. (2001) sogar eine an den Männern relativierte Übertoxizität des weiblichen Rauchverhaltens fanden. Pelucchi et al. (2002) und Puente et al. (2006) konnten diesbezüglich keine wesentlichen Unterschiede zwischen den Geschlechtern dokumentieren.
Über die Induktion des HBCA hinaus unterstützt *anhaltendes* Rauchverhalten den Progress zu höheren Tumorstadien und Entdifferenzierung, limitiert also die ohnehin eingeschränkte Prognose der weiterhin rauchenden Patienten (Sturgeon et al. 1994, Mohseni et al. 2004) und reduziert das rezidivfreie 3-Jahres-Überleben auf 45 %

gegenüber 57 % bei Nichtrauchern (Chen CH et al. 2007). Den Daten von Garcia Mediero et al. (2007) folgend bleibt das Rauchverhalten jedoch ohne Einfluss auf das Rezidivrisiko, ist aber mit fortgeschrittenem Stadium und Entdifferenzierung assoziiert (Wallerand et al. 2005), im Gegensatz zu einer Untersuchung von Raitanen et al. (1995), die dem Rauchen keinen Einfluss auf Tumorgröße, Stadium, Differenzierung und Metastasierung zuspricht, mit Sicherheit aber ein unabhängiger prognostischer Faktor für das 10-Jahres-Überleben ist. Hayes et al. (1993) beobachteten gegensätzlich, dass Tabakrauchen eher mit dem Vorliegen bzw. der Genese nicht-invasiver Urothelkarzinome assoziiert ist.

Ohne Effekt auf die Entwicklung von Blasenkarzinomen sind regelmäßiger Kaffeegenuss, die Verwendung der Süßstoffe Cyclamat und Saccharin (Viscoli et al. 1993, Pelucchi et al. 2006) und moderater, aber auch exzessiver alimentärer Alkoholkonsum (Pelucchi et al. 2002). Häufiger Genuss geräucherten Schinkens geht wahrscheinlich mit einer erhöhten Inzidenz einher (Michaud et al. 2006).

Regelmäßige obst- und gemüsereiche Ernährung mit zusätzlicher Vitamineinnahme blieb ohne Einfluss auf die Inzidenz (Michaud et al. 2002), auch vegane Ernährung mit erhöhter Aufnahme der Vitamine A, C, E und Folsäure hatte keine protektive Bedeutung beim weiblichen Geschlecht (Holick et al. 2005). Castelao et al. (2004) und Altwein (2007) konnten jedoch eine reduzierte Erkrankungsrate bei Rauchern demonstrieren, die sich „obst- und gemüseakzentuiert“ ernährten. Regelmäßige Supplementation von Vitamin E über 10 Jahre konnte die HBCA-Inzidenz senken (Jacobs et al. 2002).

1.2.1.3 Sozialmedizinische, habituelle und hereditäre Faktoren

Menschen, die länger als 40 Jahre in einer Großstadt (> 100.000 Einwohner) leben, erkranken statistisch häufiger an einem HBCA als die alterskorrelierte Land- und Kleinstadtbevölkerung (Castaño-Vinyals et al. 2008), während gehobenes Bildungsniveau, hohe Miktionsfrequenz (Radosavljevic et al. 2001) und sog. Junggesellentum (Bento et Barros 1997) präventive Faktoren sind. Für eine hohe Flüssigkeitsaufnahme (mehr als 2 l täglich) bzw. entsprechend hohe Miktionsfrequenz wird sogar eine relative Risikoreduktion von ca. 50 % angegeben (Altwein 2007).

Der für kardiovaskuläre Erkrankungen, aber auch für die Entwicklung des Kolorektalen Karzinoms diskutierte Effekt der Körperfülle bzw. des *Body-Mass*-Index (BMI) blieb ohne Einfluss auf die Inzidenz des HBCA (Holick et al. 2007).

Eine für das Harnblasenkarzinom positive Familienanamnese bei Verwandten ersten Grades erhöht die Wahrscheinlichkeit für eine weitere urologische Malignomerkrankung in der Familie um den Faktor zwei (Pelucchi et al. 2006, Randi et al. 2007), während zusätzliches Rauchen das relative Risiko auf mehr als das Fünffache ansteigen lässt (Lin et al. 2006). Eine Korrelation zum Tumorstadium oder zur Differenzierung familiär gehäuft

auftretender HBCA konnte nicht gefunden werden (Sturgeon et al. 1994), vererbbare spezifische Prädispositionen wurden bislang nicht beschrieben.

1.2.1.4 Koinzidente Erkrankungen

Zur Gruppe der Erkrankungen, die mit einer gesteigerten Inzidenz von Harnblasenkarzinomen einhergehen, gehören eine Gonorrhoeerkrankung bei Männern mit zweifach gesteigertem Risiko (Michaud et al. 2007), chronische Harnwegsinfektionen mit zwei- bis vierfach erhöhtem Risiko (Ludwig et al. 1996, Kamyshan et al. 2000), paraplegische Residualzustände mit persistierender Bakteriurie (Groah et al. 2002, Hess et al. 2003), durch Schistosomeneier induzierte chronisch-entzündliche Urothelirritationen im Sinne der Bilharziose, die mit dem Plattenepithelkarzinom assoziiert ist (Tawfik 1987, Walker et al. 1994) und die idiopathische Balkannephropathie (Radovanovic et Krajinovic 1979, Cukuranovic et al. 1991), die die Entwicklung von Urothelkarzinomen begünstigt.

1.2.1.5 Faktoren aus der Behandlung koinzidenter Erkrankungen

Der therapeutische Einsatz alkylierender Substanzen wie bspw. Cyclophosphamid zur Behandlung hämatoonkologischer Erkrankungen (Baker et al. 1987, Pedersen-Bjergaard et al. 1988), ein Abusus des nicht mehr gebräuchlichen Schmerzmedikamentes Phenacetin (McCredie et al. 1983), die therapeutische Immunsuppression nach Nierentransplantation (Kälble 1988) und die Radiotherapie des Zervixkarzinoms (Arai et al. 1991, Boice et al. 1988) bzw. des Prostatakarzinoms (Rolland et al. 2007, Boorjian et al. 2007) sind mit einer erhöhten HBCA-Rate assoziiert.

Während gehäufte Aspirineinnahme bei Frauen wahrscheinlich die Inzidenz des HBCA erhöht (Ratnasinghe et al. 2004), erkranken Nichtraucher, die nicht steroidale Antiphlogistika (NSAR) einnehmen, statistisch seltener (Blumentals et al. 2004). Für Atorvastatin, einen HMG-CoA-Reduktaseinhibitor, der in der medikamentösen Behandlung der Hypercholesterinämie bzw. als Sekundärprophylaxe kardiovaskulärer Erkrankungen eingesetzt wird, liegen experimentelle Daten für HBCA-Zellen vor, die für einen antiproliferativen und proapoptotischen Effekt sprechen (Kamat et Nelkin 2005).

1.2.2 Formale Pathologie, Progression und Prognose

In der ausführlichen WHO-Typisierung der Harnblasentumoren in der aktuell gültigen Fassung von 2004 ist definitiv auf die Heterogenität der Harnblasentumoren (Sauter et al. 2004) verwiesen worden.

Gut 95 % der Blasentumoren nehmen ihren Ursprung vom Epithel der Harnblase, davon gehören bei mitteleuropäischen Patienten ca. 80 % dem urothelialen Phänotyp an (papillär oder solide wachsendes Urothelkarzinom). Weitere Entitäten stellen mit 2 bis

10 % plattenepitheliale, mit ca. 2 % drüsige (Adenokarzinome) und mit weniger als 1 % undifferenzierte Karzinome dar (Hölzel 1996).

Urothelkarzinome treten über das gesamte Urothel vom Nierenbecken bis zur Harnblase und ableitender Urethra stochastisch gleich verteilt auf. Entsprechend finden sie sich bevorzugt in der Harnblase (zu etwa 93 %; Dorp et al. 2007). Als ursächlich für die häufig beobachtete Multifokalität der HBCA wurde der unmittelbare Kontakt postulierter Mutagene mit der Urothelwand angenommen (Paradigma der chemischen Karzinogenese).

Die Untersuchung von 10 Mikrosatellitenmarkern an makroskopisch sowie mikroskopisch unauffälligem Urothel von Harnblasenkarzinompatienten erbrachte Hinweise auf multiple genetische Alterationen (Muto et al. 2000), was dieses Konzept eindeutig stützt.

Andererseits handelt es sich bei den multifokalen rezidivierenden Tumoren um echte Rezidive des Primärtumors und nicht um Zweittumoren oder den unvollständig resezierten Primärtumor (Schöffski et al. 2006). Die Anzahl maligner Läsionen (> 3) und die Invasivität bestimmen die Rezidivrate, nicht aber der Grad der Differenzierung, das Geschlecht, die Tumorgröße oder der Raucherstatus (Raitanen et al. 1995).

Die Identifizierung von Prognosefaktoren dient wie bei anderen Karzinom-Entitäten dem Ziel, entsprechend dem biologischen Potential der Erkrankung eine adäquate Therapiestrategie festzulegen. Dabei gelten die Größe des Primärtumors bzw. die Invasionstiefe (T-Klassifikation), der Differenzierungsgrad (*Grading, G*), eine bestehende Multifokalität, die Rezidivhäufigkeit und das Zeitintervall zwischen dem Auftreten von

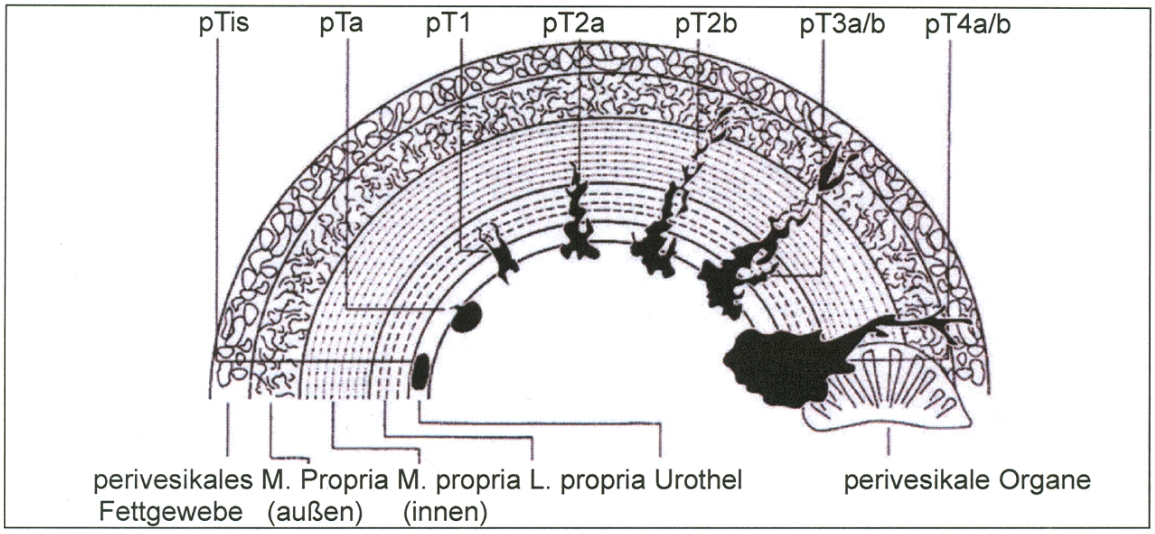

Abb. 1.2: T-Klassifikation der Urothelkarzinome.
pTa nicht-invasives papilläres Karzinom, **pTis** Carcinoma in situ, **pT1** Tumor infiltriert subepitheliales Bindegewebe, **pT2a** Tumor infiltriert oberflächliche Muskulatur (innere Hälfte), **pT2b** Tumor infiltriert äußere Muskulatur, **pT3a** mikroskopisch bzw. **pT3b** makroskopisch extravesikaler Tumor und **pT4a** Tumor infiltriert Nachbarorgane wie Prostata, Uterus oder Vagina, **pT4b** Tumor infiltriert Becken oder Bauchwand (Abbildung nach Störkel 2005, S. 5).

Rezidiven als konventionelle Parameter.

Nach der Weltgesundheitsorganisation (WHO) erfolgt die Stadieneinteilung in Anlehnung an die TNM-Klassifikation der UICC von 2002 (Sobin et Wittekind 2002). Die T-Klassifikation wurde dem formalanatomischen Aufbau der Harnblase bzw. dem Progress der urothelialen Tumorerkrankung folgend formuliert (vgl. Abb. 1.2).

Wie bei anderen Malignomen kommen nach internationaler Klassifikation die N- und M-Klassifikation für die Beteiligung lokaler Lymphknoten sowie die Organbeteiligung im Sinne von Metastasen hinzu. Bei Vorliegen synchroner Karzinome wird der am weitesten fortgeschrittene Tumor berücksichtigt und die Multifokalität aus prognostischen Gründen angegeben, z.B. durch den Zusatz „m“ für multipel oder entsprechende numerische Angaben.

Das *Grading* urothelialer Tumoren unterliegt seit Jahrzehnten einem kontinuierlichen Wandel. Eine neue Kategorisierung des Differenzierungsgrades wurde von der WHO im Jahr 2004 (Sauter et al. 2004) empfohlen und definiert nicht-invasive Urothelkarzinome neu in lediglich zwei Graduierungsstufen. Die alte WHO-Klassifikation von 1973 (Mostofi et al. 1973), die ein gut (G1), mäßig differenziertes (G2) und entdifferenziertes Urothelkarzinom (G3) unterscheidet, gilt zunächst uneingeschränkt weiter und wurde in der vorliegenden Untersuchung angewendet. Die neue Kategorie „papilläre urotheliale Neoplasie niedrig malignen Potentials“ (sog. PUNLMP), die dem Anteil der pTa-Tumoren mit sehr hohem Differenzierungsgrad (G1a) entspricht, ist jedoch nicht äquivalent zu den *low-grade*-Karzinomen G1. Diese Gruppe beinhaltet noch Tumoren mit inhomogener Tumorbiologie. Etwa 70 - 80 % der Neoplasien gehören zum Zeitpunkt der Erstdiagnose zu den „oberflächlichen“, papillären Typen pTa und pT1. Trotz hoher Rezidivneigung (ca. 50 %) zeigen lediglich 5 bis 15 % der Tumoren dieses Stadiums im Verlauf ein muskelinvasives Wachstum und damit ein Fortschreiten der Tumorerkrankung (Sauter et al. 2004, Stoehr et Hartmann 2007). Etwa 20 % der Tumoren müssen zum Zeitpunkt der Erstdiagnose dem fortgeschrittenen, muskelinvasiven Typ zugeordnet werden. Die Mehrzahl der muskelinvasiv wachsenden Tumoren der Harnblase zeigt keinen Hinweis auf oberflächliche Vorläuferstadien und entwickelt sich wahrscheinlich aus Epithelatypien und dem *Carcinoma in situ* (pTis), das selbst eine aggressive, zu Progress neigende Läsion darstellt (Cutler et al. 1982, Koss 1979, Melamed et al. 1964). Das primäre pTis wird selten beobachtet; es tritt meist multifokal und assoziiert mit einem invasiven Urothelkarzinom auf. 80 % der pTis-Tumoren gehen in invasive Karzinome über (Adsay et al. 1997).

Im Vergleich zu unilokulären HBCA geht Multizentrizität von Urothelkarzinomen mit einer erhöhten Rezidiv- und Progressrate einher (Rezidive bei pT1-Tumoren: 73 % vs. 46 %; Progress zu muskelinvasiven Tumoren: 44 % vs. 24 % [Lutzeyer et al. 1982]).

Bezüglich der Prognose und des biologischen Verhaltens weisen bereits etwa 10 - 12 % der papillären pT1-Karzinome eine lymphatische und / oder Gefäßinvasion (Lopez et Angulo 1995, Marchetti et al. 1996) mit dann schlechterer Prognose als nicht-angioinvasive pT1-Karzinome auf, was sich durch eine signifikant schlechtere 5-Jahres-Überlebensrate von 44 % vs. 81 % zeigt (Lopez et Angulo 1995). Daher ist der Begriff „oberflächliches Urothelkarzinom“ nicht geeignet, die Prognose angemessen zu beschreiben.

Die 1998 durch die WHO eingeführte Entität der PUNLMP (Epstein et al. 1998) fand noch keine Anwendung auf die Befundung der vorliegend untersuchten Urothelkarzinome.

Zwischen rekurrierenden nicht-invasiven und zu invasivem Wachstum fortschreitenden HBCA konnte ein charakteristischer genetischer Unterschied bezüglich der Anzahl deletierter Genloci wichtiger Zellwachstumsregulatoren demonstriert werden: Die Deletion zweier oder mehrerer Loci der Gene p53, MYCL, RB1 und CDKN2A (p16, p14ARF) zeigte sich in nur 1 von 23 Fällen der Gruppe der Patienten mit nicht-invasiven HBCA, jedoch in 10 von 23 Fällen der Gruppe der Patienten mit progressivem Tumorwachstum (Primdahl et al. 2000).

1.3 Wachstum und das Zellzykluskonzept

In Reaktion auf zelluläre „Bedürfnisse“ und Signale aus der Umwelt weisen Zellen grundsätzlich mehrere Möglichkeiten der Entwicklung auf: Sie können entweder im vorliegenden Zustand verbleiben, dem Mechanismus der Zellteilung unterliegen und sich vermehren oder den Weg der Apoptose einschlagen.

Wachstum bedeutet für einen mehrzelligen Organismus und seine Organe Zellvermehrung im Rahmen der Zellteilung. Diese lässt sich am Modell des Zellzyklus erläutern.

Eine ausreichend mit Substraten und Proliferationsfaktoren versorgte Zelle produziert während der G1 - Phase zelleigene Proteine, Membranbestandteile und Nukleinsäuren. Fehlen Substrate oder Wachstumsfaktoren, verändert sich der Zellstoffwechsel in Richtung der G0 - Phase (*gap*, Pause), ein fakultativ postmitotischer Zustand, reversibel zur G1 - Phase. In der Synthese - Phase repliziert die Zelle ihre eigene Erbinformation in Form der Desoxyribonukleinsäuren (DNA). Die kurze G2 - Phase (Polwanderung der Zentrosomen) geht in die Mitose über, während der die eigentliche Zellteilung mit Separation des tetraploiden Chromosomensatzes und der Zellorganellen erfolgt. Zellwachstum im Sinne der oben dargestellten G1 - Phase schließt den Zyklus.

Eine Vielzahl von Genen besitzt steuernde bzw. kontrollierende Einflüsse auf den Zellzyklus und damit auf das Wachstum von Zellverbänden. So genannte

Tumorsuppressor-Gene (auch Antionkogene) inhibieren per definitionem den Progress des Zellzyklus.
Wenn sie ihre Funktion z.B. durch Deletion des einen und Mutation des anderen Allels oder andere Mechanismen verlieren, fehlt ein Faktor, der die Proliferation unterdrückt. Unkontrolliertes Wachstum wird somit wahrscheinlicher.
Eines der bekanntesten Phänomene während der Progression von Tumoren ist die Mutation oder der Verlust des Tumorsuppressor-Proteins p53. Diese genetischen Veränderungen lassen sich bei etwa 30 bis 50 % analysierter Tumoren nachweisen, z.B. in Karzinomen von Kolon, Lunge, Mamma, Leber (Levine 1992, Levine et al. 1994) und Harnblase (Cordon-Cardo et al. 1994, Park et al. 2000, Lu et al. 2002).
Als Antagonisten der Tumorsupressor-Gene postuliert man so genannte Protoonkogene, Proteine, die als funktionelle Promotoren des Zellzyklus wirken, wie das hier am Harnblasenkarzinom untersuchte *murine double minute 2* (MDM2). Ihre typischen Pathomechanismen im Sinne der Malignomprogression stellen Genamplifikation, Punktmutation oder Translokation dar (Bishop 1991, Parsons et Parsons 1993).
Neben den Klassen der Tumorsupressor-Gene und der Onkogene existiert mit den zelleigenen Reparatur-Genen eine dritte funktionelle Entität, deren Beteiligung an der Tumorgenese als gesichert gilt.

1.4 Vereinfachter Überblick zum p53-MDM2-p14ARF-System

Der Tumorsuppressor p53 übernimmt intrazellulär vielfältige Aufgaben. Die Expression hoher Spiegel von intaktem p53 resultiert in zwei möglichen zentralen Effekten: Zellzyklusarrest und / oder Apoptose. Als Reaktion auf genotoxischen Stress wie z.B. UV-Strahlung wird in Zellen regelhaft p53 induziert. Diese Beobachtung führte zur These der „zellulären Notbremse“, die das Genom vor Akkumulation von Mutationen bewahren soll – entweder über Arrest des Zellzyklus, der Zellreparaturmechanismen Zeit einräumt, oder über den Weg der Apoptose.
Das MDM2 hemmt p53 und damit die Funktion der Initiation des Zellzyklusarrest, wirkt also onkogen, während p14ARF wiederum das MDM2 inhibieren und damit in Tumor-suppressiver Eigenschaft die „Notbremse“ aktivieren kann (Levine et al. 1991, Ko et Prives 1996).

1.5 Charakterisierung von MDM2

1.5.1 Einordnung

MDM2 wurde ursprünglich als ein amplifiziertes Gen in der spontan transformierten Maus-Zelllinie BALB/c3T3 identifiziert. Die abgeleitete Zelllinie 3T3DM besitzt 25 - 30

Kopien von kleinen gepaarten azentromerischen, extra-chromosomalen Chromatinkörperchen (Cahilly-Snyder et at. 1987), sog. *double minutes* (Hamlin et al. 1984, Schimke 1984, Stark et Wahl 1984). Diese 1 bis 2 Megabasen großen Fragmente beinhalten drei Gene, deren zweites (MDM2) zunächst bei kultivierten Fibroblasten, im Anschluss bei Mäusen beobachtet, mittels Überexpression (Fakharzadeh et al. 1991) das Auftreten von Tumoren induziert, d.h. transformierende Eigenschaften aufweist.
Auch in menschlichen Tumoren muss MDM2 (auch HDM2) als Onkogen angesehen werden. Eine nukleäre Überexpression dieses Proteins wurde in einer Vielzahl menschlicher Tumoren gefunden, z.B. in Weichteil-, Osteo- und Rhabdomyosarkomen (Oliner et al. 1992, Ladanyi et al. 1993, Leach et al. 1993, Cordon-Cardo et al. 1994, Meddeb et al. 1996, Lonardo et al. 1997, Momand et al. 1998), hier in 20 – 30 % der Fälle durch Genamplifikation hervorgerufen. In B-Zell-CLL, AML, ALL und Non-Hodgkin-Lymphomen (Bueso-Ramos et al. 1993, Watanabe et al. 1994) wurde dies teilweise durch gesteigerte Transkription verursacht. Eine MDM2-Überexpression konnte zudem in Glioblastomen und Astrozytomen (Reifenberger et al. 1993, Reifenberger et al. 1996), im malignen Melanom (Poremba et al. 1995), in oralen Plattenepithelkarzinomen, beim Mammakarzinom (Matsumura et al. 1996, Bueso-Ramos et al. 1996) sowie beim Harnblasenkarzinom (Lu et al. 2002) nachgewiesen werden. Als weiterer Pathomechanismus der Tumorgenese bei MDM2 wurde eine verstärkte Translation diskutiert (Landers et al. 1994, Landers et al. 1997). Die kurze physiologische Halbwertszeit des MDM2 von 20 Minuten weist auf ein Protein hin, das sorgfältig regulierte Einflüsse im Zellzykus besitzt bzw. das wahrscheinlich selbst ebenso exakt reguliert wird (Olson et al. 1993). Das mit MDM2 nahe verwandte MDM211 bindet und stabilisiert beispielsweise MDM2, ebenfalls stabilisiert es das p53-Protein über die MDM2-Bindung (Giglio et al. 2005). Am Lungenkarzinom konnte HDM211 in Proben nachgewiesen werden, die MDM2 überexprimierten. Im Gegensatz zu Weichteilsarkomen zeigt physiologisches Gewebe nur ein geringes Level des MDM2-Proteins (Cordon-Cardo et al. 1994).

1.5.2 MDM2-Genstruktur und Domänen

Das in Sarkomen häufig alterierte MDM2-Gen (Oliner et al. 1992, Heighway et al. 1994) liegt auf Chromosom 12 am Locus 12q14.3-q15. Deletionsuntersuchungen und Sequenzanalysen zeigten, dass das 90 kDa große Phosphoprotein eine N-terminal gelegene p53-Bindedomäne (Kodon 19 bis 102), ein Kernlokalisationssignal (NLS, *nuclear localization signal*, Kodon 181 bis 185), eine hoch konservierte saure Region (Kodon 223 bis 274), ein zentrales Zinkfinger-Motiv (Kodon 305 bis 322), ein C-terminal gelegenes, RNA-bindendes *RING-Finger* - Motiv (Kodon 438 bis 478) (Chen J et al. 1993,

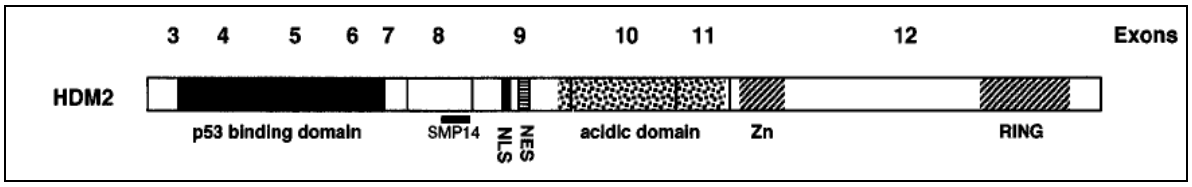

Abb. 1.3: Domänen des MDM2-Proteins im linearen Modell.
Hervorgehoben sind die p53-Bindedomäne, das Kernlokalisationssignal NLS, die saure Domäne und zinkbindende Motive, deren 2 N-terminale den *RING-Finger* bilden, sowie das Epitop des genutzten MDM2-Antikörpers SMP14 (nach Evans et al. 2001, S. 4044).

Boddy et al. 1994) und eine dritte, carboxyterminale Zinkfinger-Domäne (Kodon 464 bis 470; Sigalas et al. 1996) besitzt (vgl. Abb. 1.3).

Die Regulation des MDM2-Genes erfolgt *in vivo* an einem streng p53-abhängigen inneren MDM2-Promotor (P_2) und einem dazu *upstream* gelegenen konstitutiven, von p53 nahezu unabhängigen P_1-Promotor (Mausmodell). Zellen der Zelllinie 3T3DM, die durch eine vielfache Amplifikation des MDM2-Genes charakterisiert sind, wiesen große Mengen des P_1-Transkriptes X_1 auf, während P_2-abhängige Transkripte nicht nachweisbar waren (Barak et al. 1994). Diese Beobachtung untermauert die Hypothese, dass P_2 ein p53-abhängiger Promotor sein muss und dass die MDM2-Amplifikation in 3T3DM-Zellen zur vollständigen Inaktivierung von p53 führt. Andererseits mündet die quantitative Potenzierung des p53-Wildtyp-Proteins z.B. durch radioaktive Strahlung in DIN-Zellen gleichsam in einer deutlichen Induktion des P_2-Promotors wie in moderater Steigerung der MDM2-P_1-Transkription. Dem Transkript X_2 des P_2-Promotors fehlen das Exon 1 und einige Nukleotide des Exon 2. Obgleich das erste *in-frame*-Kodon AUG (Translations-Initiationssequenz) im Exon 3 lokalisiert ist und die zwei verschiedenen MDM2-Transkripte X1 und X2 identische Proteine kodieren sollten, waren *in vitro* abweichende Polypeptide nachzuweisen (Barak et al. 1994).

1.5.3 MDM2-Spleißvarianten

Das MDM2-Gen kodiert ein Protein der Größe von 491 Aminosäuren mit einem Gewicht von 90 kDa.

In Tumorzellen von Menschen und anderer Vertebraten konnte eine Vielzahl sog. alternativer Spleißvarianten des MDM2-Transkripts identifiziert werden (Olson et al. 1993, Sigalas et al. 1996, Matsumoto et al. 1998, Kraus et al. 1999, Hori et al. 2000, Bartel et al. 2001, Evans et al. 2001, Lukas et al. 2001, Tamborini et al. 2001). Die Expression alternativer Spleißvarianten von MDM2 korreliert bei humanen Astrozytomen, Ovarial-, Harnblasen- und Mammakarzinomen unabhängig vom p53-Status mit dem Grad der Malignität (Sigalas et al. 1996, Matsumoto et al. 1998, Hori et al. 2000). Die Mehrzahl der kodierten Proteine weist wahrscheinlich Lücken im Bereich der p53-Bindedomäne auf.

Einige MDM2-Isoformen besitzen transformierendes Potential in NIH-3T3-Zellen (Sigalas et al. 1996), hatten also im Transfektionsexperiment onkogenes Potential.
Andererseits wurden MDM2-Spleißvarianten mit intakter *RING-Finge*r-Domäne beschrieben, die in der Lage waren, die Zellproliferation (in Abhängigkeit von vorhandenem MDM2-Protein) am Mausmodell zu hemmen (Dang et al. 2002).
Auf RNA-Ebene liegen die Quantitäten der jeweiligen Spleißvarianten deutlich unter der der MDM2-mRNA der vollen Länge (fl-MDM2).
Eine Korrelation zwischen MDM2-mRNA-Menge (quantitative RNA-PCR) und Menge des Proteins (semiquantitative Immunhistochemie) war jedoch nicht zu demonstrieren (Miyajima et al. 2001), offenbar sind dafür andere regulative Mechanismen von Relevanz.
Weng et al. (2005) zeigten an 117 Nichtkleinzelligen Lungenkarzinomen (NSCLC) eine Korrelation zwischen Nachweisbarkeit von MDM2-Spleißvarianten allgemein und dem Geschlecht (36 % vs. 9,5 %; Männer vs. Frauen) sowie dem Rauchverhalten (44 % vs. 16 %; Raucher vs. Nichtraucher), während die meisten nicht-malignen Zelllinien keine MDM2-Spleißvarianten exprimierten, jedoch die fl-mRNA.
In Weichteilsarkomen war die Anwesenheit von MDM2-Spleißvarianten mit höherem Tumorstadium assoziiert, jedoch ohne prognostischen Effekt (Bartel et al. 2001).
Das Vorliegen anormaler (engl. *aberrant*, nicht an exon / intron-Grenzen gespleißter) Varianten korrelierte beim Mammakarzinom mit kürzerem Überleben (Lukas et al. 2001).
In histologisch unauffälligem Mammagewebe fand sich jedoch über die MDM2-fl-mRNA hinaus ebenfalls eine alternative (d.h. exon / intron-Grenzen gleich der MDM2-fl) Spleißvariante (653 bp).

1.5.4 p53-abhängige und p53-unabhängige Funktionen von MDM2

Das Onkogen MDM2 ist ein multifunktionales Protein, das auf mehreren Wegen die Aktivität des Tumorsuppressors p53 hemmt. Einerseits bindet es an die Transaktivationsdomäne von p53 und unterbindet somit die Aktivierung von Genen durch p53 (Momand J et al. 1992, Oliner et al. 1993), andererseits forciert es die p53-Degradation (Haupt et al. 1997) indem es als E3-Ligase agiert und p53 direkt ubiquitiert (Honda et al. 1997) sowie dessen Transport zu zytoplasmatischen Proteasomen beschleunigt (Roth et al. 1998).
Zusammengefasst antagonisiert MDM2 die Transkriptionsaktivität von p53 (Momand et al. 1992, Chen J et al. 1995) ebenso wie die p53-induzierte Wachstumshemmung (Finlay 1993), den G1-Arrest und die Apoptose (Chen J et al. 1996). Diese Mechanismen basieren auf physischer Assoziation der N-terminalen Region von MDM2 mit der N-terminalen Transaktivationsdomäne des p53 (Chen J et al. 1993, Oliner et al. 1993, Haines et al. 1994, Lin et al. 1994, Chen J et al. 1996, Kussie et al. 1996). Andererseits

wird das MDM2-Gen selbst durch p53 aktiviert (Barak et al. 1993, Otto et Deppert 1993, Wu et al. 1993). Diese Beobachtung impliziert MDM2 als Komponente einer negativ autoregulatorischen Feedback-Schleife, in der p53 nach Übernahme seiner biochemischen Aufgaben seinerseits das MDM2-Gen aktiviert, dessen Produkt gebundenes p53 durch seine Ubiquitin-Ligase-Aktivität dem Abbau durch Proteasomen zuführt (Haupt et al. 1997, Honda et al. 1997, Fuchs et al. 1998) und somit inaktiviert (Barak et al. 1993, Picksley et Lane 1993, Wu et al. 1993).

Die Integrität des C-terminalen *RING-Finger*-Motivs von MDM2 ist dabei sowohl für die E3-Ubiquitin-Ligase-Aktivität (Kubbutat et al. 1999, Fang et al. 2000) als für die Bindung an RNA (speziell Aminosäuren 425 bis 491) notwendig (Elenbaas et al. 1996, Lai et al. 1998). Beispielsweise zerstört die Mutation des Kodon 464 (Zystein zu Alanin) das *RING-Finger*-Motiv und unterbricht auf diesem Weg die MDM2-initiierte Ubiquitierung und den Kernexport von p53 (Honda et al. 1997, Boyd et al. 2000, Geyer et al. 2000, Fang et al. 2000).

Die *RING-Finger*-Domäne ist eine Voraussetzung für den zellzyklusfördernden Effekt von MDM2. Selbst einzelne Punktmutationen in diesem Bereich versetzen MDM2 in die Lage, den Zellzyklus zu stimulieren - auch, wenn sie die MDM2-vermittelte p53-Degradation und die MDM2-E3-Ligase-Aktivität unterbinden (Argentini et al. 2000). Diese Beobachtung lässt vermuten, dass der MDM2-*RING-Finger* eine von der p53-Degradation und p21-Regulation unabhängige Rolle in der Zellzyklusregulation besitzt.

Eine MDM2-Spleißvariante ohne p53-Bindedomäne und NLS (vgl. Abb. 1.3) war im Transfektionsexperiment in der Lage, MDM2-Protein zu binden, im Zytoplasma zu sequestrieren und somit *in vitro* antiproliferativ wirksam (Evans et al. 2001). Die Assoziation des MDM2 mit der Spleißvariante behinderte die Interaktion des MDM2 mit p53.

Auch am Mausmodell waren einige MDM2-Varianten mit intakter *RING-Finger*-Domäne in der Lage, die Zellproliferation zu hemmen, auch wenn ihren Produkten die 399 N-terminalen Aminosäuren fehlten. Obwohl diese Wachstumsinhibition streng p53-abhängig war, fehlte allen untersuchten Polypeptiden die p53-Bindedomäne, was die Existenz weiterer p53-Regulatoren vermuten lässt (Dang et al. 2002).

Weitere Analysen zeigten im Fall der Koexistenz von MDM2-Protein und der kleinsten artefiziellen *RING-Finger* tragenden Variante (M3) keinen Wachstumsunterschied zu alleiniger MDM2-Expression, was auf kompetitive Effekte zurückzuführen sein könnte. Die Integrität des MDM2-*RING-Fingers* ist weiterhin notwendige Voraussetzung, damit das MDM2-Protein die Zellzyklus-inhibierenden Effekte der sog. Spleißvariante M3 überspielen kann. So waren MDM2-Mutanten ohne den kompletten, die *RING-Finger*-Domäne tragenden C-Terminus (Kodon 464 - 489), sowie eine Mutante mit falscher

Aminosäure 462, nicht in der Lage, die M3-induzierte Wachstumshemmung umzukehren (Dang et al. 2002).

Ein Einfluss von MDM2-Varianten auf die MDM2-vermittelte Ubiquitierung von p53 konnte nicht nachgewiesen werden, auch waren die mutanten MDM2-Proteine nicht in der Lage, die Hemmung der MDM2-abhängigen Ubiquitierung durch das Protein p14ARF umzukehren (Dang et al. 2002). Weiterhin vermittelt MDM2 seine eigene Ubiquitierung in Abhängigkeit vom *RING-Finger*-Motiv (Honda et Yasuda 2000).

Bei einer Reihe von Tumoren ließen sich Punktmutationen in der MDM2-*RING-Finger*-Sequenz von Spleißvarianten demonstrieren (Fakharzadeh et al. 1991, Oliner et al. 1992, Haines et al. 1994, Sigalas et al. 1996, Schlott et al. 1997). Möglicherweise handelt es sich um MDM2-Proteinvarianten, die den Progress des Zellzyklus hätten inhibieren können (analog zu Dang et al. 2002).

Weitere Wege sind bekannt, über die MDM2 seine transformierenden Eigenschaften unabhängig von seiner Bindung an p53 ausüben kann, z.B. durch Protein-Protein-Interaktion mit L5, Rb, E2F und DP1 (Marechal et al. 1994, Martin et al. 1995, Xiao et al. 1995). MDM2 bindet und aktiviert bspw. den S-Phase-induzierenden Transkriptionsfaktor E2F1/DP1 und hemmt so den durch pRb vermittelten Zellzyklusarrest (Martin et al. 1995). Die E2F1-Bindedomäne von MDM2 liegt im Bereich der N-terminalen 220 Aminosäuren und damit überlappend mit der p53-Bindedomäne (Piette et al. 1997).

1.5.5 MDM2 beim Harnblasenkarzinom

Während der MDM2-Genamplifikation in anderen Tumorentitäten eine wichtige Rolle zukommt (vgl. Kap. 1.5.1), liegt die Amplifikationsrate im Harnblasenkarzinom lediglich zwischen 1 und 5 % (Habuchi et al. 1994, Lianes et al. 1994, Simon et al. 2002).

Alternative Spleißvarianten von MDM2 wurden signifikant häufiger in weniger differenzierten, invasiv wachsenden Tumoren gefunden (57 % vs. 6 %; Sigalas et al. 1996).

In zwei Studien (Shiina et al. 1999, Uchida et al. 2002) konnte keine signifikante Korrelation zwischen der Quantität der MDM2-Expression im Urothelkarzinom (IHC) einerseits und histopathologischen Parametern (G, Tumorstadium) und der Überlebenszeit andererseits aufgezeigt werden. Lianes et al. (1994) gaben dagegen eine signifikante Korrelation zwischen MDM2-Überexpression und niedrigem Tumorstadium an, während auch Daten wachsender MDM2-Immunoreaktivität bei höherem Tumorstadium beim HBCA vorliegen (Korkolopoulou et al. 1997, Ioachim et al. 2000).

1.6 Ziele der Arbeit

MDM2 besitzt bei eukaryotischen Zellen im Zusammenwirken mit p53 eine zentrale Bedeutung für die Regulation von Zellzyklus und Apoptose. In zahlreichen humanen Neoplasien sind an dieser zellulären Schnittstelle genetische Veränderungen beschrieben worden. Zum Zeitpunkt der Initiation der Untersuchung stand das Konzept von Sigalas et al. (1996) zur kritischen Diskussion:

(1) Kann die MDM2-Spleißvariantenpositivität in einfacher Korrelation zum Tumorstadium bestätigt werden, ist also eine These zu halten, die die Entität der Varianten weitgehend unberücksichtigt lässt?

Die zentrale Fragestellung der vorliegenden Arbeit war der Zusammenhang zwischen Umweltfaktoren und genetischen Alterationen am MDM2-System, welcher bspw. für die Korrelation von Nikotinkonsum und p53-Mutationsrate am Lungenkarzinom (Husgafvel-Pursiainen et al. 2000, LaRue et al. 2000) oder am Urothelkarzinom für den Methylierungsstatus von p14ARF (Schlott et al. 2004) beschrieben worden ist:

(2) Existieren Relationen von Risikofaktoren aus Berufs- und Raucheranamnese (ggf. im Sinne einer Dosis-Wirkungs-Beziehung) sowie weiteren Faktoren des Lebensstils einerseits und dem Vorliegen bestimmter MDM2-Varianten andererseits auch im Vergleich mit einer Kontrollgruppe mit negativer Risikoanamnese, die ebenfalls am HBCA erkrankte?

(3) Weisen Tumorstadium und Grad der Differenzierung eine Korrelation mit dem Vorliegen von MDM2-Protein auf? Lassen sich intrazelluläre MDM2-Proteinpositivität und wiederum die Expression definierter MDM2-Spleißvarianten in einem zumindest korrelativen Zusammenhang am Urothelkarzinom darstellen, wie Evans et al. (2001) experimentell an einer Variante demonstrieren konnten?

(4) Über die nicht-topologische Untersuchung der MDM2-mRNA hinaus sollte die Frage nach der intrazellulären Verteilung beantwortet und dafür eine *in-situ*-Hybridisierung am HBCA etabliert werden.

Urothelkarzinome stellen eine sehr heterogene Gruppe von Erkrankungen mit ausgeprägter Rezidivneigung dar.

(5) Kommt den untersuchten Parametern eine Rolle beim Rezidiv-Verhalten zu?

An den in die Karzinogenese involvierten Onkogenen sind ubiquitär Mutationen denkbar. Für eine Reihe von Malignomen sind Punktmutationen in der MDM2-*RING-Finger*-Sequenz von Spleißvarianten beschrieben worden. Andererseits ist ein intakter *RING-Finger* u.a. notwendige Voraussetzung dafür, dass das Protein MDM2 die sog. M3-

Variante in ihrer den Zellzyklus inhibierenden Eigenschaft hemmt und die Tumorgenese voranbringen kann (vgl. Kap. 1.5.4).

(6) Sind Mutationen am C-terminalen MDM2-*RING-Finger* in die Karzinogenese des Urothels involviert oder lassen sich zumindest Mikrosatelliteninstabilitäten als Hinweise auf Mutationen am MDM2-Locus demonstrieren?

2. Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Patienten und Tumorgewebe

Das Ethikvotum für die Durchführung der vorliegenden Studie wurde von der Ethikkommission des Universitätsklinikums Göttingen im Frühjahr 2000 eingeholt.

Im Rahmen der operativen Tumortherapie fand beginnend im Sommer 2000 über einen Zeitraum von 20 Monaten das Akquirieren der Urothelkarzinompatienten in den Urologischen Kliniken des Universitätsklinikums Göttingen, des Evangelischen Krankenhauses Göttingen Weende sowie des Albert-Schweitzer-Krankenhauses Northeim statt. Die Operationspräparate wurden durch transurethrale Blasenschleimhautresektion (TUR-B) oder Zystektomie in Form von formalinfixiertem, paraffineingebettetem Gewebe und Kryostatpräparaten gesammelt.

In einigen Fällen konnte zystoskopisch unverändert erscheinendes Harnblasengewebe zur Verfügung gestellt werden, weiterhin teilweise EDTA-Blut der Patienten zur Gewinnung der Referenz-DNA für die Analyse auf Mikrosatelliteninstabilität.

Anamnese und Einverständnis für die Teilnahme an der Untersuchung wurden postoperativ und noch ohne Vorliegen des histopathologischen Befundes eingeholt bzw. erhoben. Zur Auswertung kamen 54 von 123 akquirierten Fällen. Die überwiegende Zahl der Ausschlussfälle (n = 20) war auf fehlendes Einverständnis allgemein oder fehlende Bereitschaft zum Interview zurückzuführen, während einzelne bereits gesammelte Resektate als nicht-maligne einzustufen waren (n = 11) bzw. ein Plattenepithelkarzinom und ein kleinzellig-anaplastisches Karzinom keinen Eingang in die weitere Auswertung fanden.

In einzelnen weiteren Fällen waren im Ausstrichpräparat des unmittelbar postoperativ tiefgefrorenen Gewebestückes keine Tumorzellen nachweisbar (n = 3), so dass diese Fälle ebenfalls nicht weiter untersucht wurden. Während 16 Dokumentationen der Ausschlussgründe fehlten, waren 9 cDNA-Synthesen fehlerhaft und die Menge des Tumormaterials in 8 Fällen zu gering.

2.1.2 Eingesetzte Chemikalien

Vgl. Tab. 6.13 im Anhang.

2.1.3 Verwendete kommerzielle Reaktionsansätze (sog. Kits)

Vgl. Tab. 6.15 im Anhang.

2.1.4 Puffer und weitere Lösungen

Vgl. Tab. 6.16 im Anhang.

2.1.5 Technisches Zubehör

Vgl. Tab. 6.17 im Anhang.

2.1.6 Verbrauchsmaterialien

Vgl. Tab. 6.18 im Anhang.

2.2 Methoden

2.2.1 Aufarbeitung des Untersuchungsgutes

Im Rahmen der urologisch-chirurgischen Therapie von Harnblasentumoren wurden während transurethraler Resektionen makroskopisch pathologisch veränderte Gewebepartikel gewonnen, für das routinierte histologische Staging und Grading in Formalin fixiert und nach Hämalaun-Eosin-Färbung von einem Pathologen beurteilt.

Damit das zelluläre Material auch bezüglich der Ebene der Genexpression (RNA) untersuchbar blieb, musste bereits im Operationssaal je ein Gewebespan aus dem Tumor schockgefroren werden (alternativ in *RNA-Later* gelagert), was den Abbau der im Gewebespan enthaltenen RNA durch zelleigene RNasen stoppte.

Der absolut überwiegende Anteil des resezierten Materials verblieb für die histopathologische Diagnostik, nach deren Abschluss einige Paraffinschnitte für die vorliegende Arbeit hergestellt wurden. Diese Gewebeschnitte dienten der Analyse der MDM2-Proteinexpression und exemplarisch der zellulär-topographischen Darstellung der Boten-RNA von MDM2 durch *in-situ*-Hybridisierung (Kap. 2.2.5).

Der RNase-geschützte Gewebespan war Grundlage für das Isolieren von Tumorzell-DNA und -RNA und konnte somit nicht histologisch aufgearbeitet werden. Um dennoch eine valide Einordnung der Dignität dieses Gewebes zu gewährleisten, wurde an einem kleinen Teil dieses Gewebes ein Ausstrich vorgenommen. Nur Fälle von HBCA (Befund der histologischen Diagnostik), die in dieser „Quasi-Zytologie“ als positiv befundet werden konnten, wurden in die vorliegende Studie aufgenommen. Material fraglicher Dignität, sowie Resektionsgut, das im Ausstrich nur wenig maligne Zellen enthielt, wurde nicht weiter untersucht.

2.2.1.1 Isolierung der RNA und DNA

Um ubiquitär adhärente DNasen zu inaktivieren, kamen autoklavierte Pipettenspitzen, Reaktions- und Aufbewahrungsgefäße zur Anwendung. Da RNasen gegen dieses

Procedere resistent sein können, wurden zusätzlich alle Gegenstände, die für das Arbeiten mit RNA Verwendung fanden, für 4 Stunden bei 140° C in einem Sterilisator behandelt.
Für die nachfolgend beschriebenen Schritte bildete der RNase-inaktivierte Gewebespan die Materialgrundlage.
Das Biopsat wurde im tiefgefrorenen Zustand im Dismembrator bei 2000 rpm innerhalb von 45 Sekunden zermahlen und in ein E-*Cup* mit dem Tri-Reagent überführt, während ein kleiner Teils des Pulvers auf einem Objektträger ausgestrichen für die May-Grünwald-Färbung während der nächsten Pause trocknen konnte.
Nach *Vortexen* (automatisiertes Schütteln) und Zentrifugieren (4° C) pelletierte unlösliches Material. Zum abgezogenen Überstand wurden 200 µl Chloroform gegeben, eine 15-minütige Ruhepause führte bei RT zu einer Phasentrennung. Die obere transparente Phase enthält RNA, die untere rötliche „organische“ Phase Proteine, die weißliche Schicht zwischen den beschriebenen Phasen die DNA.
Nach sorgsamem Entfernen der oberen Phase mit einer Pipette und Überführen in ein sauberes, beschriftetes E-*Cup* schloss sich die unverzügliche Aufreinigung der RNA unter Verwendung des *RNeasy-Kits* (entsprechend der Herstellervorgaben) an.
Dieses Verfahren nutzt das Prinzip der Chromatographie. Durch einen denaturierenden Puffer kommt es zur Lysis von Zellmembranen, RNA wird in einer Säulenchromatographie selektiv an eine Matrix gebunden, bevor durch Waschschritte mit speziellen Puffern störende DNA und Proteine abgetrennt werden. Es resultierten jeweils 30 µl RNA-Lösung (in RNase-freiem Aqua). Zur photometrischen Bestimmung der RNA-Konzentration gelang ein Aliquot aus diesem Volumen separiert in einem E-*Cup* auf Eis. Für das spätere Umschreiben von RNA in cDNA wurde die verbleibende RNA-Lösung bei - 70° C eingefroren.
Die DNA-Schicht wurde nach Abnehmen im sauberen beschrifteten E-*Cup* bei 4° C bis zur Weiterverarbeitung aufbewahrt.

2.2.1.2 Messungen der RNA-Konzentrationen im Photometer

Die aliquotierte und in eine Quarzküvette überführte RNA-Lösung wurde 1 : 20 mit 10 mM TrisHCl (Puffer, pH = 7,5) verdünnt. Die Messung der optischen Dichte ist im vorher mit Puffer geeichten Photometer bei 260 bzw. 280 nm durchgeführt worden. Im Photometer erfolgte auf der Basis des Lambert-Beerschen Gesetzes die Bestimmung der RNA-Konzentration, damit für die folgenden Schritte etwa äquivalente Ausgangsbedingungen definiert waren.

2.2.1.3 Umschreibung der RNA in cDNA

In der Natur verfügen Retroviren (*per definitionem*) mit der reversen Transkriptase über ein Enzym, das in der Lage ist, einzelsträngige RNA in eine doppelsträngige Form der DNA zu überführen. Diese besitzt im Gegensatz zur nativen Form der genomischen DNA keine Introns.

Die für die Umschreibung *in vitro* genutzte reverse Transkriptase benötigt für die Initiation ihrer Polymerasefunktion einen *Primer*. Da während ihrer Synthese RNA als Matrize verbraucht würde, ist es von Vorteil, die gesamte RNA zunächst durch Einsatz von *Random-Hexamer-Primer* in *copy*DNA (cDNA) umzuschreiben und in einer sich anschließenden Polymerasekettenreaktion spezifische *Primer* für die zu untersuchenden cDNA-Transkripte einzusetzen.

Random-Hexamer-Primer besitzen variable Nukleotidsequenzen und binden somit ubiquitär an der RNA. Von Nachteil ist, dass während der Reaktion auch ribosomale (rRNA) und transportierende RNA (tRNA) in cDNA transformiert werden. Die cDNA-Synthese erfolgte im Thermocycler nach folgendem Rezept:

Gesamt-RNA		2	µg
dATP, dTTP, dGTP, dCTP	je	500	µM
Random Primer		3	µg
DEPC-*Aqua*	ad	12	µl
Inkubation bei 65° C über 5 min			
First Strand Buffer (5x)		4	µl
DTT		2	µl
RNase OUT Recombinant Ribonuclease Inhibitor		40	Units
Inkubation bei 42° C über 2 min			
SuperScript II RNase H-Reverse Transkriptase		200	Units
Inkubation bei 42° C über 50 min			
Inkubation bei 70° C über 15 min *(stoppt Reaktion)*			

Tab. 2.1: Rezeptur für die cDNA-Synthese.

2.2.1.4 Aufreinigung der DNA

Unmittelbar nach Beginn der Inkubation des Umschreibeansatzes fanden parallel die DNA-Aufbereitung und die May-Grünwald-Färbung (Azur-Eosin) statt.

Zum Ausfällen der DNA wurden in das E-Cup 300 µl Äthanol (100 %) gegeben. Leichtes *Vortexen*, 3-minütiges Ruhen bei Raumtemperatur (RT) und Zentrifugieren (2000 rpm, 5 min, 4° C) führten zu forcierter Präzipitation der DNA in Form eines kleinen weißen Pellets.

Dekantieren des Überstandes, Zugeben von 1 ml „Waschlösung“ (0,1 M Na-Zitrat in 10 % Äthanol), leichtes *Vortexen*, Belassen bei RT für minimal 30 min war prozesshaft dreifach

durchzuführen. Es schlossen sich Zentrifugieren, Dekantieren der Waschlösung, Zugeben von 1 ml Äthanol (70 %) in das E-Cup, 20-minütiges Inkubieren bei RT sowie erneutes Zentrifugieren (10 min, 12000 rpm, 4° C) an. Dem Entfernen der Flüssigkeit folgte Trocknen der Pellets in der Vakuumzentrifuge (10 bis 15 min), damit verbleibende Äthanolreste die PCR nicht störten. Aufnehmen der Pellets in 30 µl Aqua bidest. und Belassen bei 4° C über Nacht führte zum Auflösen fester Bestandteile. Die Aufbewahrung von cDNA und DNA erfolgte bei - 20° C.

2.2.2 Analyse genomischer Abschnitte von MDM2 und Transkriptionsanalyse

Mit Einführung der Polymerasekettenreaktion (PCR) durch Mullis und Mitarbeiter im Jahre 1985 (Mullis et al. 1986), der Nutzung des hitzeresistenten Enzyms *Taq*-Polymerase aus dem Bakterium *Thermus aquaticus* (*Taq*; Saiki et al. 1988) und dem Einsatz von termisch-zyklisch arbeitenden PCR-Geräten sind längst auch in kleineren Laboratorien Genomanalysen möglich geworden.

Bei der PCR selbst handelt es sich um eine *in-vitro*-Technik, mit der gezielt DNA-Abschnitte in molekular großen Mengen auch aus DNA-Spuren hergestellt werden können. Um mit Hilfe dieser Methode DNA zu amplifizieren, benötigt man Oligonukleotid-*Primer* (kurze, einsträngige, synthetische DNA-Moleküle), die komplementär zu den DNA-Sequenzen sind, welche die zu vervielfältigende Ziel-DNA-Sequenz flankieren. Die beiden *Primer* müssen so konfiguriert werden, dass sie sich nicht aneinander anlagern können, da sie in diesem Fall zu unspezifischen Produkten führen.

Als „Bausteine“ für die PCR sind, wie unter physiologischen Bedingungen, 4 unterschiedliche Desoxynukleosidtriphosphate (dATP, dTTP, dCTP und dGTP; allgemein dNTPs) einzusetzen, den eigentlichen Syntheseschritt ermöglicht das Enzym *Taq*-Polymerase, Reaktionspuffer und Aqua sind weitere notwendige Reagenzien. Bei der PCR wird extrahierte DNA durch Hitzeeinwirkung denaturiert und liegt damit in Form von Einzelsträngen vor. Nachfolgende Absenkung der Temperatur führt zur Hybridisierung von zugesetzten synthetischen Oligonukleotiden (*Primern*) an die als Einzelstränge vorliegende DNA. Das Enzym *Taq*-Polymerase synthetisiert ausgehend vom *Primer* in Gegenwart von dNTPs neue doppelsträngige DNA-Stränge in 5' - 3' -Richtung, in dem es die dNTPs an die vorliegenden 3' -„Enden“ knüpft und dabei die zu amplifizierende DNA als Matrize nutzt. Bei diesem Schritt werden Nukleotide (dNTPs) und Oligonukleotide (*Primer*) verbraucht. Danach ist der erste PCR-Zyklus beendet, es folgt der nächste, wieder bestehend aus Denaturierung, *Annealing* (Phase der *Primer*-Anlagerung) und *Extension* (Polymerasereaktion im engeren Sinne).

Die Wahl der *Annealing*-Temperatur $Temp_{an}$ beeinflusst Spezifität und Effizienz der PCR-Reaktion und variierte je nach Länge und Sequenz der eingesetzten *Primer*. Sie wurde nach der Formel: $Temp_{an}$ *[° C] = 4 (G+C) + 2 (A+T) - (5 bis 10° C)* berechnet und in der Folge empirisch optimiert. Die errechneten „Schmelztemperaturen" eines eingesetzten *Primer*-Paares sollten möglichst nahe beieinander liegen. Die Wahl einer etwas erhöhten Temperatur steigert die Spezifität der Reaktion, senkt damit die Fehlerquote, aber auch die Ausbeute an PCR-Fragmenten.

DNA- oder cDNA-Lösung		x	µl
10x PCR-Puffer		5	µl
dATP, dTTP, dGTP, dCTP		200	µM
sense Primer (Primer s)		20	pmol
antisense Primer (Primer as)		20	pmol
Taq-Polymerase		0,5 – 1	Unit
Aqua bidest.	ad	50	µl

Tab. 2.2: Standard-PCR-Protokoll.

Die PCR erfolgte im Thermocycler. In Tab. 6.14 (vgl. Anhang) sind *Primer* und Reaktionsbedingungen nach dem Schema: Initialphase, Zykluszahl [Denaturierung / *Annealing / Extension*] und Abkühlphase beschrieben.

Die Vervielfältigung der cDNA von MDM2 folgte dem Vorgehen von Sigalas et al. (1996) über ein *semi-nested*-Verfahren, bei dem auch minimal vorhandene cDNA untersuchbar wurde. Dabei kommt das PCR-Produkt der ersten Runde in einer zweiten PCR mit einem weiter „innen" liegenden *sense-Primer* zum Einsatz.

Für die Mikrosatellitenanalysen wurden *Primer* gewählt, die einen definierten hochpolymorphen „Tandem"-Locus flankierten, jedoch selbst in einer *single-copy*-Region liegen. Die vorübergehende Aufbewahrung von PCR-Fragmenten erfolgte bei 4° C, anderenfalls bei - 20° C. Nach Ablauf der PCR wurde deren Erfolg über eine Agarose-Gel-Elektrophorese unter Zuhilfenahme der Fluoreszenzillumination überprüft. Zur Darstellung der Reaktionsprodukte kamen 1,5 %-ige Agarose-TBE-Gele mit 10^{-4} % (v/v) Ethidiumbromid zur Anwendung. Ethidiumbromid lagert sich in DNA ein und fluoresziert unter UV-Licht. Die Proben wurden im Verhältnis 5:1 (v/v) mit Auftragspuffer versetzt und im elektrischen Feld von 140 V in der Flachbett-Gel-Elektrophoresekammer mit 1 x TBE als Laufpuffer aufgetrennt. DNA wandert im elektischen Feld entsprechend ihrer molekularen Größe und Ladung mit unterschiedlicher Geschwindigkeit zur Anode, so dass sie im UV-Licht des Fluoreszenzilluminators unter Verwendung eines UV-Filters fotografiert werden konnte. Amplikons von MDM2 kamen nach einer Sequenzierreaktion im automatischen Sequenzer zur Analyse (vgl. Kap. 2.2.3) bzw. wurden über die *Genescan*-Software untersucht (Instabilität von MDM2-Mikrosatelliten, vgl. Kap. 2.2.4).

2.2.3 Analyse molekulargenetischer Veränderungen in Gensequenzen von MDM2 mittels automatisierter Sequenzierung

Im Agarose-Gel ausgewählte Einzelbanden wurden unter Zuhilfenahme des *QIA quick Gel Extraction Kits* nach Vorgaben des Herstellers aufgearbeitet bzw. gereinigt.

Die Sequenzierung von DNA erfolgte nach der Kettenabbruchmethode unter Verwendung fluoreszenzmarkierter Didesoxynukleotide (Sanger et al. 1977):

Für die Analyse im *ABI 310 DNA-Analyzer* mussten die PCR-Fragmente in einer Sequenzierreaktion endmarkiert werden. Zum Einsatz kamen eine Polymerase, *sense*- oder *antisense-Primer* sowie unmarkierte dNTPs und ddNTPs, die je nach eingebautem Nukleotid mit einem anderen Fluoreszenzfarbstoff markiert waren.

Bei Einbau in einen Strang verursachen die ddNTPs einen Kettenabbruch und damit den Stop der PCR an diesem Strang. Mit dem Einhalten einer bestimmten Mindestzeit liegen bis zu einer bestimmten Fragmentlänge stochastisch alle möglichen Fragmentgrößen vor (jeweils mit der Längendifferenz einer Base). Der Sequenzieransatz im Einzelnen:

PCR-Produkte (0,2 - 0,5 µg)		5,5	µl
Sense- oder Antisense-Primer (3,5 pmol)		0,5	µl
BigDyeTerminator Kit		4,0	µl
Aqua dest.	ad	20,0	µl

Tab. 2.3: Endmarkierung der PCR-Fragmente mittels Sequenzierreaktion.

Das *BigDyeTerminator Kit* (vgl. Tab. 6.15 im Anhang) beinhaltet Polymerase, Reaktionspuffer, dNTPs und ddNTPs. Die Sequenzierreaktion (25 x [96° C 30" / 52° C 15" / 60° C 4']) übernahm ein Thermocycler. Im Anschluss an die PCR wurden die resultierenden Fragmente bei RT mit 45 µl 0,3 M NaAcetat und 250 µl Äthanol (100 %) versetzt, zentrifugiert (15 min, 15000 rpm) und ausgefällt. Nach Dekantieren des Überstandes, erneutem Zufügen von 250 µl Äthanol (70 %), Zentrifugieren und Entfernen des Alkohols trocknete das Pellet für 5 min in der Vakuumzentrifuge. Die Sequenzierung erfolgte durch Kapillar-Gel-Elektrophorese im *DNA-Analyzer ABI PRISM 310*. Dabei liest ein Laser die entsprechend ihrer Größe „nacheinander ankommenden" Fragmente anhand ihrer Fluoreszenz aus. Die Sequenz entspricht der Rekonstruktion dieser Daten.

Das untersuchte Exon 12 von MDM2 kodiert u.a. die sog. *RING-Finger*-Domäne (vgl. Kap. 1.5.4), der eine wichtige Rolle im Zellzyklus zukommt.

2.2.4 Untersuchung auf MDM2-Mikrosatelliteninstabilität

Mikrosatelliten (MS), auch *short tandem repeats* (STR's) sind als nicht-informative, repetitive Gensequenzen von 2 bis 4 (maximal 6) Nukleotiden definiert (z.B. ATTCATTCATTCATTCAT usw.), wobei die Anzahl der *repea*t-Einheiten eines Mikrosatelliten-Locus und damit die Länge der Mikrosatellitenregion interindividuell variiert

(Litt et Luty 1989, Weber et May 1989, Tautz 1989). Es wird angenommen, dass aufgrund der Sequenz-repetitiven Eigenschaften der STR's der DNA-Polymerase möglicherweise dort gehäuft Fehler unterlaufen, die einen *repeat* zu viel oder zu wenig bedeuten.
Defekte DNA-Reparaturmechanismen können das Auftreten neuer Allel-Längen im Tumorgewebe nicht mehr korrigieren, so dass Mikrosatelliteninstabilitäten auftreten.
Genetische Alterationen repetitiver DNA-Sequenzen lassen sich in den meisten malignen Tumoren nachweisen, sind jedoch typisch für das Kolorektale Karzinom.
Lengauer et al. (1997) postulierten bei malignen Tumoren folgende Entwicklungsalternativen für Mikrosatelliten: Chromosomale Instabilitäten, bei denen gehäuft Deletionen als LOH (*loss of heterozygoty*) nachgewiesen werden und einen "Mutator-Phenotyp" mit Instabilität an den Mikrosatelliten-Loci (MSI).
Mikrosatelliteninstabilität im weiteren Sinne ist grundsätzlich intraindividuell zu erheben. Dazu gehört das Postulat eines tumorfreien, nativen Normalgewebes. Die DNA-Isolierung erfolgt aus Tumorgewebe und dem postulierten Normalgewebe (optimal Leukozyten des peripheren Blutes), entsprechend sind für eine Mikrosatellitenanalyse zwei PCR-Untersuchungen erforderlich.
Von molekulargenetischem Interesse sind Mikrosatelliten, die Zellzyklus regulierende Gene tangieren, da hier z.B. durch den Mechanismus Deletion eines oder beider Allele, (z.B. nicht aber durch Punktmutationen) Veränderungen im Muster dieser heterogenen Sequenzen auf lokale Genomfehler hinweisen können. Untersuchungen der Mikrosatelliten haben sich außerhalb der Krebsforschung bei Fragestellungen zur Identitätssicherung in der Forensik, zum Vaterschaftsnachweis und bei der Knochenmarkstypisierung etabliert.
In der vorliegenden Studie wurden die Loci D12S80 und D12S83 untersucht. Initial definierten wir die in der Fluoreszenz-unterstützten Zystoskopie makroskopisch unveränderte Harnblasenschleimhaut als Referenzgewebe (und damit Referenz-DNA), während in der Folge die Referenz-DNA aus Leukozyten des peripheren Vollblutes der Patienten gewonnen wurde. Nur die Daten aus der Verwendung der Leukozyten-DNA kamen zur Auswertung (29 Fälle).

2.2.5 Darstellung der MDM2-mRNA durch *in-situ*-Hybridisierung (ISH)

Physiologische Hybridisierungen und experimentelle molekulare Hybridisierungsverfahren beruhen auf der Reassoziationskinetik doppelsträngiger Nukleinsäuremoleküle bei der zwei komplementäre Einzelstränge über Wasserstoffbrückenbindungen assoziieren und aneinander lagern.
Im Detail bildet dabei eine artefiziell markierte RNA-Sonde (Gensonde), deren Sequenz komplementär zur mRNA ist, bei geeigneten Reaktionsbedingungen mit der zellulären

mRNA ein *in situ* topologisch visualisierbares Hybrid. Die erste erfolgreiche ISH einer Einzelkopiesequenz gelang am humanen Insulin-Gen (Harper et Saunders 1981). Repetitive Sequenzen waren bereits mehr als eine Dekade zuvor über diese Methode nachweisbar (Gall et Pardue 1969, John et al. 1969).

2.2.5.1 Vorbereitende Arbeitsschritte

Ubiquitär vorkommende RNasen zerstören die Integrität von RNA. Um die RNA untersuchbar zu machen, verhinderte hochreinliches Arbeiten z.B. unter Verwendung von Einmalhandschuhen die Autolyse oder Kontamination. Die Glasgeräte wurden nach Reinigung in Aluminiumfolie gehüllt und mindestens 2 h bei 180° C inkubiert.

2.2.5.2 Herstellung der RNA-Sonden

Die Synthese der Sonden für die vorliegende Arbeit basiert auf humaner cDNA, die im ersten Schritt mittels spezieller T3- und T7-*Primer* amplifiziert wurde. Diese *Primer* bestehen am 5`-Ende aus Sequenzen, die die aus Escherichia-coli-Phagen stammenden T3- bzw. T7-RNA-Polymerasen als spezifische Erkennungssequenz benötigen. 3`-gelegene Sequenzen der *Primer* bilden die humane Ziel-Geninformation ab:

T3-MDM2 5'-ATT AAC CCT CAC TAA AGG GAA TTG CTT GTC TAC ATA CTG G-3'
T7-MDM2 5'-GGA TCC TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGA GGC TCA ACA CAA GCT GAA GAG C-3'

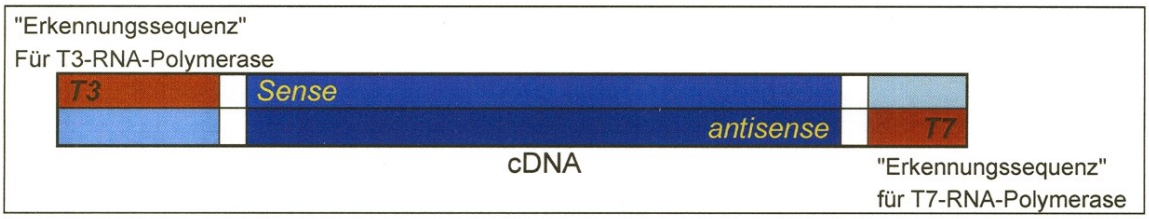

Abb. 2.1: Vorbereitung der RNA-Sondenherstellung über PCR-Verfahren.
In einer ersten PCR wurde humane cDNA mit speziellen T3- und T7-MDM2-*Primern* amplifiziert und lag damit zunächst als Doppelstrang vor.

Die doppelsträngigen PCR-Produkte (durch T3 und T7 elongierte quasi-cDNA; vgl. Abb. 2.1) unterlagen der Aufreinigung mittels Gel-Elektrophorese und nachfolgender Anwendung des *Gel-Extraktion-Kits* (vgl. Tab. 6.15 im Anhang) nach Herstellervorgaben.
Im zweiten Schritt, der eigentlichen Sondensynthese, wurden in einem Ansatz T7-RNA-Polymerase und im anderen T3-RNA-Polymerase genutzt. Damit ließen sich *antisense*-Sonde (Positivsignal) einerseits und die *sense*-Sonde (Negativkontrolle) andererseits herstellen.
Folgender Ansatz war dazu in Eppendorf-Cups im Eisbad anzusetzen:

10x Transkriptionspuffer		2,0	µl
DIG-Mix (dNTPs, digoxigeninmarkierte Ribonukleotide)		2,0	µl
T3- bzw. (oder) T7-Escherichia-coli-Polymerase		1,0	µl
RNase-out (bzw. *Superase-IN*, RNase-Inhibitor)		1,0	µl
Template (cDNA aus RNA umgeschrieben)		5,0	µl
DEPC-*Aqua*	ad	20,0	µl

bei 37° C über 2 h inkubieren, danach vorübergehend auf Eis

Tab. 2.4: Synthese der sense- und antisense-Sonde (1).

Nicht eingebaute, aber markierte DIG-NTP's mussten über eine Fällung der RNA entfernt werden. Dazu nutzt man die Eigenschaft von Nukleinsäuren, aus wässriger Lösung auszufallen, wenn die Salzkonzentration steigt und Äthanol addiert wird. Dazu wurde in das Eppendorf-*Cup* nach Ablauf der Inkubation gegeben:

DNase (RNase-frei, baut das Template ab)		2,0	µl
EDTA-Lösung (0,5 M; pH = 8,0 in DECP-Aqua)		1,0	µl
DEPC-*Aqua*	ad	50,0	µl
NH_4Acetat (5 M; pH = 7,5 in DECP-Aqua)		5,0	µl
Äthanol (100 %, Temp = - 20° C)		75,0	µl

Kurzes, vorsichtiges Vortexen, Lagerung bei - 20° C über Nacht

Tab. 2.5: Synthese der sense- und antisense-Sonde (2).

Unmittelbar dem Frostfach entnommen wurde das Inkubat in der gekühlten Zentrifuge bearbeitet (30 min, 4° C, 14000 rpm), der Überstand vollständig dekantiert bzw. abpipettiert und das Pellet durch Zugabe von 100 µl Äthanol (70 %) resuspendiert. Weiteres Zentrifugieren, Dekantieren und Trocknen (10 - 15 min) folgten, bevor das Pellet in 30 µl DEPC-*Aqua* aufgenommen wurde.

Im Anschluss war die Synthese der Sonde, die formal einer Transkription mit Digoxigenin-markiertem UTP entspricht, in der Gelelektrophorese zu überprüfen. Dazu wurden 5 µl Sonde mit 5 µl 6 x Gel-Ladepuffer (Xylencyanol) und 5 µl Formamid versetzt, auf ein 1,5 % Agarosegel aufgetragen und einer Spannung von 80 - 100 V über maximal 10 min ausgesetzt. Bis zur Verwendung wurde die Sonde bei - 70° C gelagert. Die Markierung mit Digoxigenin stellt das Epitop für den späteren, Antikörper-vermittelten Nachweis dar.

Ein alternatives, elegantes, aufwendiges und aus diesem Grund in vielen Labors nicht verfügbares *in-vivo*-Verfahren der Sondensynthese nutzt bakterielle Plasmide zum Vervielfältigen der benötigten Sonden.

2.2.5.3 Hybridisierung am Paraffinmaterial

Die 3 - 5 µm dünnen histologischen Paraffinschnitte der Präparate wurden vorbereitend zur Entparaffinisierung in Xylol inkubiert, in der absteigenden Äthanolreihe (100 %, 90 %, 70 %) gewaschen und wiederholt in erwärmtem 1 x PBS-DEPC-Puffer gespült.

Bedeckende Inkubation des Gewebes in gebrauchsfertiger Proteinase K (4 %, v/v) über 4 min (bei RT) erleichterte der RNA-Sonde das Penetrieren und Anlagern an die teilweise durch Proteine überlagerte zelluläre RNA (Permeabilisierung). Spülen in PBS-DEPC, Entwässern in einer ansteigenden Äthanolreihe und Lufttrocknen in der vor Staub schützenden, Hybridisierungskammer (37° C, 20 min) schlossen sich an.

Die anzentrifugierte Sonde wurde entsprechend der empirisch optimierten Konzentration in Hybridisierungspuffer (2 - 8° C) verdünnt:

T7-Sonde: 2 µl Sonde + 50 µl Puffer

T3-Sonde: 1 µl Sonde + 50µl Puffer

und im vortemperierten Thermomixer (Wasserbad, 55° C, 5 min) inkubiert. Das aufzutragende Sondenvolumen orientierte sich an der Schnittgröße. Die optimale Temperatur für die Inkubation der Sonden wurde durch eine Heizplatte (85° C, 5 min) vorgegeben, bevor die Präparate über Nacht bei 48° C im Hybridisierungsofen weiter inkubierten.

Nach Abkühlen der Kammer wurden die Deckgläser durch Spülen in TBST-Puffer entfernt. Waschschritte bei erhöhter Temperatur und Salzkonzentration in Waschpuffer 1 (2 x 5 min bei RT bzw. 2 x 10 min bei einer Hybridisierungstemperatur von 48° C) dienten dem Entfernen eventuell fehlgepaarter RNA-Sonden.

Nachfolgend beschriebene Arbeitsgänge dienten der immunhistochemischen Darstellung der gebundenen Sonde über eine extern zugefügte Peroxydase. Dazu wurde die endogene Peroxidaseaktivität durch eine Peroxidaseblockierlösung (je ca. 100 µl, 30 min, RT) unterdrückt und die Präparate wiederholt in TBS-Tween-Puffer gewaschen. Bedecken der Schnitte mit Antikörperverdünnungsreagenz (*Antibody Diluent*) erhöhte die Affinität des Antikörpers bzw. die Permeabilität des Gewebes. Nach Entfernen des *Antibody Diluent* und Auftragen der Antikörperlösung (aus mit *Antibody Diluent* verdünntem HRP-konjugiertem Anti-DIG-Antikörper; *rabbit*; 1:500, HRP = *horseradish peroxidase* = Meerrettichperoxidase) erfolgte die Inkubation der Präparate in einer feuchten Kammer (DEPC-*Aqua*, RT, 1 - 2 h) und dreimaliges Waschen in 1 x TBST.

Die rötlich-bräunliche Färbung als eigentliche Indikatorreaktion trat nach Pipettieren des DAB-Chromogen ein, welches das Substrat für die Meerrettichperoxidaseaktivität des Konjugates des Anti-DIG-Antikörpers darstellt.

Die Reaktion mit dem Chromogen war durch Waschen in Aqua bidest. zu stoppen, sobald sich an der Negativkontrolle ein Signal zu entwickeln begann (engmaschige mikroskopische Kontrollen). Gegenfärben in Meyers Hämalaun (1:5 v/v, 10 – 20 s), anschließendes „Bläuen“ in Leitungswasser (5 min, RT) sowie das Eindecken der Schnitte mit *Aquamount* schlossen die Laborarbeiten ab.

2.2.5.4 Visualisierung

Das Ergebnis ermöglicht Rückschlüsse auf die Topologie der mRNA von MDM2 und Hinweise auf deren Quantität (Braunfärbung der molekularen Ziele). Braune Präzipitate (Abbau des DAB durch das Meerrettichperoxidase-Konjugat des Anti-DIG-Antikörpers) heben sich von den üblichen Chromosomenfärbungen deutlich ab.

2.2.6 Immunhistochemischer Nachweis des Proteins MDM2

Die Methode der Immunhistochemie hat sich in den letzten Dekaden nicht zuletzt wegen der unkomplizierten Anwendbarkeit auf eine Vielzahl von Fragestellungen in der Pathologie in der Routinediagnostik durchgesetzt. Beispielsweise bestimmt der Nachweis von Keratin bei der Frage nach dem Ursprungsgewebe (Plattenepithel) beim Nicht Kleinzelligen Lungenkarzinom oder Harnblasenkarzinom die Therapie der Erkrankung.
Methodische Grundlagen werden im Kapitel 2.2.6.2 beschrieben.

2.2.6.1 Herstellung und Vorbereitung der Schnitte

Das Gewebe musste unmittelbar fixiert und frisch bearbeitet (Kryoschnitt, für IHC eher unüblich) oder aber nach Fixation in ein konservierendes Medium eingebettet werden. Andernfalls setzt unmittelbar nach der operativen Entnahme in den Gewebsproben Autolyse durch lysosomale Enzyme bzw. Heterolyse über ein Wachstum von Fäulnisbakterien und Schimmelpilzen ein. Formalin als das in der Routine angewandte Fixierungsmittel vernetzt Proteine und verleiht dem Gewebe eine gummiartige Konsistenz, erschwert nachteiliger weise jedoch die immunhistochemische Darstellung von Proteinen. Um für das Aufbringen auf Objektträger dünne, gleichmäßige Schnitte herstellen zu können, musste das Material Stabilität sowie eine homogene Konsistenz aufweisen, was durch Einbetten in Paraffinwachs zu erreichen war.
Zum Färben der mittels Mikrotom gewonnenen und auf beschichtete (verhindert Lösen während der thermischen Behandlung) Objektträger gebrachten dünnen Schnittpräparate wurde zunächst das Paraffin durch zweimaliges Inkubieren in Xylol, Anwendung einer absteigenden Alkoholreihe und Spülen in Aqua dest. entfernt und anschließend die Schnitte wiederholt in einer Mikrowelle in Citratpuffer (pH = 6.0) bei hohen Temperaturen inkubiert. Nachfüllen des Objektträgergefäßes mit Aqua dest. verhinderte das Austrocknen der histologischen Schnitte. Nach dieser kombiniert thermisch-chemischen Reinigung und einer Abkühlphase schloss sich sorgsames Spülen zunächst in Aqua dest. und schließlich in Tris-Puffer an.

2.2.6.2 Färbeverfahren nach der APAAP-Methode

Mit der 1984 durch die Arbeitsgruppe um Cordell eingeführte APAAP-Methode (Alkalische Phosphatase - anti - Alkalische Phosphatase - Methode), die auch als unmarkierte Antikörpertechnik (*unlabeled antibody method*) bezeichnet wird, kam eine verbreitete immunhistochemische Vorgehensweise unter Zuhilfenahme eines kommerziellen Systems zur Anwendung.

Ein unkonjugierter Primärantikörper lagert sich an das definierte zelluläre Antigen. Der ebenfalls unkonjugierte Sekundärantikörper wurde im Überschuss zugesetzt und war so konfiguriert, dass er gegen die Immunglobuline, aus denen der primäre Antikörper stammt, gerichtet ist. Da einer seiner beiden F_{ab}-Arme an den ersten Antikörper, der andere aber an den Antikörper des Enzym-Immunkomplex (APAAP-Komplex, *label*) bindet, wird er auch als „Brücke“ oder *link* bezeichnet.

Folglich müssen Primärantikörper und der Antikörper des Enzym-Immunkomplexes (aus zwei Molekülen alkalischer Phosphatase und dem dagegen gerichteten Antikörper) aus derselben Spezies stammen. Der letzte Schritt bestand im Zugeben des Substrates der alkalischen Phosphatase, der eigentlichen Indikatorreaktion. Dazu muss die endogene alkalische Phosphatase gehemmt werden, da auch sie das Substrat umsetzen würde, aber unabhängig vom Primärantikörper in der Zelle lokalisiert ist, letztlich also ein starkes, unkontrollierbares Störsignal liefern würde. *Levamisol* hemmt die endogene Phosphataseaktivität (Ponder et Wilkinson 1981).

2.2.6.3 Charakterisierung des MDM2-Antikörpers

Die gute Paraffingängigkeit des monoklonalen Maus-Antikörper SMP14 (DAKO, Verdünnung 1:50), dessen Antigen das Epitop der Aminosäuren 154 bis 167 von MDM2 ist (entspricht der Proteinregion zwischen N-terminaler p53-Bindedomäne und Kernlokalisationssignal und damit auf das Gen bezogen Exon 7 bzw. 8, vgl. Kap. 1.5.2), war das Auswahlkriterium für diesen Antikörper. Die übliche Lokalisation des MDM2-Proteins ist die im Nucleolus (Chen J et al. 1995).

Mit dem identischen Antikörper SMP14 immunhistochemisch untersuchte Karzinome unterschiedlicher Entität ergaben eine hohe Variabilität in ihrer MDM2-Immunoreaktivität von durchschnittlich ca. 15 %, die höchsten Werte fanden sich am Lungen- und Thyroideakarzinom mit ca. 43 bzw. 45 % (Evans et al. 2001).

2.2.6.4 Das Vorgehen im Einzelnen

Nach thermisch-chemischer Reinigung der Schnitte wurden die Primärantikörper-Verdünnungen angesetzt. Die Objektträger inkubierten mit dem Antikörper bzw. dem Färbesubstrat *Fast Red* in einer feuchten Kammer bei RT, um ein Austrocknen der

histologischen Schnitte zu verhindern. Zunächst wurden 30 bis 50 µl des Primärantikörpers für 30 min auf das Gewebe gebracht. Es folgten sorgsames Waschen in Tris, Inkubation mit 30 µl des Sekundärantikörpers *link* für 20 min, ein weiterer Waschschritt und Zugeben des enzymkonjugierten Antikörpers (20 min) sowie ein letztes Waschen in Tris vor dem Inkubieren mit 50 µl des Farbstoffes *Fast Red* für wiederum 20 min.
Anschließend wurden die Schnitte in Aqua dest. gespült, zur Kernfärbung für 1 bis 2 min mit (äthanolfreiem) Hämalaun versetzt, für 5 min in warmen Leitungswasser gewaschen und letztlich mit wasserlöslichem Eindeckmittel versiegelt.

2.2.6.5 Lichtmikroskopische Auswertung immunhistochemischer Färbungen

Die semiquantitative mikroskopische Analyse der immunhistochemisch gefärbten Schnittpräparate erfolgte in Kooperation mit Herrn Prof. Dr. med. E. Kunze (ehem. Abteilung Osteo- und Hämatopathologie, Zentrum für Pathologie, Universitätsklinikum Göttingen). Die relative, an der Gesamtanzahl der Karzinomzellen des histologischen Schnittes relativierte Zellzahl, mit positiver MDM2-Antikörperfärbung (Nukleus) wurde angegeben.

2.2.7 Erhebung epidemiologischer Daten

In Anlehnung an große epidemiologische Studien zum Risikoprofil des Harnblasenkarzinoms unter Berücksichtigung *habitueller, familiärer und beschäftigungsbezogener Merkmale* wurden im persönlichen semistrukturierten Interview individuelle anamnestische Daten gesammelt. Bei der Vielzahl und Heterogenität erhobener Items kamen nochmals selektionierte blasenkarzinogene Faktoren zur weiteren Auswertung - auch im Hinblick auf die relativ geringe Gesamtgröße der Einzelgruppen.

3. Ergebnisse

3.1 Überblick

In der vorliegenden Arbeit wurden 54 Urothelkarzinom-Fälle der Harnblase bzw. ableitenden Harnwege von 53 Patienten untersucht (vgl. Tab. 6.2 im Anhang).

Mit einem mittleren Erkrankungsalter von 69,3 Jahren bildeten Männer den überwiegenden Anteil (77,8 %), während Frauen im Mittel etwa 2 Jahre (Median) später diagnostiziert wurden bzw. erkrankten. Bei Rezidivfällen fand das aktuelle Alter und nicht das Ersterkrankungsalter Berücksichtigung. Die Diagnose konnte in der Hälfte der Fälle bei den Männern, bei den Frauen lediglich in 25 % der Fälle im frühen (pTa) Stadium gestellt werden. Die Entität mit der besten Prognose (pTaG1) war quantitativ geschlechtsunabhängig verteilt (0,31 vs. 0,25).

	männlich		weiblich		gesamt	
	absolut	anteilig	absolut	anteilig		
N	42	0.778	12	0.22	54	1.0
Alter (mw)	69.3		75.6		70.7	
Alter (Median)	72		74			
pTa	24/42	0.571	3/12	0.250	27	0.50
pT1	2/42	0.048	1/12	0.083	3	0.056
pT2	11/42	0.262	7/12	0.583	18	0.333
pT3	5/42	0.119	1/12	0.083	6	0.111
G1	13/42	0.310	3/12	0.250	16	0.296
G2	18/42	0.429	5/12	0.417	23	0.426
G3	11/42	0.262	4/12	0.333	15	0.278
pTaG1	13/42	0.310	3/12	0.250	16	0.296
Rezidive	11/42	0.262	4/12	0.333	15	0.278

Tab. 3.1: Verteilung von Alter, Geschlecht, Stadium und Grading bei 54 HBCA-Fällen. Die Entität mit der günstigsten Prognose pTaG1 entspricht jedoch nicht den sog. PUNLMP (vgl. Kap. 1.2.2).

Unabhängig vom Geschlecht fand sich in jeder vierten Anamnese ein bereits behandeltes Harnblasenkarzinom, 14,8 % der Patienten berichteten eigene Malignomerkrankungen anderer Entität, während etwa jeder Dritte eine positive Familienanamnese für maligne Neubildungen angab (Angehörige ersten Grades).

Lediglich fünf Patienten mit Harnblasenkarzinom wiesen bezüglich Raucherstatus, Schadstoffexposition, Familien- und Eigenanamnese eine leere Anamnese auf

(Kontrollgruppe 0). Fünf weitere Erkrankte erinnerten bei negativer Expositions- und Eigenanamnese einen Verwandten ersten Grades mit einer Tumorerkrankung (exklusiv HBCA). Da Menschen mit positiver Malignomfamiliengeschichte grundsätzlich statistisch keine gesteigerte Inzidenz für das HBCA aufweisen, wurden beide Gruppen formal in einer Kontrollgruppe 1 (KG 1) zusammengefasst.

Rauchen wird als der entscheidende Kausalitätsfaktor für etwa jedes zweite Urothelkarzinom angesehen. Im untersuchten Kollektiv waren die Gruppen der Nichtraucher, Raucher und Exraucher vergleichbar groß (17 / 54; 19 / 54; 18 / 54), somit waren die „Niemalsraucher“ quantitativ im Gegensatz zur Verteilung in der Gesamtbevölkerung eindeutig unterrepräsentiert. Die Exposition gegenüber Karzinogenen wird im Einzelnen im Kapitel 3.3.2 dargestellt.

3.2 DNA-Untersuchungen von MDM2

Für den Locus 12q14-15 wurden zwei das MDM2-Gen flankierende Mikrosatelliten (Mitchell et al. 1995, Taubert et al. 2003) und das Exon 12 von MDM2, das u.a. die sog. *RING-Finger*-Domäne kodiert, analysiert.

3.2.1 Analyse eines kodierenden Abschnittes des MDM2-Genes (Exon 12)

Der DNA-Nachweis fiel in sämtlichen 54 Fällen positiv aus (PCR). Aus dem Gesamtkollektiv liegen 28 vollständige, fehlerfreie Sequenzierungen des Exon 12 vor. Mehrere Befunde zweifelhafter Mutationen konnten in der Zweitanalyse mit dem *antisense-Primer* nicht bestätigt werden. Verglichen mit veröffentlichten Sequenzen zeigte sich bei lediglich einem von 28 Patienten im Tumor eine heterozygote

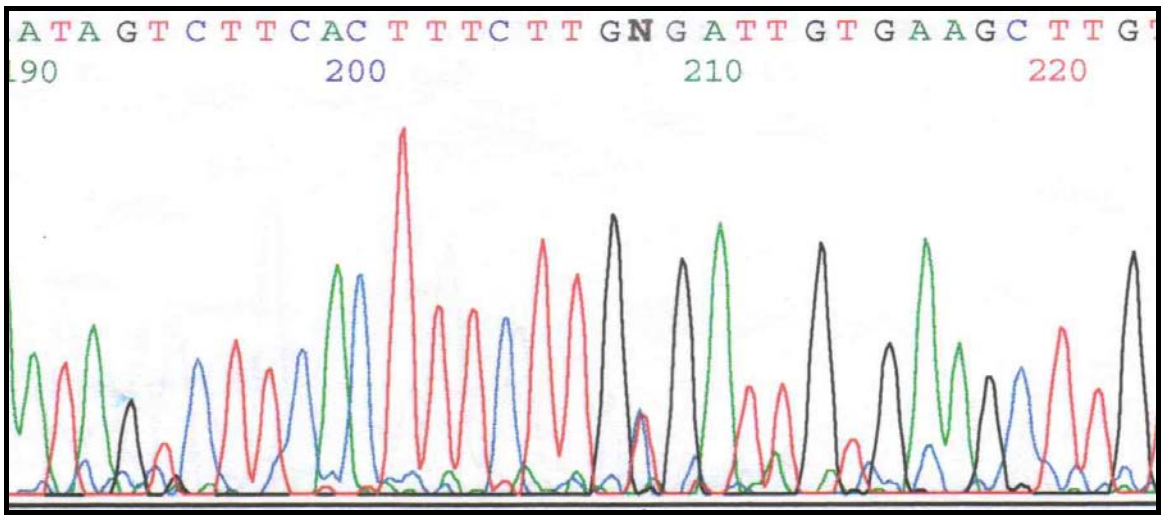

Abb. 3.1: Heterozygote Mutation von MDM2 Exon 12.
Alteration bei „208“ (bp 1460; NM_002392): Dritte Base von Serin (Aminosäure 394 von MDM2, TCA mit Mutation zu TCG), nicht-kodierender Strang gezeigt, in „Übersetzung“ zu lesen.

Punktmutation (vgl. Abb. 3.1), die für die Aminosäurensequenz ohne Effekt blieb (sog. *stille* Mutation).

3.2.2 Analyse zweier das MDM2-Gen flankierende Mikrosatelliten: MSI 12S80 und 12S83

Zu Beginn der Studie war mit zystoskopisch-makroskopisch unveränderter Harnblasenschleimhaut ein suboptimales Referenzgewebe gewählt worden, da selbst zystoskopisch unauffälliges Urothel bereits Mikrosatelliteninstabilitäten aufweisen kann (vgl. Kap. 1.2.2). Daher wurde bezüglich der Analyse auf Mikrosatelliteninstabilität nach 25 untersuchten Fällen der Untersuchungsansatz verändert und die Referenz-DNA aus Leukozyten des peripheren Blutes gewonnen.

Unter 29 vorliegenden Mikrosatelliten-Genscan-Paaren fanden sich zwei Instabilitäten bzw. *loss of heterozygoty* (LOH) am Locus MSI 12S83 als Hinweis auf genetische Alterationen am MDM2-Gen-Locus (bei geändertem Referenzgewebe).

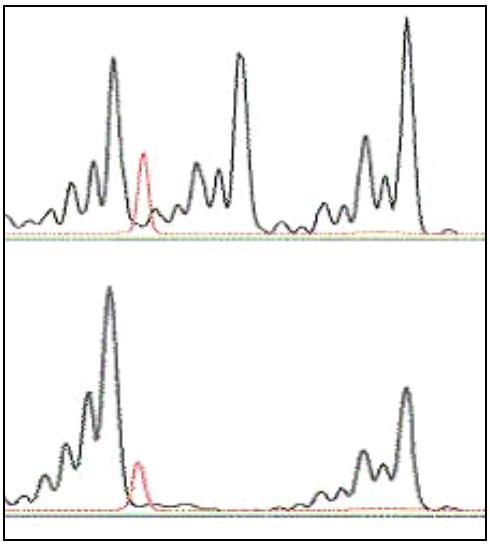

Abb. 3.2: Mikrosatelliteninstabilität am MSI 12S83.
Oben Tumorgewebe, unten Referenzgewebe. Am Tumorgewebe tritt eine neue Bande als Hinweis auf genetische Alterationen am MDM2-Genlocus auf.

3.3 RNA-Untersuchungen von MDM2

Spleißvarianten liegen im Vergleich zur RNA des MDM2-Proteins in deutlich geringerer Konzentration vor. Um die Sensitivität der Methode zu erhöhen war die PCR für die Analyse der MDM2-RNA *a priori* als Wiederholungsuntersuchung angelegt worden. Bei Spleißvarianten wurde als negativ ein zweifach negativer Befund und als positiv bereits ein einmal positives Ergebnis gewertet, eine Negativkontrolle diente als interne Kontrolle. Die Zuordnung der Spleißvarianten erfolgte über die Größenschätzung in der

Gelelektrophorese in der Darstellung unter ultraviolettem Licht im Vergleich mit einem Standard (Abb. 3.3).

In zwei pTaG2-Fällen fehlte die MDM2-mRNA der vollen Länge (fl-MDM2-mRNA), es lagen jedoch kleine MDM2-Spleißvarianten (250 bzw. 300 bp) vor, außerdem wiesen diese beiden Urothelkarzinome eine positive MDM2-Immunoreaktivität auf (vgl. Kap. 3.5), bei einem HBCA handelte es sich um ein Rezidiv.

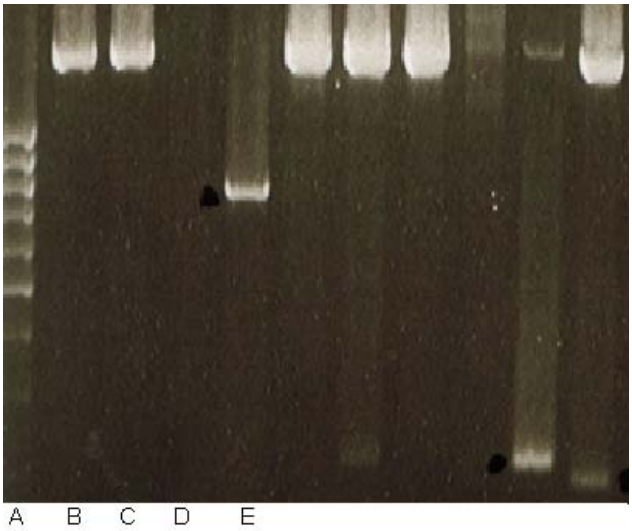

Abb. 3.3: Beispielhafte Darstellung der MDM2-RNA und Spleißvarianten mittels Agarose-Gel-Elektrophorese.
A Größenstandard, **B** und **C** MDM2-fl-mRNA 1561 bp, **D** kein Nachweis von MDM2-mRNA, **E** Variante 800 bp (ca.), in der nicht-beschrifteten 2. Spur von rechts MDM2-fl-mRNA und eine Variante der Größe 200 bp (ca.).

Die MDM2-Spleißvarianten-Positivität korrelierte nicht mit dem Geschlecht der Patienten (64,3 % vs. 58,3 %; Männer vs. Frauen).

3.3.1 Relation von Ausbreitungs- und Differenzierungsgrad der HBCA zur Verteilung der Spleißvarianten von MDM2

Tabelle 3.2 bzw. Abbildung 3.4 zeigen die Verteilung von Tumorstadium und das Vorliegen von Varianten der MDM2-mRNA für selektionierte Daten unter Berücksichtigung der Rezidivfälle und der Entität pTaG1, dem Stadium mit der besten Prognose. Dabei wiesen *fortgeschrittene Tumoren* global *häufiger* Spleißvarianten auf, 72 bzw. 83 % im Stadium pT2 und pT3 gegenüber 50 % in der Gruppe pTaG1. Ähnliche Tendenzen waren bezüglich des Grades der Differenzierung auffällig: Bei differenzierten Harnblasentumoren wurden seltener Spleißvarianten gefunden als in schlecht und mäßig differenzierten Karzinomen (50 % bei G1 vs. 60 % bei G3 und 74 % bei G2).

	pTaG1	pTa	pT1	pT2	pT3	G1	G2	G3	Rez	non-R	N
N	16	27	3	18	6	16	23	15	15	39	54
sv pos	8	14	2	13	5	8	17	9	12	22	34
sv pos	**0.50**	**0.52**	**0.67**	**0.72**	**0.83**	**0.50**	**0.74**	**0.60**	**0.80**	**0.56**	**0.63**
250	0.13	0.11		0.17		0.13	0.13	0.07	0.13	0.10	
300	0.19	0.15		0.11	0.17	0.19	0.13	0.07	0.20	0.10	
700	**0.06**	**0.07**		**0.22**	**0.17**	**0.06**	**0.09**	**0.27**	0.13	0.13	
800	**0.25**	**0.22**		**0.22**	**0.33**	**0.25**	**0.26**	**0.13**	**0.13**	**0.26**	
850	0.06	0.07	0.33	0.06	0.17	0.06	0.13	0.07	**0.20**	**0.05**	
700	**0.13**	**0.14**		**0.31**	**0.20**	**0.13**	**0.12**	**0.44**	0.17	0.22	
800	**0.50**	**0.43**		**0.31**	**0.40**	**0.50**	**0.35**	**0.22**	**0.17**	**0.45**	
850	0.13	0.14	0.50	0.08	0.20	0.13	0.18	0.11	**0.25**	**0.09**	

Tab. 3.2: Expressionen von MDM2-Spleißvarianten in Relation zum histopathologischen Befund. Relative Häufigkeit bei 54 HBCA. Die letzten drei Zeilen zeigen selektionierte Daten (sv 700, 800, 850 bp [ca.] Relation zur Zahl der Spleißvarianten-positiven Fälle). Vollständige Tabelle im Anhang als Tab. 6.1.

Wie Abbildung 3.4 weiter darstellt, lag die häufig exprimierte *Variante der Größe 800 bp (ca.)* in jedem zweiten gut differenzierten, MDM2-Varianten-positiven Karzinom (G1) vor, während sie bei entdifferenzierten Urothelkarzinomen nur in 22 % der Fälle positiv

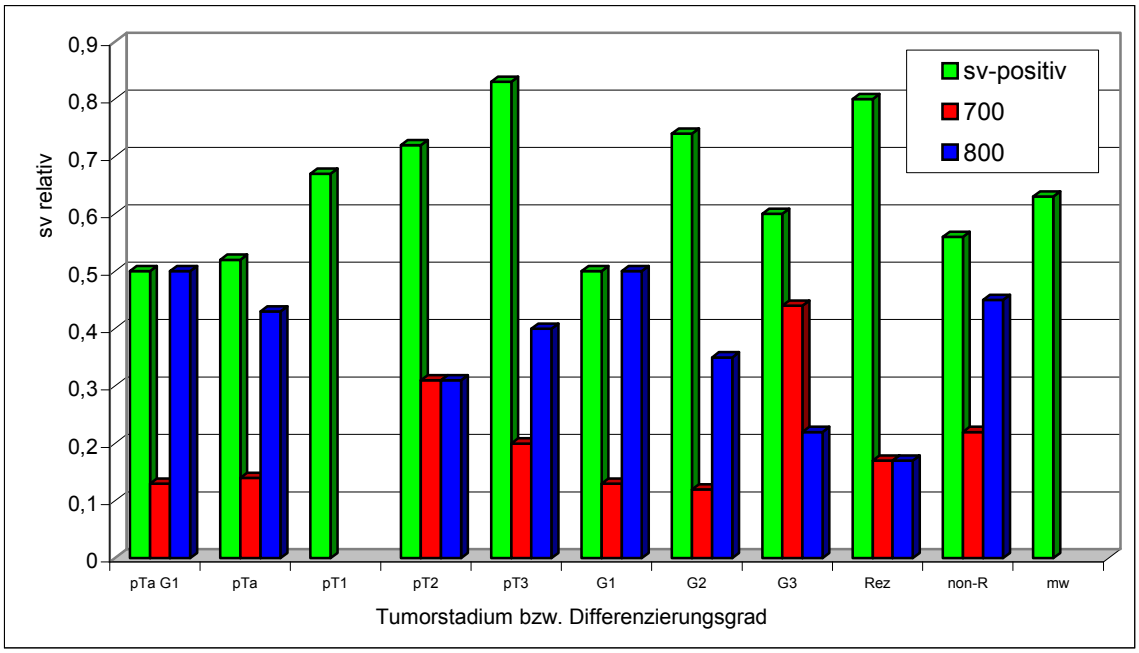

Abb. 3.4: Häufigkeit des Vorliegens zweier MDM2-Spleißvarianten in Relation zum Tumorstadium.
Spleißvarianten 700 bzw. 800bp (ca.) und gesamt (sv-positiv) bei verschiedenen HBCA-Stadien bzw. Differenzierungsgraden sowie nach Rezidiv (Rez) und Erstmanifestation eines HBCA (non-R).

getestet wurde, jedoch nahezu ausschließlich bei Nicht-Rezidivfällen zu finden war. Die mRNA-*Variante der Größe 700 bp (ca.)* wurde von entdifferenzierten Karzinomen deutlich häufiger (0,27 gesamt bzw. 0,44 bezogen auf die sv-positiven Fälle) exprimiert als bei HBCA der Gruppen G1, G2 bzw. pTa (0,07, 0,06 bzw. 0,09 gesamt). Ausschließlich Urothelkarzinome *mit* MDM2-Spleißvarianten analysiert, sind die Tendenzen selbstverständlich deutlicher, wie die 3 unteren Zeilen der Tabelle 3.2 dokumentieren (Grundlage der graphischen Darstellung).

12 von 15 Patienten mit einem HBCA-Rezidiv wiesen Spleißvarianten auf (80 %) im Vergleich zu 56 % bei erstmals manifestierten Karzinomen. Dabei lag, wie oben beschrieben, die Spleißvariante der Größe 800 bp (ca.) deutlich häufiger in den Nicht-Rezidivfällen vor (45 vs. 17 %), während die Variante der Größe 850 bp (ca.) ein reziprokes Verteilungsmuster aufwies (25 % bei den Rezidiven vs. 9 % bei Nicht-Rezidiven) bezogen auf die Zahl der MDM2-Spleißvarianten-positiven Urothelkarzinome.

3.3.2 Relation von Risikofaktoren (Anamnese) und MDM2-Varianten

Alle untersuchten Individuen waren an einem Urothelkarzinom der Harnblase erkrankt, eine gesunde Kontrollgruppe wurde nicht erfasst.

Um den Einfluss bekannter Risikofaktoren auf molekulargenetische Veränderungen untersuchbar zu machen, konnten Patienten ohne Exposition gegenüber bekannten

sv	KG0	KG1	Σ NR	R1+2	R3+4	ER1+2	ER3+4	FA-HBCA
N	5	10	17	3	15	8	9	2
sv pos	3/5	6/10	10/17	3/3	10/15	5/8	5/9	2/2
sv pos	**0.60**	**0.60**	**0.59**	**1.0**	**0.67**	**0.63**	**0.56**	1.0
250	**0.67**	**0.33**			**0.10**	**0.40**		
300	0.33	0.33	0.30		0.30		0.20	
500						0.40		0.50
700	0.33	0.17	0.20		0.20	0.20	0.20	
800	0.33	0.50	0.50		0.40	0.20	0.40	
850		0.17	0.10		0.20	0.20	0.20	0.50
1000	0.33	0.17	0.10					

Tab. 3.3: Spleißvarianten in Relation zum Risikoprofil (Anamnese).
Absolute und relative Häufigkeit bei 54 Fällen von HBCA; Raucher mit geringem Konsum (< 20 py) wurden unter **R1+2**, Raucher mit stärkerem Konsum unter **R3+4** gelistet, Exraucher in den beiden Konsumstufen (**ER**) und zwei Fälle mit positiver Familienanamnese (**FA-HBCA**). In **Σ NR** sind alle Nichtraucher zusammengefasst, unabhängig von der beruflichen Exposition. Darstellung selektionierter sv-positiver (sv pos) Fälle: Verteilung häufig vorliegender Spleißvarianten: Vergleichbare Relationen in Kontrollgruppen vs. Expositionsgruppen mit sv 250 bp (ca.) als Ausnahme. Vollständige Tabelle als Tab. 6.3 im Anhang.

Risikofaktoren (Kontrollgruppen KG0 und KG1, vgl. Kap. 3.1) herangezogen und mit exponierten Patienten verglichen werden.

Die Häufigkeit des Auftretens von Spleißvarianten *insgesamt* unterschied sich *nicht* relevant bei unterschiedlicher Nikotinexposition bezogen auf sog. *packyears* (vgl. Tab. 3.3) und lag zwischen 50 und 67 %. Ebenso zeigte sich keine Korrelation des Vorliegens definierter Spleißvarianten mit der Risikokonstellation. Einzige Ausnahme bildete die *MDM2-mRNA-Variante der Größe 250 bp* (ca.), die in der Gruppe der starken Raucher mit nur 10 % seltener exprimiert wurde (vgl. Tab. 3.3) als in der „Kontrollgruppe 1“ (33 %), in der „Kontrollgruppe 0“ (67 %) bzw. in der Gruppe der Exraucher mit weniger als 20 py (75 %), bezogen auf die Zahl Spleißvarianten-positiver Fälle. Die jeweils geringe absolute Zahl der Gruppengrößen schränkt jedoch die Validität der Aussage ein. In Bezug auf berufsbezogene Karzinogene (vgl. Tab. 3.4) lag in der Regel eine multiple Exposition gegenüber bekannten Karzinogenen vor (Mehrfachnennung), die in der Auswertung ohne direkte Berücksichtigung blieb.

sv	A	B	C	D	E	F	G	H	J	Z	Y	X	W	V
N	9	3	5	5	5	6	2	6	7	7	5	7	5	1
sv +	3	2	1	3	2	5	2	4	3	3	3	6	4	1
sv +	**0.33**	**0.67**	**0.2**	**0.6**	**0.4**	**0.83**	**1.0**	**0.67**	**0.43**	**0.43**	**0.6**	**0.86**	**0.8**	**1.0**
250		0.50							0.33	0.33		0.17	0.25	1.0
300			1.0		0.5	0.20	0.5	0.25			0.67	0.17	0.50	
350	0.33					0.40			0.33					
400						0.20								
500	0.33									0.33		0.17		
700	0.33	0.50		0.33		0.40		0.50	0.33	0.33		0.17		
800			1.0		0.5	0.40	0.5	0.25			0.33	0.17	0.25	
850					0.5	0.20		0.25			0.33	0.33		
950				0.33								0.17	0.25	
1100				0.33										
NR	0	0	2	2	0	2	0	2	0	0	0	1	0	0

Tab. 3.4: Spleißvarianten bei den exponierten HBCA-Patienten in Relation zum jeweiligen Karzinogen.
Alle relativen Angaben beziehen sich auf die Zahl sv-positiver Fälle. **A:** Lacke, Farben, Kunstharze, Klebstoffe; **B:** Kunststoffe; **C:** Landwirtschaft: Herbizide, Insektizide, Düngemittel, Abgase; **D:** Asbest; **E:** Glaswolle; **F:** Steinstaub; **G:** Kohlestaub; **H:** Metalldämpfe; Metallstäube; **J:** Holzstaub; **Z:** chemische Lösungsmittel; **Y:** Petroleum, Öle; **X:** Benzol, Toluol, Benzin, Bitumen (PAH), Teer, Gase; **W:** Druckerschwärze; **V:** Motorabgase. **NR:** Nichtraucher. Durch Mehrfachnennungen ergibt die Summe aus den N der zweiten Tabellenzeile mehr als 54 Fälle. (Ausführliche Tabelle im Anhang als Tab. 6.4.)

Nichtraucher unter den beruflich Exponierten stellten eine Minorität dar (vgl. letzte Zeile der Tab. 3.4). Valide Aussagen bezüglich der Verteilung von MDM2-Spleißvarianten bei beruflich exponierten Nichtrauchern lassen sich somit nicht treffen. Bei teilweise sehr geringen Fallzahlen in den Gruppen der einzelnen Karzinogene besitzen die Daten insgesamt eine eingeschränkte Validität bei deskriptivem Charakter. Spleißvarianten von MDM2 ließen sich tendenziell *seltener* beobachten bei HBCA-Patienten, die regelmäßig berufsbedingt Farben, Lacken, Kunstharzen, Klebstoffen, Herbiziden, Insektiziden, Düngemitteln, Glaswolle, Holzstaub, Abgasen und chemischen Lösungsmitteln ausgesetzt waren (Klassen A, C, E, J, Z; ≤ 0,43; vgl. Tab. 3.4), während sie *häufiger* bei positiver Anamnese für Steinstaub, Druckerschwärze, Benzol, Toluol, Benzin, Bitumen (PAH) und Teer (Klassen F, X, W; ≥ 0,8) vorlagen. *Innerhalb* der Klassen war wegen der kleinen Größe der Klassen *keine Überhäufigkeit bestimmter Spleißvarianten* anzugeben.
In den beiden Urothelkarzinomfällen mit positiver Familienanamnese lagen MDM2-Varianten mit unterschiedlicher Größe (500 bzw. 850 bp [ca.]) vor.

3.3.3 Verteilungsmuster der Spleißvarianten bei Erst- vs. Rezidivtumor in Berücksichtigung der Tumorstadien

Global gesehen wiesen Rezidiv-Urothelkarzinome häufiger MDM2-Spleißvarianten auf als HBCA-Neuerkrankungen (80 % vs. 56,4 %; vgl. Kap. 3.3.1, Abb. 3.4 und Tab. 3.2) und traten häufiger als frühes bzw. „oberflächliches Urothelkarzinom“ (pTaG1, pTa, pT1), bzw. seltener als fortgeschrittenes HBCA auf (Abb. 3.5).

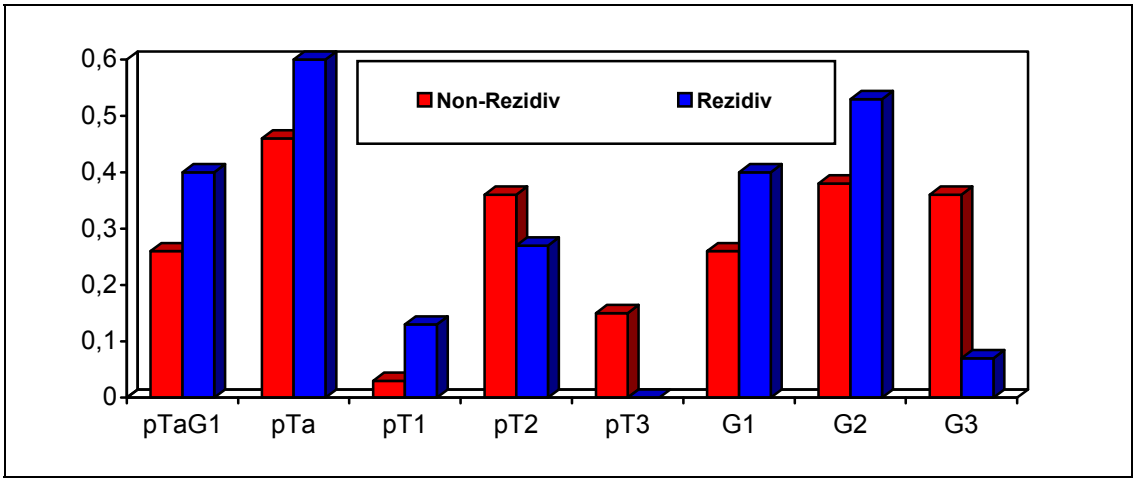

Abb. 3.5: Verteilung der Nicht-Rezidive vs. Rezidive bezüglich Tumorstadium und Differenzierungsgrad.
Berücksichtigt wurde die Entität mit der besten Prognose pTaG1.

In der Subgruppenanalyse (vgl. Abb. 3.6) fiel auf, dass nur bei den Tumoren pTaG1, pTa und pT2 die Rezidive sicher häufiger als die Ersttumoren Spleißvarianten aufwiesen,

während kein Rezidiv im Stadium pT3 vorlag und der singuläre Fall des pT1-Nichtrezidives keine MDM2-Varianten exprimierte.

Somit zeigten Urothelkarzinom-Rezidive häufiger MDM2-Varianten als Neuerkrankungsfälle gleichen Tumorstadiums.

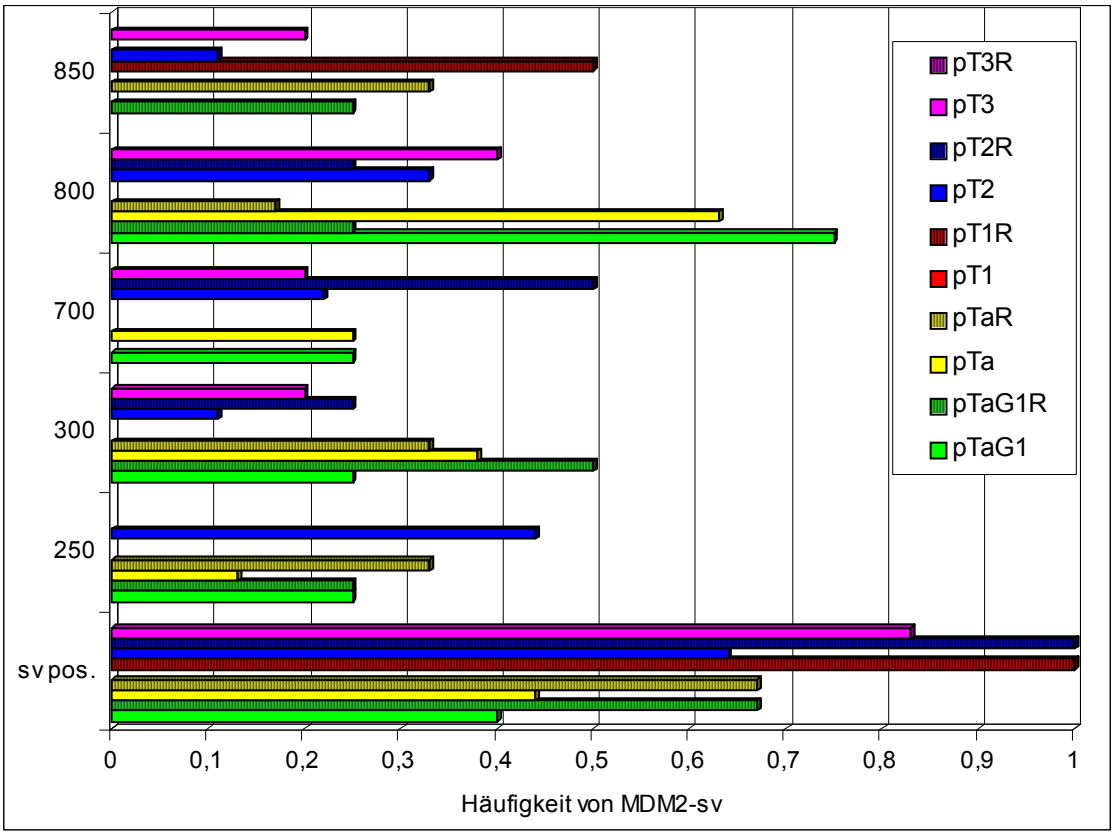

Abb. 3.6: Vorliegen ausgewählter Spleißvarianten nach Tumorstadien der HBCA. Differenzierung erfolgte in Ersttumor vs. Rezidiv (z.B. pTaG1 *vs.* pTaG1R; Daten nach Tab. 3.5) mit Darstellung des Anteils der sv-positiven HBCA.

Darüber hinaus waren Unterschiede im Vorliegen *bestimmter* Spleißvarianten in definierten Tumorstadien bzw. Differenzierungsgraden bei Nichtrezidiven vs. Rezidiven auffällig: Die Spleißvariante der Größe *800 bp* (ca.) lag (wie bereits gezeigt; vgl. Kap. 3.3.1 und Tab. 3.2), deutlich häufiger bei den Nichtrezidivfällen vor (45 % vs. 17 %), und mit höherer Frequenz in differenzierten Karzinomen, wohingegen die Variante der Größe *850 bp* (ca.) ein reziprokes Verteilungsmuster zeigte (25 % bei den Rezidiven vs. 9 % bei den Nichtrezidiven).

Die *MDM2-mRNA-Entität der Größe 700 bp (ca.)* wurde von entdifferenzierten Karzinomen häufiger exprimiert (0,44) als von den G1- und G2-Urothelkarzinomen (0,13; 0,12; vgl. Kap. 3.3.1 und Abb. 3.4). Unabhängig vom Stadium lag sie bei *Erst-Tumoren* gleich verteilt vor, bei Rezidiven war sie zweimal nachweisbar (Stadium pT2 bei gesamt 4 Rezidiven; vgl. Tab. 3.5 und Abb. 3.6).

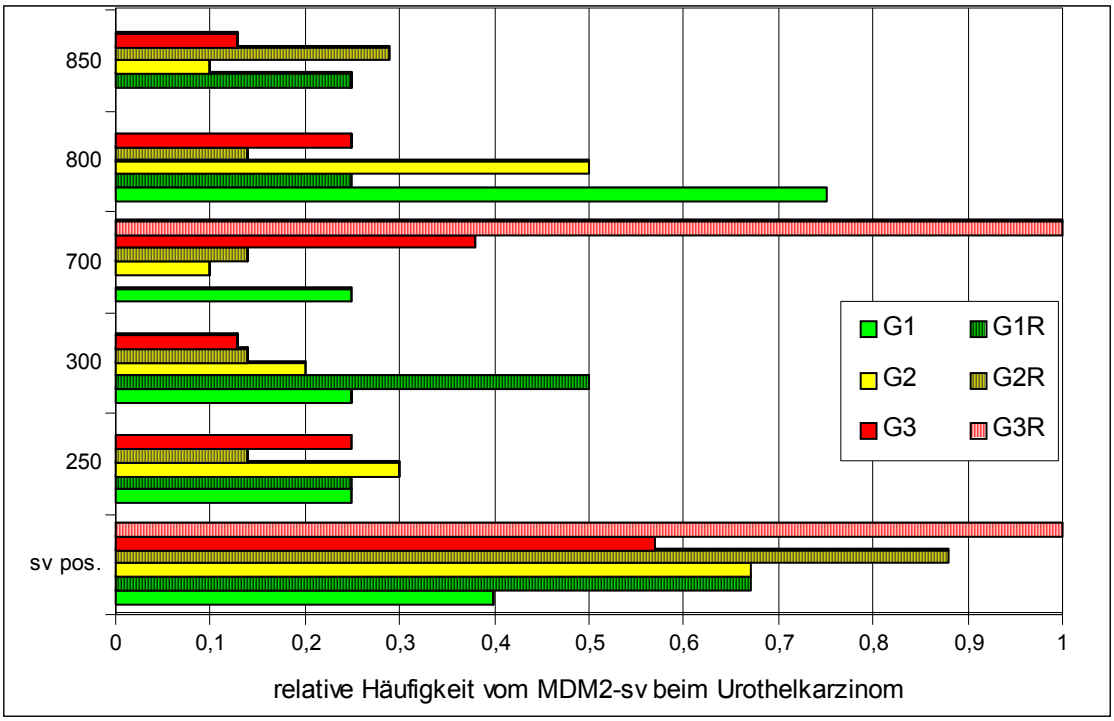

Abb. 3.7: Darstellung selektionierter Spleißvarianten nach Differenzierungsgrad der HBCA. Differenziert wurde in Ersttumor vs. Rezidiv (z.B. G1 vs. G1R; Daten aus Tab. 3.5) mit Zahlen zur Relation der sv-positiven Urothelkarzinome.

Rezidivtumoren wiesen *in allen Differenzierungsgraden* häufiger MDM2-Spleißvarianten auf als HBCA im Neuerkrankungsfall. Darüber hinaus lagen mit Tendenz zur Entdifferenzierung *jeweils häufiger* Spleißvarianten vor (vgl. Abb. 3.7).

	pTaG1	pTaG1R	pTa	pTaR	pT1	pT1R	pT2	pT2R	pT3	pT3R	G1	G1R	G2	G2R	G3	G3R
N	10	6	18	9	1	2	14	4	6	0	10	6	15	8	14	1
sv+	4	4	8	6	0	2	9	4	5	0	4	4	10	7	8	1
sv+	**0.40**	**0.67**	**0.44**	**0.67**		**1.0**	**0.64**	**1.0**	**0.83**		**0.40**	**0.67**	**0.67**	**0.88**	**0.57**	1.0
250	**0.25**	**0.25**	**0.13**	**0.33**			**0.44**				**0.25**	**0.25**	**0.30**	**0.14**	**0.25**	
300	**0.25**	**0.50**	**0.38**	**0.33**			**0.11**	**0.25**	**0.20**		**0.25**	**0.50**	**0.20**	**0.14**	**0.13**	
700	**0.25**		**0.25**				**0.22**	**0.50**	**0.20**		**0.25**		**0.10**	**0.14**	**0.38**	1.0
800	**0.75**	**0.25**	**0.63**	**0.17**			**0.33**	**0.25**	**0.40**		**0.75**	**0.25**	**0.50**	**0.14**	**0.25**	
850		**0.25**		**0.33**		**0.50**	**0.11**		**0.20**			**0.25**	**0.10**	**0.29**	**0.13**	

Tab. 3.5: Spleißvarianten-positive Fälle bei 39 Nichtrezidiven und 15 Rezidiven. Untersucht wurden als Erstmanifestationen (z.B. pTaG1) und als Rezidiv (z.B. pTaG1R) aufgetretene Spleißvarianten-positive Fälle (sv+). Auffällig sind insbesondere die Verteilungen der sv der Größen 700, 800, 850 bp (ca.). Vgl. Abb. 3.6 und 3.7. Relative Angaben beziehen sich auf die Zahl MDM2-sv-positiven Urothelkarzinome (mit Ausnahme der Zeile 3). Die vollständigen Zahlen mit Angaben über die selten exprimierten Varianten finden sich im Anhang in Tab. 6.5.

3.4 Exemplarische *in-situ*-Hybridisierungen von MDM2 am Paraffinmaterial

Für die vorliegende Arbeit wurde mit der Synthese der MDM2-RNA-Sonde ein neuer Versuchsansatz etabliert und somit erstmals MDM2-RNA *in situ* am Urothelkarzinom untersucht. Da das RNase-inaktivierte Gewebe (vgl. Kap. 2.2.1) nicht in ausreichender

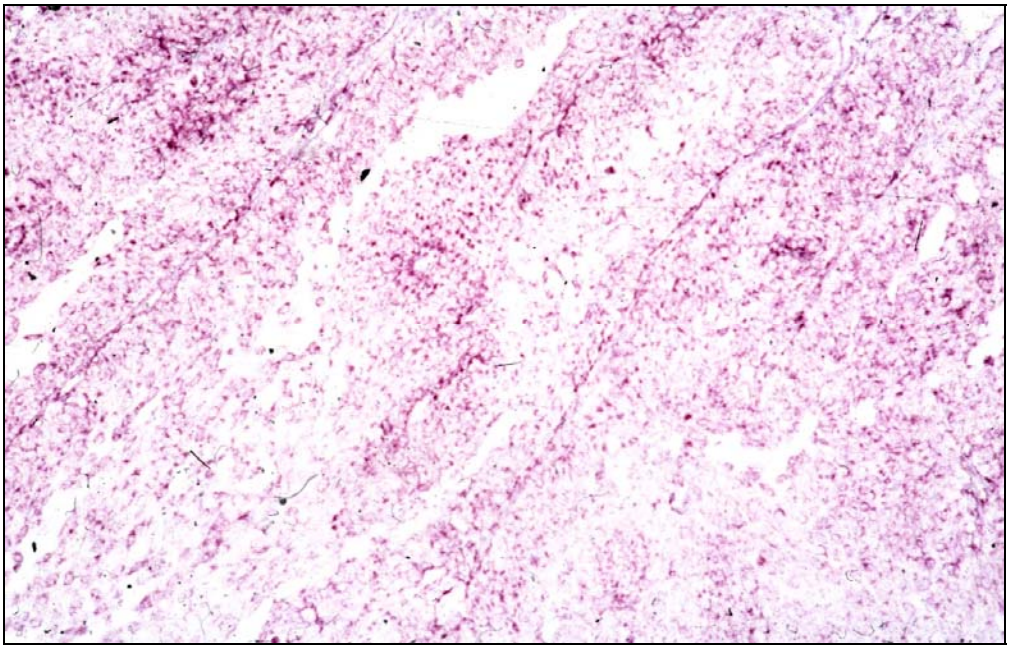

Abb. 3.8: MDM2-ISH-Positivprobe.
Urothel und Stromazellen zeigen ein positives MDM2-Signal.

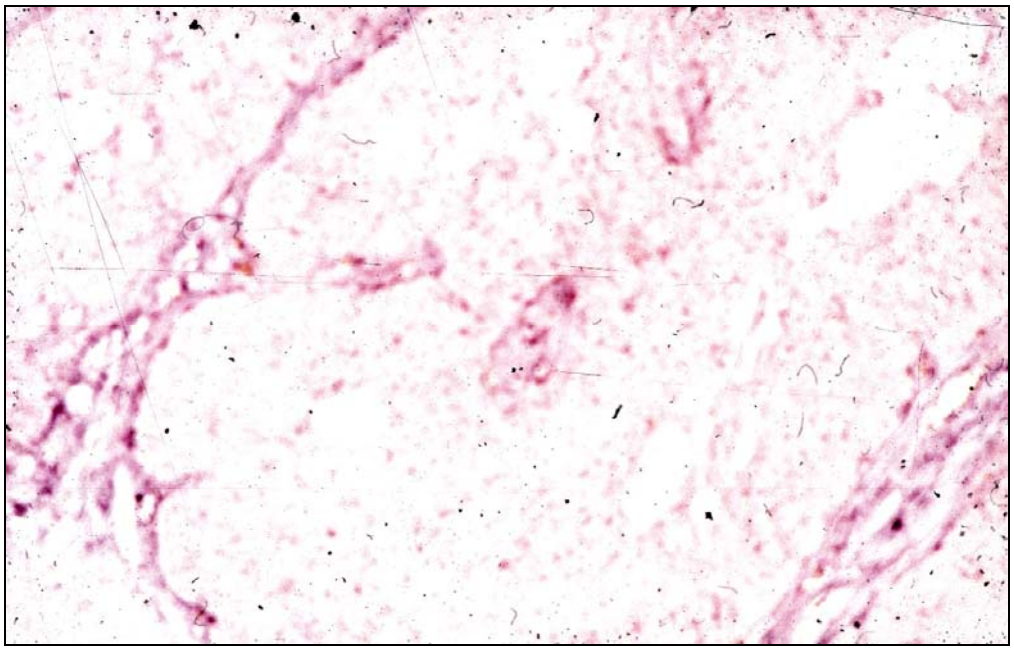

Abb. 3.9: MDM2-ISH-Negativprobe.
Färbe-Reaktion, die zeitgleich zum Abbruch der Indikatorreaktion an der Positivprobe führte.

Menge vorlag, um neben der im Vordergrund der Arbeit stehenden nicht-topologischen RNA-Untersuchung die Expression *in situ* am histologischen Schnitt zu analysieren, wurde auf Paraffinmaterial zurückgegriffen, nicht ohne methodische Grenzen zu erreichen. Daher war lediglich eine exemplarische Untersuchung der MDM2-RNA *in situ* möglich. Durch die Sondensynthese auf Grundlage des alternativen *Primers* liegen Negativproben vor (vgl. Kap. 2.2.5.2 und Abb. 3.9). Diese zeitgleich gefärbten histologischen Schnitte dienten als zeitlicher Indikator für das Ablesen der Positivprobe, da mit beginnender „Entwicklung" der Negativprobe auch die Färbereaktion der Positivprobe abzubrechen war. Die positive Färbung von Urothel und Bindegewebe weist auf die Aktivierung von MDM2 auch in extraurothelialem Gewebe.

3.5 Immunhistochemische Untersuchung von MDM2

Die Daten der immunhistochemischen Analyse von MDM2 werden in Unterpunkten dargestellt nach Tumorstadium, Spleißvariantenstatus und Rezidiveigenschaft und in gleicher Weise im vierten Kapitel diskutiert.

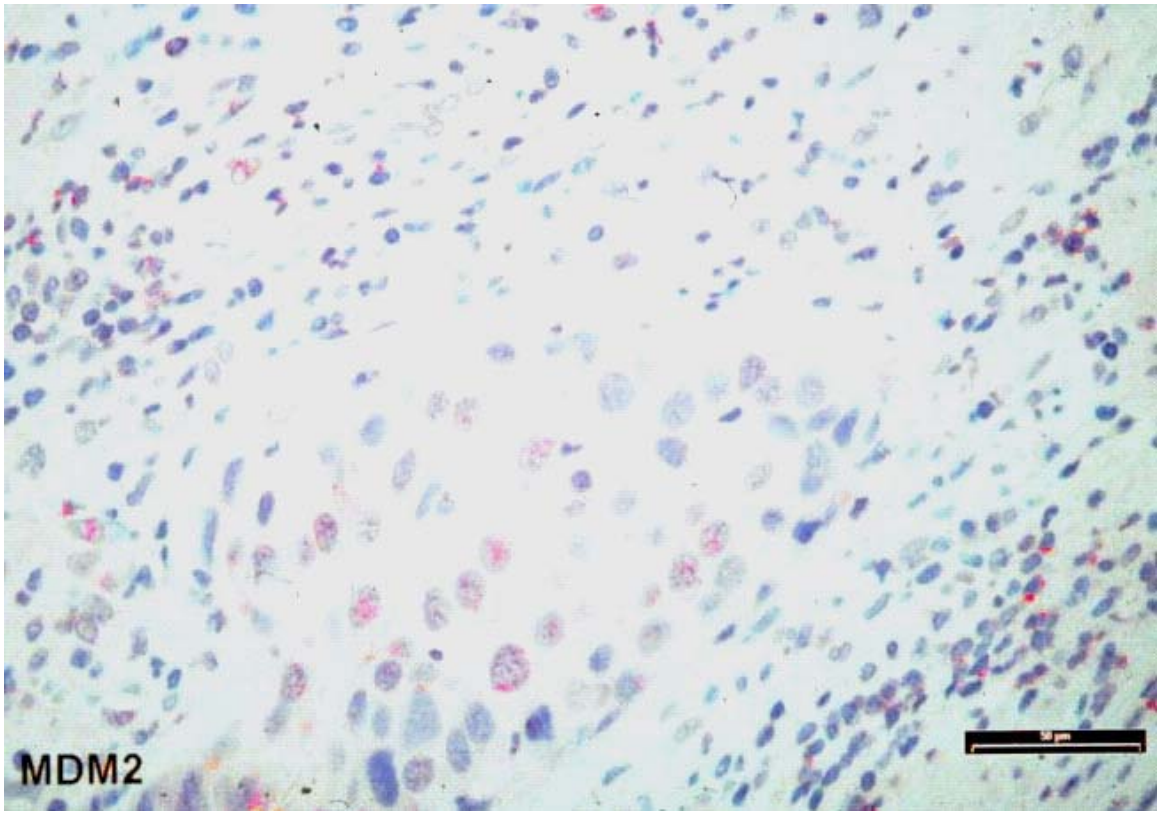

Abb. 3.10: MDM2-Immunhistochemie.
Rötliche Färbung als Indikatorreaktion des vorliegenden MDM2-Proteins. Einzelne Stromazellen exprimieren ebenfalls MDM2.

3.5.1 MDM2-Protein und Tumorstadium / Differenzierungsgrad

Von 54 Urothelkarzinomen zeigten 17 (31,5 %) keine MDM2-Immunoreaktivität, 6 wiesen eine leichte Positivität von 10 - 50 % der Tumorzellen auf (11 %) und 31 Fälle waren hoch immunoreaktiv für das MDM2-Protein (57,4 %; vgl. Abb. 3.10) in der semiquantitativen visuellen Beurteilung. In der Mehrzahl der pTaG1-Tumoren konnte MDM2 nachgewiesen werden (87,5 %), während es über alle Tumoren der Klasse pTa, sowie bei pT2 und pT3 gemittelt seltener vorlag (77,8 %; 50 %; 66,7 % in Abb. 3.11).

Die immunhistochemischen MDM2-Befunde unterschieden sich ebenfalls bezüglich des Differenzierungsgrades der HBCA: *Mit Tendenz zur Entdifferenzierung* waren Urothelkarzinome *seltener positiv* für das MDM2-Protein (vgl. Abb. 3.11).

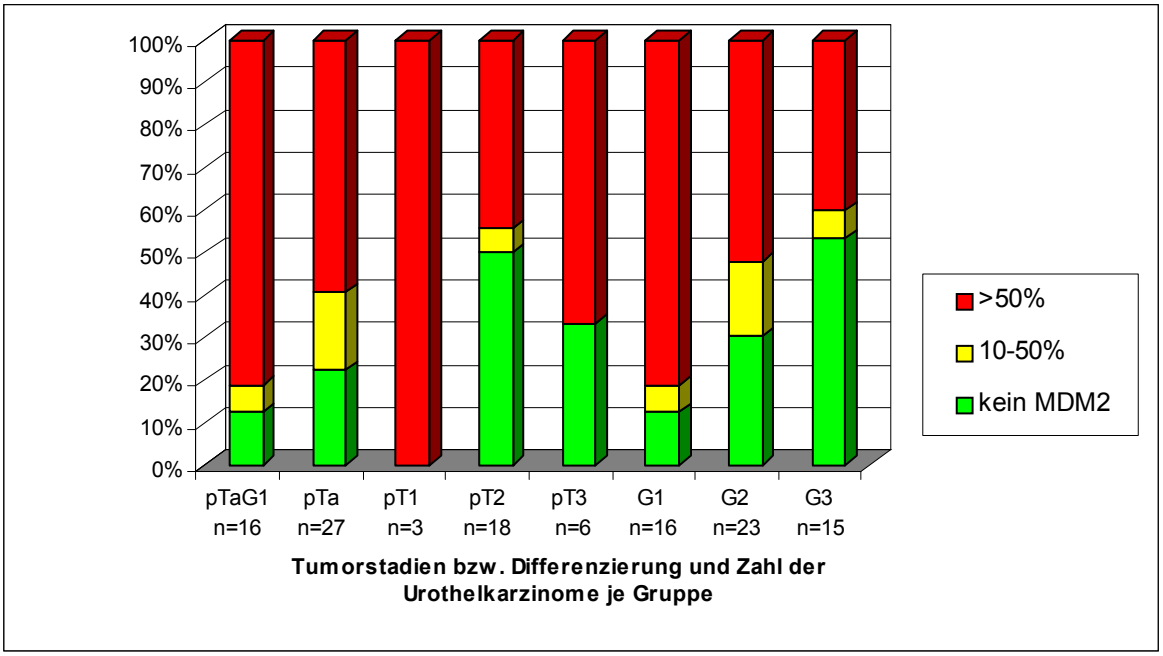

Abb. 3.11: MDM2-Immunoreaktivität nach Ausbreitungs- und Differenzierungsgrad. Entdifferenzierte HBCA weisen seltener MDM2-Protein auf, 88 % / 70 % / 47% bei G1 / G2 / G3; pT1 und pT3 mit auffällig kleinen Gruppengrößen.

3.5.2 MDM2-Protein und MDM2-Spleißvariantenpositivität

Differenzierte und „oberflächliche“ Urothelkarzinome (insbesondere pTaG1) wiesen *unabhängig vom MDM2-Spleißvariantenstatus* gleich häufig eine positive MDM2-Immunoreaktivität auf (vgl. Abb. 3.12 mit gleicher Darstellungsweise [Grundfarben] wie ohne Berücksichtigung des sv-Status in Abb. 3.11).

Bei entdifferenzierten HBCA war das MDM2-Protein deutlich seltener nachweisbar, wobei in der Mehrzahl der Fälle MDM2-Varianten vorlagen. Fortgeschrittene, mäßig differenzierte und entdifferenzierte Urothelkarzinome *mit* MDM2-Spleißvarianten waren seltener MDM2-Protein-positiv (Immunhistochemie, Abb. 3.12) als die Gruppe entsprechender Karzinome *ohne* Spleißvarianten.

In alternativer Darstellung von MDM2-Protein- bzw. MDM2-sv-Positivität zeigt Abb. 3.13 ein hinreichend genaues Bild: Frühe und gut differenzierte Urothelkarzinome (G1, pTa, pT1) wiesen - wie oben beschrieben - unabhängig vom MDM2-Spleißvarianten-Status (positiv vs. negativ) in einem vergleichbar hohen Prozentsatz das MDM2-Protein auf.

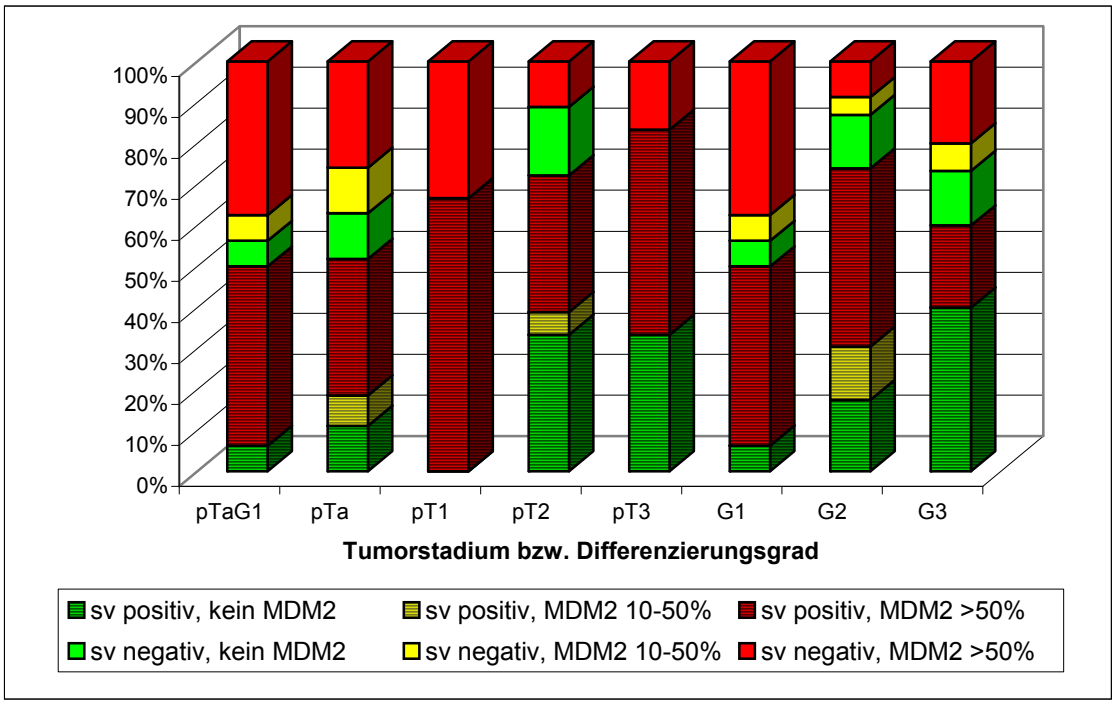

Abb. 3.12: MDM2-Immunoreaktivität nach Progress und MDM2-sv-Positivität. Differenzierung nach MDM2-Spleißvarianten-Positivität. Die fortgeschrittenen und entdifferenzierten HBCA exprimierten häufiger MDM2-sv als bpsw. die pTaG1-HBCA, wie bereits Abb. 3.4 zeigt. Es fällt insbesondere die Verteilung der MDM2-negativen Urothelkarzinome (grüne Balken) auf. (Vgl. Daten in Tab. 6.6 im Anhang).

Mit steigender Invasivität bzw. Entdifferenzierung war abhängig vom Vorhandensein der MDM2-Varianten eine unterschiedliche MDM2-Protein-Quantität nachweisbar (vgl. Tab. 3.6; vereinfacht Abb. 3.13):

	pTaG1	pTa	pT1	pT2	pT3	G1	G2	G3
sv-positive HBCA								
MDM2-IHC pos	0.875	0.786	1.0	0.538	0.6	0.875	0.764	0.333
MDM2-IHC neg	0.125	0.214	0	0.462	0.4	0.125	0.235	0.667
sv-negative HBCA								
MDM2-IHC pos	0.875	0.769	1.0	0.4	1.0	0.875	0.5	0.667
MDM2-IHC neg	0.125	0.231	0	0.6	0	0.125	0.5	0.333

Tab. 3.6: MDM2-sv-positive vs. -negative Urothelkarzinome nach MDM2-Protein-Positivität. Vereinfacht ohne Charakterisierung der MDM2-Varianten. Die absoluten Zahlen für die HBCA-Gruppen pT1 und pT3 (vgl. Tab. 3.1; Tab. 6.7 im Anhang) schränken die Validität ein.

Unter MDM2-Varianten-*positiven* entdifferenzierten HBCA (G3) wies die Mehrzahl *kein MDM2-Protein* auf (0,667; IHC), im Gegensatz zu entsprechenden Urothelkarzinomen *ohne* MDM2-Spleißvarianten, von denen die Majorität MDM2-Protein-*positiv* war (0,667; IHC). Die Expression des MDM2-Proteins bei Urothelkarzinomen korreliert jedoch in Hinsicht auf das Tumorstadium nicht signifikant mit der prognostisch wichtigen Unterscheidung in die Alternativen pTaG1 vs. Nicht-pTaG1 (Fisher-Test p = 0,0469).

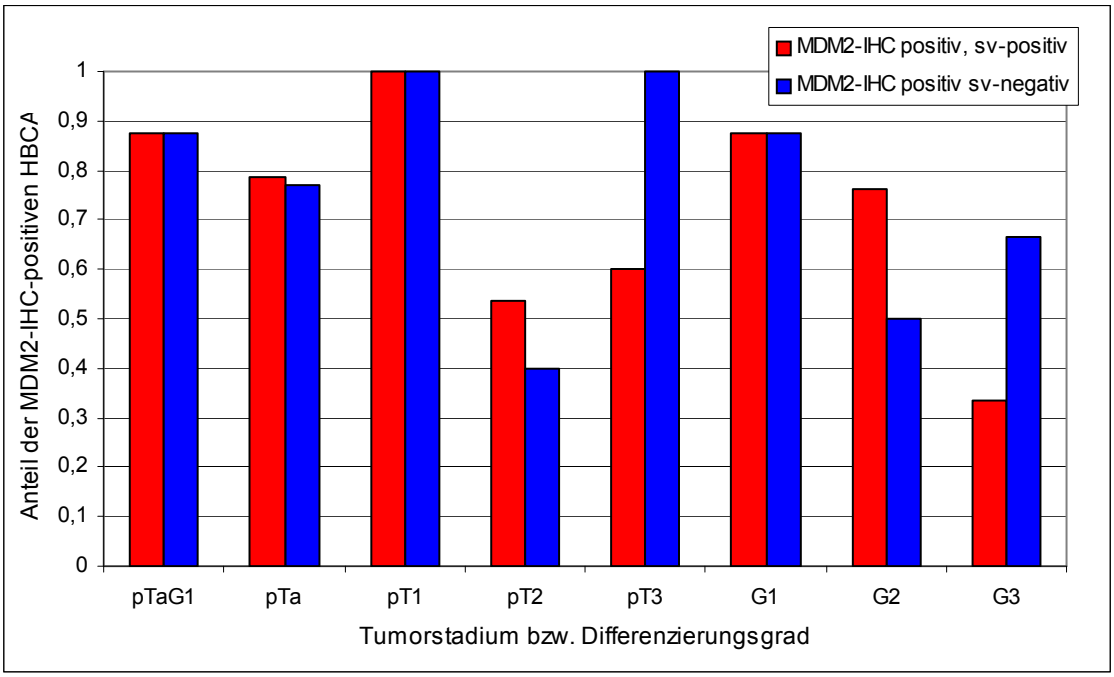

Abb. 3.13: MDM2-immunhistochemisch positive Urothelkarzinome nach Vorliegen vs. Fehlen von MDM2-Spleißvarianten.
Der Anteil der MDM2-IHC-positiven HBCA ist bei frühen bzw. differenzierten HBCA gleich hoch, unabhängig von der Expression von MDM2-Spleißvarianten. Bei entdifferenzierten Urothelkarzinomen (G3) zeigen sich bei Vorhandensein von MDM2-Varianten vs. nicht - unterschiedliche Level des MDM2-Proteins in der immunhistochemischen Analyse: Liegen Varianten vor, war deutlich seltener das MDM2-Protein nachweisbar. Der Gruppe pT3 ohne Spleißvarianten fehlt aufgrund der Gruppengröße N = 1 mit positivem MDM2-Proteinnachweis die Validität, sie fällt jedoch wie auch die Gruppe pT1 (N = 3) mit 100% auf.

3.5.3 MDM2-Protein bei Vorliegen definierter MDM2-Spleißvarianten

Unter dem Konzept, dass einzelne MDM2-Varianten einen Effekt auf den MDM2-Proteinstatus von Urothelkarzinomzellen aufweisen können (Evans et al. 2001), zeigen die Daten der Tabelle 3.7 die MDM2-Protein-positiven vs. -negativen Fälle unter Berücksichtigung der exprimierten MDM2-Spleißvarianten. Global gesehen konnten in der vereinfachten Darstellungsweise der MDM2-Immunopositivität keine Differenzen bezüglich Vorliegen oder Nichtvorliegen von MDM2-Spleißvarianten bei frühen Tumorstadien demonstriert werden (0,647 vs. 0,622 der MDM2-Varianten-positiven Fälle wiesen das MDM2-Protein auf).

Der Blick auf einzelne Spleißvarianten ermöglicht ein differenzierteres Bild: Die MDM2-Varianten 250, 300, 700 und 800 bp (ca.) weisen Häufigkeitsdifferenzen bei negativer vs. positiver MDM2-Immunoreaktivität (oberer vs. unterer Tabellenteil) auf.

	pTaG1	pTa	pT1	pT2	pT3	G1	G2	G3	N	
MDM2-IHC neg										
sv-pos	1	3	0	6	2	1	4	6	11	**0.647**
sv-neg	1	3	0	3	0	1	3	2	6	**0.353**
250	1	1				1			**1**	**0.091**
350		1		1			2		2	0.182
400		1					1		1	0.091
500				2				2	2	0.182
700		1		3	1		1	4	**5**	**0.455**
800				**1**	**1**		**1**	**1**	**2**	**0.182**
850		1		1			1	1	2	0.182
n	2	6		9	2	2	7	8	17	
MDM2-IHC pos										
sv-pos	7	11	2	7	3	7	13	3	23	**0.622**
sv-neg	7	10	1	2	1	7	3	4	14	**0.378**
250	1	2		3		1	3	1	**5**	**0.220**
300	3	4		2	1	3	3	1	7	**0.304**
350		2					2		2	0.087
380				1				1	1	0.044
700	1	1		1		1	1		**2**	**0.087**
800	**4**	**6**		**3**	**1**	**4**	**5**	**1**	**10**	**0.435**
850	1	1	1		1	1	2		3	0.130
950	1	1				1			1	0.044
1000	1	1				1			1	0.044
1100			1		1		2		2	0.087
n	14	21	3	9	4	14	16	7	37	
N	16	27	3	18	6	16	23	15	54	

Tab. 3.7: MDM2-negative und -positive Urothelkarzinome nach MDM2-Spleißvarianten-Positivität und -Varianten sowie Tumorstadium mit Angabe absoluter Zahlen.
Auffällig ist besonders die Verteilung der MDM2-Varianten 250, 300, 700 und 800 bp (ca.). Die Relativ-Zahlen der letzten Spalte beziehen sich auf die Spleißvarianten-positiven Fälle in den beiden alternativen Gruppen der MDM2-IHC-Immunopositivität. Einzelne HBCA wiesen 2 oder 3 MDM2-sv auf, somit entspricht „n gesamt“ nicht der Gesamtzahl der sv. Als Tab. 6.8 im Anhang mit Darstellung der relativen Zahlen im Anhang unter Berücksichtigung ausgesuchter MDM2-sv.

Die häufig exprimierte Variante der Größe 300 bp (ca.) lag ausschließlich bei den MDM2-positiven Urothelkarzinomen (in 30 % der Fälle) vor, die Variante 700 bp (ca.) fand sich dagegen bei 46 % der MDM2-Protein-negativen Fälle vs. bei nur 9 % der MDM2-Protein-positiven Fälle (bzw. 0,455 vs. 0,087). Die Variante der Größe 250 bp (ca.) war häufiger nachweisbar bei den MDM2-positiven Fällen (0,220 vs. 0,091), ein reziprokes Bild fand sich für die Variante der Größe 800 bp (ca.), (0,182 vs. 0,435).

3.5.4 MDM2-Protein bei Erstmanifestation von Urothelkarzinomen bzw. Rezidiven

Rezidiv-Urothelkarzinome wiesen global in höherer Frequenz MDM2-Spleißvarianten auf als HBCA-Neuerkrankungsfälle (vgl. Kap. 3.3.3). Die MDM2-Proteinexpression unterschied sich quantitativ *nicht* bei Rezidiven vs. Nichtrezidiven (unabhängig von der MDM2-Spleißvarianten-Positivität; Fisher-Test p = 0,70; vgl. Anhang Tab. 6.11).

Mit grober Differenzierung (der Daten aus Tab. 6.11 im Anhang) in die Alternativen frühe Urothelkarzinome pTaG1 und HBCA mit schlechterer Prognose (Nicht-pTaG1, sog. Non-pTaG1) zeigten sich jedoch Unterschiede bezüglich der MDM2-Expression (vgl. Tab. 6.12): Während *alle* frühen Ersttumoren *mit*, aber auch *ohne* MDM2-Spleißvarianten MDM2-Protein exprimierten, wiesen fortgeschrittene („Nicht- pTaG1“ bzw. „Non-pTaG1“) HBCA und pTaG1-Rezidive seltener das MDM2-Protein auf, *unabhängig* vom MDM2-Varianten-Status.

Zusammenfassend lag das MDM2-Protein bei Rezidiven und Ersterkrankungen am HBCA numerisch „abhängig“ von Tumorstadium vor, wie bereits ohne diese Differenzierung beschrieben, der MDM2-Spleißvariantenstatus hatte keinen signifikanten Effekt.

4. Diskussion

4.1 Epidemiologische Befunde

Ätiologisch ist das Harnblasenkarzinom gut untersucht.

Die dem standardisierten Interview zugrunde gelegten Items basieren auf großen, teilweise mehrere zehntausend Menschen umfassenden epidemiologischen Studien. Auf eine isolierte Darstellung entsprechender eigener Befunde wurde deshalb verzichtet. Es wurde in der vorliegenden Arbeit vielmehr der Zusammenhang solcher Risikofaktoren bzw. Karzinogene mit molekulargenetischen Alterationen des Onkogens MDM2 am Harnblasenkarzinom analysiert.

4.2 MDM2- Mutations- und Mikrosatellitenanalyse

Dem Onkogen MDM2 kommt im Zellzyklus eine zentrale regulatorische Rolle zu. Es fördert beispielsweise die Ubiquitierung des Tumorsupressorproteins p53, wirkt so auf den Zellzyklus als Promotor und wird wiederum selbst zum Beispiel durch das Tumorsupressor-Protein p14ARF in seiner Funktion limitiert.

Dem analysierten Exon 12, das annähernd die letzen 175 Aminosäuren des MDM2-Proteins und damit v.a. die C-terminal lokalisierte *RING-Finger*-Domäne kodiert, kommt eine wichtige funktionelle Rolle im Protein MDM2 zu. Ein intaktes *RING-Finger*-Motiv ist für die Ubiquitierung von p53 (und dessen Abbau) essentiell (vgl. Kap. 1.5.4). Auch Argentini et al. (2000) beschrieben den Zellzyklus stimulierende und somit onkogene Effekte dieser MDM2-Domäne unabhängig von der p53-Degradation, selbst bei Vorhandensein einzelner Punktmutationen. Der MDM2-*RING-Finger* interagiert darüber hinaus direkt mit der p53-mRNA, eine molekulare Kommunikation, welche die MDM2-E3-Ligaseaktivität reduzieren und die p53-mRNA-Translation verstärken kann (Candeias et al. 2008).

Mit den vorliegenden Daten konnte am Urothelkarzinom lediglich eine sichere heterozygote stumme Mutation am MDM2-Gen (Exon 12) beschrieben werden. Zwei Mikrosatelliteninstabilitäten (bei 2 untersuchten MS) weisen jedoch auf die Existenz weiterer genetischer Alterationen am MDM2-Locus hin. Die Analyse einer größeren Zahl von Mikrosatelliten der gleichen Region ließe erwarten, dass vermehrt genetische Instabilitäten als Indikator von Mutationen detektiert werden könnten.

Die DNA-PCR lag in allen 54 Fällen positiv vor, jedoch gelang nicht an allen HBCA die Sequenzierung. Wie an einem Onkogen zu erwarten, konnten keine Deletionen dieser den Zellzyklus fördernden Domäne beschrieben werden. Relevante Mutationen des Exon 12, welches v.a. die C-terminale *RING-Finger*-Domäne kodiert, waren nicht belegbar.

Evans et al. (2001) konnten im Transfektionsexperiment eine MDM2-Spleißvariante ohne p53-Bindedomäne mit antiproliferativer Funktion nachweisen, die notwendigerweise eine intakte *RING-Finger*-Domäne aufweisen musste.
Andererseits konnte das MDM2-Protein nur mit „*wildtyp*“-*RING-Finger*-Motiv eine die Proliferation hemmende artefizielle MDM2-Form „überspielen“ bzw. antagonisieren und somit wiederum onkogen wirken (Dang et al. 2002).
Wenn also im Einzelfall eine MDM2-Variante vorliegen sollte, die den Zellzyklus (z.B. über die MDM2-Protein-bindende Inaktivierung selbst) inhibieren kann, ist dafür offenbar ein intaktes Exon 12 Voraussetzung, was in allen sequenzierten Urothelkarzinomen der Fall war. Das Vorliegen antiproliferativer MDM2-Varianten in Karzinomen ist jedoch *sui generis* eher unwahrscheinlich, zumindest aber quantitativ und effektiv offenbar unzureichend.
Möglicherweise kommt der Mutation von MDM2 vergleichbar mit MDM2-Genamplifikationen (vgl. Kap. 1.5.5) bei der Tumorgenese des Urothelkarzinoms eine quantitativ untergeordnete Rolle zu, wobei Harano et al. (1999) in mehr als jedem dritten Fall p53-Mutationen nachweisen konnten - mit steigender Frequenz bei entdifferenzierten (G1 5,9 %; G2 32,7 %; G3 53,8 %) und fortgeschrittenen Karzinomen (pTa 16,7 %; pT1 25 %; pT2 40 %; pT3 60 %; pT4 37,5 %). Im Vergleich zu Mutationen am p53-Gen liegt jedoch nur eine geringe Zahl von Arbeiten zum MDM2-Gen am HBCA vor.

4.3 MDM2-Spleißvarianten und MDM2-mRNA (fl) beim Urothelkarzinom

Mit dem Fokus auf den Zusammenhang von Molekularbiologie und Epidemiologie fand für die vorliegende Arbeit keine Sequenzanalyse der Spleißvarianten statt, somit wurden „anormale“ (engl. *aberrant*) nicht von alternativen Varianten differenziert. Varianten gleicher Größe, die wahrscheinlich - jedoch nicht nachgewiesenermaßen - identisch waren, fanden Eingang in die Größenklassen.
In zwei MDM2-Protein- und Exon 12 -positiven Urothelkarzinomen (MDM2-IHC; Sequenzierung ohne Mutationen; jeweils pTaG2) fanden sich kleine MDM2-Spleiß-varianten (250 bzw. 300 bp [ca.]) ohne Nachweisbarkeit der MDM2-mRNA(fl) (mRNA der vollen Länge). Möglicherweise ist die MDM2-Protein-Positivität in diesen beiden Fällen nicht mit Sicherheit gegeben, da nur *ein* Antikörper untersucht worden ist und die *mRNA(fl) negativ* getestet wurde (Wiederholungsversuch).
Das Epitop des MDM2-Antikörpers entspricht den Aminosäuren 154 bis 167 (Protein-Region zwischen N-terminaler p53-Bindedomäne und Kernlokalisationssignal, auf das MDM2-Gen bezogen Exon 7 bzw. 8), das Exon 12 kodiert für die annähernd 175 „letzten“ (C-terminalen) Aminosäuren des MDM2-Proteins und damit v.a. für den

RING-Finger (vgl. Abb. 1.3). Eine Deletion lag, wie oben beschrieben, in keinem Fall vor (Exon 12).

Zu diskutieren sind falsch negative Befunde bezüglich der MDM2-mRNA(fl), beispielsweise durch Beschädigung bzw. Halbwertszeit der mRNA, wobei die Varianten-mRNA intakt war. Wahrscheinlich aber existierten in diesen beiden Urothelkarzinomen translatierte MDM2-Spleißvarianten und *kein MDM2-Protein*. Diese Aussage wurde jedoch nicht über Anwendung weiterer Methoden, wie z. B. *Western-* oder *Northern-Blot* untersucht bzw. verifiziert.

Mit der Etablierung der ISH für MDM2-RNA am Urothelkarzinom konnte eine Methode neu am Urothelkarzinom angewendet werden. Über die Intensitäten der Färbung lassen sich Aussagen zur Verteilung sowie bedingt zur Menge der intrazellulären MDM2-mRNA treffen. Es zeigten sich deutliche quantitative Unterschiede in der Positivität des Urothels und der Zellen des Interstitiums, kongruent zu den Befunden aus der Immunhistochemie. Wahrscheinlich weisen einige interstitielle Zellen bei Urothelkarzinomen einen ebenfalls aktivierten MDM2-Pfad auf.

Das Paraffingewebe kann jedoch nur eingeschränkte Untersuchungsbedingungen bieten.

4.3.1 MDM2-Spleißvarianten in Relation zum Tumorprogress

Fortgeschrittene bzw. entdifferenzierte Urothelkarzinome wiesen (mit 72 bzw. 83 % im Stadium pT2 und pT3 gegenüber 50 % in der Gruppe pTaG1 bzw. 50 % bei G1 vs. 60 % bei G3 und 74 % bei G2) im Vergleich zu „oberflächlichen“ und gut differenzierten HBCA insgesamt etwas *häufiger Spleißvarianten* auf. Bartel et al. (2001) veröffentlichten vergleichbare Daten für Weichteilsarkome, während Sigalas et al. (1996) an Urothelkarzinomen bei weniger differenzierten, invasiv wachsenden vs. „oberflächlichen“ HBCA mit 57 % vs. 6 % *signifikante* Korrelationen zwischen MDM2-Spleißvarianten-Positivität und dem Grad der Malignität beschrieben.

Die Variante MDM2-b (Sigalas et al. 1996) war konform zu dieser Beobachtung bei transgenen Mäusen unabhängig vom p53-Protein in der Lage, Zellwachstum zu beschleunigen und die Apoptose zu hemmen (Steinman et al. 2004). Äquivalente experimentelle Daten über den antiapoptotischen Effekt mehrerer MDM2-Varianten finden sich bei Fridman et al. (2003).

Einzelne HBCA der vorliegenden Analyse exprimierten 2 oder 3 MDM2-Varianten (häufig 300 und 800 bp [ca.]). Eine auffällige Verteilung solcher *MDM2-Spleißvarianten-Paare* auf bestimmte Tumorstadien, Differenzierungsgrade oder Expositionsfaktoren ergab sich jedoch nicht (Daten nicht gezeigt).

Entgegen der Hypothese grundsätzlich Malignom-assoziierter oder Malignom-induzierender MDM2-Varianten (Sigalas et al. 1996) demonstrierten Bartel et al. (2004)

das Vorliegen kurzer MDM2-Spleißvarianten in nicht-malignem Gewebe aus Lunge, Niere und Lymphozyten und postulierten daraus eine physiologische Funktion dieser kurzen MDM2-mRNA.

Auch nicht-malignes, *histologisch unauffälliges Mammagewebe* wies in 4 von 9 Fällen eine alternative (an der exon- / intron-Grenze gespleißte vs. anormale) MDM2-Variante der Größe 653 bp auf (Lukas et al. 2001). Bei Patientinnen, die am Mammakarzinom erkrankt waren, korrelierte das Vorliegen anormaler MDM2-Spleißvarianten mit kürzerem Überleben.

Bei 4 der HBCA-Patienten wurde neben dem Tumorgewebe makroskopisch unverändertes Urothel auf das Vorliegen von Varianten untersucht (Daten nicht gezeigt), hier lagen neben der fl-MDM2-mRNA in 2 Fällen jeweils MDM2-Spleißvarianten der Größe 200 bp (ca.) vor.

Möglicherweise kommt einzelnen MDM2-Varianten eine Rolle in physiologischen, pathologischen, jedoch nicht-malignen, prämalignen oder - gegensätzlich postuliert - „Malignom-präventiven“ Zellzyklus-Reaktionen zu.

So konnten Evans et al. (2001) im Gegensatz zum onkogenen MDM2-Protein für eine MDM2-Spleißvariante mit intakter *RING-Finger*-Domäne ohne p53-Bindedomäne im Transfektionsexperiment eine antiproliferative Funktion nachweisen. Eine Variante dieser Größe (vgl. Evans et al. 2001 und Lukas et al. 2001) fand sich bei den vorliegend untersuchten HBCA erwartungsgemäß jedoch nicht. In der Untersuchung von Evans et al. war diese MDM2-Variante (Aminosäuren 1 - 27 und 300 - 491; entspricht 654 bp) über die Bindung von MDM2-Protein selbst in der Lage, dieses im Zytoplasma zu sequestrieren, so das p53-Protein vor der MDM2-basierten Ubiquitierung zu schützen und über diesen Weg den p53-induzierten Zellzyklusarrest herbeizuführen. Dazu, wie auch für die Aktivierung seiner eigenen Ubiquitierung, benötigt MDM2 eine intakte *RING-Finger*-Domäne (Dang et al. 2002).

Die DNA des Exon 12 wies bei unseren Urothelkarzinompatienten keine relevanten Mutationen auf, somit kann die Integrität des untersuchten *RING-Finger*-Motivs der Urothelkarzinome postuliert werden, was gleichsam für das MDM2-Protein sowie für mögliche MDM2-Varianten mit vorhandenem *RING-Finger*-Motiv gelten sollte.

Während Sigalas et al. (1996) für fortgeschrittene Tumoren eine signifikant häufigere Expression von MDM2-Spleißvarianten beschrieben, boten vorliegende Daten lediglich konforme Tendenzen. Kongruent zu diesen Beobachtungen waren experimentell für einige Varianten transformierende Eigenschaften demonstriert worden (vgl. Kap. 1.5.4).

4.3.2 Vorliegen einzelner MDM2-Spleißvarianten bei Tumorprogress

Den Fokus auf das Vorkommen einzelner MDM2-Varianten (mRNA) in den jeweiligen Tumorstadien gerichtet (vgl. Kap. 3.3.1), exprimierten mit Entdifferenzierung und bei fortgeschrittenen Urothelkarzinomen die Malignomzellen seltener die MDM2-Varianten der Größe 300 und 800 bp (ca.), während die MDM2-Variante der Größe 850 bp (ca.) häufiger bei fortgeschrittenen Urothelkarzinomen und Rezidiven und die Variante der Größe 700 bp (ca.) unabhängig vom Stadium vorlag.

Die Frage nach Effekt oder Korrelation ist in Beobachtungsstudien nicht zu beantworten, jedoch ist denkbar, dass einzelne Spleißvarianten durch deren Existenz oder Fehlen beim Progress von Urothelkarzinomen beteiligt sind.

Die exakte Charakterisierung der MDM2-Spleißvarianten über deren Sequenzierung hätte einen Gewinn für die Validität der Aussagen erbracht, da mehrere Varianten gleicher Größe vorliegen könnten, insbesondere jedoch zur Unterscheidung von Spleißvarianten mit gegensätzlichem Effekt auf den Progress des Zellzyklus oder zur Unterscheidung von alternativen vs. anormalen MDM2-Varianten. Somit sind weitergehende Aussagen wegen der fehlenden definitiven Charakterisierung der Varianten nicht zu treffen, auch bestand eine andere Zielsetzung dieser Untersuchung.

4.3.3 Vorliegen von MDM2-Spleißvarianten: Relation zur Exposition

Die Häufigkeit des Vorliegens von MDM2-Spleißvarianten *insgesamt* unterschied sich beim Urothelkarzinom *nicht* relevant in Relation zur kumulativen Nikotinexposition (*py*) und zum Geschlecht der Patienten. Die *MDM2-mRNA-Variante der Größe 250 bp* (ca.) - die in der Gruppe der Raucher mit hohem Konsum mit 10 % der Fälle seltener exprimiert wurde (vgl. Tab. 3.3) als in der „Kontrollgruppe 1“ (33 %), in der „Kontrollgruppe 0“ (67 %) bzw. in der Gruppe der Raucher mit weniger als 20 py (75 %) - bildete eine Ausnahme, wobei die geringe Anzahl des absoluten Auftretens (6 Fälle von 34 MDM2-Varianten-positiven Fällen unter 54 HBCA) diese Aussage relativiert.

Auch mit Sicht auf Konsumdauer sowie mittlere tägliche Nikotinmenge mit den alternativen Gruppen Raucher und Exraucher konnte keine Korrelation zum Vorliegen von MDM2-Varianten global, wie auch zur Expression bestimmter Varianten aufgezeigt werden (vgl. Daten im Anhang als Tab. 6.9 und 6.10).

Weng et al. (2005) fanden gegenteilige Befunde für das Nichtkleinzellige Lungenkarzinom (NSCLC): Zwischen dem Vorliegen von MDM2-Spleißvarianten und dem Geschlecht (36 % vs. 9,5 %; Männer vs. Frauen) bzw. dem Rauchverhalten (44 % vs. 16 %; Raucher vs. Nichtraucher) ließen sich jeweils signifikante Differenzen demonstrieren. Jedoch lagen bei NSCLC in nur 26,5 % MDM2-Varianten vor sowie in nur jedem zweiten Kasus die

MDM2-mRNA der vollen Länge, was ebenfalls im Vergleich mit Urothelkarzinomen auf eine andere Biologie verweist.

Bezüglich der berufsassoziierten Risikofaktoren (vgl. Kap. 3.3.2) lag in der globalen Analyse eine auffällige Auftretenshäufung von Varianten in bestimmten Expositionsgruppen vor (positiv vs. negativ). MDM2-Spleißvarianten waren insgesamt *seltener* (≤ 0,43) bei HBCA-Patienten zu beobachten, die regelmäßig berufsbedingt Farben, Lacken, Kunstharzen, Klebstoffen, Herbiziden, Insektiziden, Düngemitteln, Glaswolle, Holzstaub, chemischen Lösungsmitteln und Abgasen ausgesetzt waren (vgl. Tab. 3.4), während sie *häufiger* (≥ 0,8) bei positiver Anamnese für Steinstaub, Druckerschwärze, Benzol, Toluol, Benzin, Bitumen (PAH) und Teer vorlagen.

Die Subgruppenanalyse der einzelnen MDM2-Spleißvarianten (Tab. 3.4) ließ aufgrund der kleinen Gruppengröße keine weiteren Aussagen zu. Das Faktum, dass 60 % der Urothelkarzinome der Kontrollgruppen (ohne Kontakt zu Karzinogenen) ebenfalls MDM2-Varianten exprimierten, relativiert die o.g. Zuordnung zu zwei Gruppen, spricht aber *nicht* gegen einen Zusammenhang zwischen Karzinogen-Exposition und der Expression von Spleißvarianten, da das Vorliegen definierter Umweltfaktoren positiv oder negativ mit dem Auftreten von Spleißvarianten assoziiert sein kann.

Das Agens Doxorubicin (Chemotherapeutikum) induziert beispielsweise die Expression einer „anormalen“ MDM2-Spleißvariante ohne C-terminalen *RING-Finger* und ohne E3-Ubiquitin-Ligase-Aktivität (108 bp, Intronsequenz; Lents et al. 2008). In der Folge stieg die Konzentration des p53-Proteins an, wobei möglicherweise die Doxorubicin induzierte Variante involviert war.

Der Effekt der MDM2-Spleißvarianten bei der allgemein postuliert meist Jahrzehnte dauernden Karzinogenese bei Vorliegen chemischer oder radiogener Onkogene lässt jedoch nicht zwingend die Analogie mit chemotherapeutisch eingesetzten Agenzien zu. Andererseits veröffentlichten Weng et al. (2005) experimentelle Daten, die die Expression dreier MDM2-Spleißvarianten nach *in-vitro*-Exposition einer Lungenkarzinom-Zelllinie (H1355-Zellen) mit im Tabak enthaltenen Karzinogenen demonstrierten, die kongruent zu den Daten von Lents et al. (2008) für einen auch zeitlich unmittelbaren Effekt von toxischen Agenzien auf die Expression von MDM2-Spleißvarianten sprechen, der durch vorliegende Daten mit einer lebenslangen Expositionsanamnese jedoch global durch Fehlen einer Korrelation nicht sicher unterstützt werden kann, selbst wenn die Daten *für* einen Effekt sprechen.

Nach experimenteller Applikation von UV-Licht am Mausmodell konnten ebenfalls MDM2-Varianten induziert werden (Chandler et al. 2006), was gleichsam auf eine Rolle von MDM2-Isoformen in Reaktion auf eine Störung der DNA-Integrität und möglicherweise so vermittelten Reparaturmechanismen deuten könnte.

Der Dynamik intrazellulärer Prozesse allgemein bzw. speziell der Expression von MDM2-Varianten wird zukünftig auch in Hinblick auf die Halbwertszeit von RNA und Proteinen noch vermehrt wissenschaftliche Aufmerksamkeit zukommen.
Es ergeben sich also Hinweise darauf, dass einzelne Risikofaktoren die Expression von MDM2-Spleißvarianten unterstützen oder hemmen (z.B. bei Rauchern mit hohem Nikotinkonsum MDM2-Variante der Größe 250 bp [ca.]). Für definitive Aussagen über den Einfluss einzelner Varianten ist die untersuchte Kohorte der vorliegenden Beobachtungsstudie zu klein.
Darüber hinaus unterliegen allgemein akzeptiert verschiedene Tumoren derselben Entität unterschiedlichen Wegen der Karzinogenese, wobei wahrscheinlich in einigen Fällen MDM2-Varianten eine entscheidende Rolle zukommt oder sie kausal involviert sind.
Letztlich kann die Frage des Zusammenhanges von Umweltfaktoren und Vorliegen bestimmter MDM2-Varianten nur durch große Untersuchungszahlen, am Tiermodell (z.B. Chandler et al. 2006) oder an Zelllinien (z.B. Weng et al. 2005) bestätigt werden, mit verbleibendem Zweifel der Übertragbarkeit tierexperimenteller Daten oder von *in-vitro*-Befunden auf die humane Karzinogenese.

4.3.4 MDM2-Spleißvarianten bei Erst- vs. Rezidivtumoren

Patienten mit HBCA-Rezidiv wiesen, vereinbar mit den Daten aus der Literatur, häufiger frühe Tumorstadien auf (40 % pTaG1 bzw. 60 % pTa im Vergleich mit 26 % bzw. 46 % bei Neuerkrankungen; vgl. Abb. 3.5). Urothelkarzinom-Rezidive zeigten in allen Tumorstadien und Differenzierungsgraden jeweils häufiger MDM2-Varianten als die Neuerkrankungen. Mit Tendenz zur Entdifferenzierung exprimierten Erst- und Rezidivtumoren jeweils häufiger MDM2-Spleißvarianten.
Der einzelne Kasus eines Rezidives während der laufenden Studie wies kongruent zu diesen Daten zum Zeitpunkt der Ersterkrankung (pT2aG3) noch keine MDM2-Spleißvarianten auf, exprimierte sie jedoch im Rezidiv (2 Varianten, Größe 800 und 300 bp [ca.]; pT2aG2).
Insbesondere die MDM2-mRNA-Varianten der Größen 800 und 850 bp (ca.) unterschieden sich in ihrer Auftretenshäufigkeit bei Erst- vs. Rezidiv-Urothelkarzinomen. Während die MDM2-Variante der *Größe 800 bp* (ca.) sich global insbesondere in den Erst-Urothelkarzinomen (45 vs. 17 %) fand, wurde die Variante *850 bp* (ca.) mit höherer Frequenz in Rezidiven exprimiert (25 vs. 9 %). Die weiteren häufig beobachteten MDM2-Varianten 250 und 300 bp (ca.) unterschieden sich nicht in ihrer Auftretensfrequenz über verschiedene Tumorstadien oder Differenzierungsgrade.
Einzelne Spleißvarianten könnten somit einen Effekt auf das Rezidiv-Verhalten sowie auf die Entdifferenzierung von HB-Malignomen besitzen.

Daten anderer Arbeitsgruppen zur Frage der MDM2-Varianten bei Rezidiven von Urothelkarzinomen fanden sich in der aktuellen Literatur nicht.

4.4 Immunhistochemische Daten von MDM2

In Hinblick auf die physiologisch kurze Halbwertszeit von MDM2 (ca. 20 Minuten) ist für dieses zentral regulative Protein im nicht-malignen Gewebe eine gute Regulation zu postulieren (vgl. Kap. 1.5.1). Üblicherweise ist das MDM2-Protein entsprechend im Nucleolus lokalisiert (Chen J et al. 1995).

In der Beurteilung der Prognose des Patienten behält das histopathologische Staging unverändert den höchsten Stellenwert, auch wenn beispielsweise die Koexpression (Immunhistochemie) von p53 und MDM2 nützliche prognostische Hinweise bei fortgeschrittenen Urothelkarzinomen (pT2 - pT4, Uchida et al. 2002) aber auch über die Tendenz früher Stadien, ein Rezidiv zu entwickeln, geben kann (Tuna et al. 2003).

Jahnson et Karlsson (2000) fanden bei zystektomierten Patienten und somit bei fortgeschrittenen Urothelkarzinomen an teilweise sehr altem Analysematerial (Zystektomie zwischen 1967 and 1992) nur bei 9 % der Patienten eine positive MDM2-Immunoreaktivität trotz eines Levels von nur 10 % der Karzinomzellen, ab dem ein Befund als positiv gewertet wurde.

Vorliegende Daten zeigten die MDM2-Proteinpositivität in der höchsten Frequenz bei *gut differenzierten Urothelkarzinomen* mit deutlich fallender Tendenz bei Fortschreiten von Invasivität und Entdifferenzierung: Während von 54 Urothelkarzinomen 17 *keine* MDM2-Immunoreaktivität aufwiesen (31, 5 %), war das MDM2-Protein in 37 Fällen nachweisbar (68,5 %). In der Mehrzahl der pTaG1-Tumoren fand sich MDM2 (87,5 %), während es gemittelt über alle pTa-Tumoren, sowie bei pT2 und pT3 seltener vorlag (77,8 %; 50 %; 66,7 %), Ergebnisse, die tendenziell kongruent der Untersuchung von Jahnson et Karlsson (2000) sind, jedoch numerisch stark abweichen.

Auch in Bezug auf den Differenzierungsgrad unterschieden sich die MDM2-Befunde. Mit Entdifferenzierung waren die Urothelkarzinome seltener positiv in der immunhistochemischen Analyse. Aus früheren immunhistochemischen Studien am Urothelkarzinom liegen heterogene Daten für die Korrelation der MDM2-Immunoreaktivität in Bezug auf Tumorprogress und Differenzierungsgrad vor (vgl. Kap. 1.5.5).

Mit steigender p53-Mutationsfrequenz (Harano et al. 1999) bei Entdifferenzierung und Fortschreiten der Invasivität von HBCA verliert die Akkumulation von MDM2-Protein möglicherweise an Bedeutung, da mit Mutation des zentralen Regulators p53 ein hohes Level von MDM2-Protein oder dessen Mutation wahrscheinlich keine Rolle mehr zukommen muss bzw. die Karzinogenese *a priori* alternativen Mechanismen unterliegt.

4.4.1 Immunhistochemischer MDM2-Nachweis in Relation zu Tumorprogress und MDM2-sv-Positivität

Die MDM2-Immunoreaktivität unterschied sich *global* sowohl bei Rezidiven als auch bei erstmals manifestierten Urothelkarzinomen *nicht* in Abhängigkeit von der MDM2-Spleißvarianten-Positivität.

Mit Blick auf den Tumorprogress exprimierten jedoch nur frühe und gut differenzierte Urothelkarzinome *unabhängig* vom MDM2-Spleißvariantenstatus allgemein (positiv vs. negativ) auf äquivalent hohem Level das MDM2-Protein. Mit voranschreitender Invasivität und Entdifferenzierung war in „numerischer Abhängigkeit“ vom Vorliegen von MDM2-Varianten (vs. Fehlen) eine unterschiedliche MDM2-Protein-Positivität zu beobachten:

In fortgeschrittenen Urothelkarzinomen (mit Vernachlässigung der kleinen Gruppen pT1 und pT3 wegen kleiner Gruppengröße) war das MDM2-Protein deutlich *seltener* nachweisbar, wenn MDM2-Spleißvarianten (mRNA) vorlagen, im Gegensatz zu HBCA ohne MDM2-Varianten mit Ausnahme der entdifferenzierten HBCA.

Einzelne MDM2-Varianten haben möglicherweise direkt oder vermittelt einen Effekt auf das Vorhandensein des intrazellulären MDM2-Proteins am fortgeschrittenen Urothelkarzinom (vgl. Evans et al. 2001). 54 % der Varianten-positiven „Nicht-pTaG1“-HBCA (pT2) exprimierten MDM2-Protein im Vergleich zu 40 % der pT2-Urothelkarzinome ohne MDM2-Varianten, keine Differenzen fanden sich bei den pTa-Karzinomen (vgl. Abb. 3.13 und Tab. 3.6).

4.4.2 Immunhistochemischer MDM2-Nachweis in Relation zu einzelnen MDM2-sv

Unter Berücksichtigung einzelner MDM2-Spleißvarianten im Gegensatz zur alternativen MDM2-Varianten-Positivität zeigte sich ein differenziertes Bild. Die relativ häufig exprimierte Variante der Größe 300 bp (ca.) war ausschließlich bei MDM2-Protein-positiven Urothelkarzinomen und hier in quasi jedem dritten Kasus (0,304 entspricht 7 von 23 Spleißvarianten-positiven Fällen) nachweisbar und verteilte sich etwa äquivalent auf Tumorstadien und Differenzierungsgrade (vgl. Tab. 3.7). Das Fehlen dieser Variante bei MDM2-Protein-negativen Fällen könnte auf eine direkte oder vermittelte Interaktion von MDM2-Protein und Spleißvariante deuten.

Auch die Varianten der Größen 250, 700 und 800 bp (ca.) waren bezüglich der MDM2-Proteinpositivität unterschiedlich verteilt (vgl. Tab. 3.7, ohne Berücksichtigung des Tumorstadiums), jedoch nicht mit einer mit der Variante 300 bp (ca.) vergleichbaren Eindrücklichkeit.

Die Variante der Größe 700 bp (ca.) lag gehäuft bei den MDM2-Protein-negativen fortgeschrittenen HBCA vor (0,455 vs. 0,087 der MDM2-Spleißvarianten-positiven Fälle) ohne Bevorzugung von Tumorstadien. Bei Nicht-Berücksichtigung der MDM2-Positivität war diese Variante jedoch über die Stadien und Differenzierungsgrade etwa gleich verteilt. Unter den MDM2-Protein-positiven Urothelkarzinomen war die ca. 800 bp große MDM2-Variante häufiger nachweisbar als bei Fehlen des MDM2-Proteins in der immunhistochemischen Analyse (0,435 vs. 0,182 bezogen auf die MDM2-Spleißvarianten-positiven HBCA), dabei zeigten sich nur Tendenzen der gehäuften Expression bei differenzierten „oberflächlichen" Tumoren. Ohne den Fokus des simultanen Vorliegens von MDM2-Protein und MDM2-Spleißvariante bzw. des Rezidivstatus ließ sich war die MDM2-sv der Größe 800 bp (ca.) höchste Auftretenshäufigkeit bei differenzierten und nicht fortgeschrittenen Urothelkarzinomen (vgl. Abb. 3.6 und 3.7).

Diese Aussagen lassen sich mit Daten von Evans et al. (2001, vgl. Kap. 4.3.1) vereinbaren, die zeigen konnten, dass zumindest *eine* definierte Variante in der Lage war, MDM2 zu binden, so im Zytoplasma zu sequestrieren, und somit das p53-Protein vor der MDM2-induzierten Ubiquitierung, also dessen Inaktivierung schützten, während andere MDM2-Varianten ohne Effekt auf das MDM2-Protein blieben. Es bleibt anzumerken, dass das MDM2-Protein jedoch bei Evans et al. (2001) nachweisbar war, wenn auch zytoplasmatisch und nicht nukleär. Außerdem handelte es sich in der erwähnten Experimentalstudie um gerade eine anti-onkogene Variante im inhaltlichen Gegensatz den analysierten Malignomen der ableitenden Harnwege.

Zusammengefasst sind einzelne Spleißvarianten von MDM2 wahrscheinlich in der Lage, die intrazelluläre MDM2-Protein-Konzentration zu beeinflussen und auf diesem Wege den Zellzyklus zu regulieren.

4.5 Diskussion der Datengrundlage

Die Patienten wurden während stationärer Behandlungen in den Urologischen Kliniken der Universität Göttingen, des Evangelischen Krankenhauses Göttingen Weende und des Albert-Schweitzer-Krankenhauses Northeim, somit aus dem südlichen Gebiet des Bundeslandes Niedersachsen der Bundesrepublik Deutschland über einen Zeitraum von 20 Monaten - beginnend im Sommer 2000 - akquiriert, die epidemiologischen Daten in einem Fragebogen-standardisierten Gespräch erfasst und biologische Gewebe in konstanter Weise gewonnen und konserviert.

Die Kategorie pT4 fehlt in der vorliegenden Differenzierung, da von 54 Fällen nur 2 Zystektomiepräparate (jeweils pT3) existierten. Darüber hinaus besteht die Indikation zur

radikalen Zystektomie nach aktuellem Stand nur in Fällen von pTis, rezidivierender pT1G2 und lokal semikonservativ (TUR-B) nicht adäquat behandelbarer pT1G3 (Dorp et al 2007). Der prognoserelevante Lymphknotenstatus (vgl. Kap. 1.2.2), der entsprechend der klinischen Expertise und an zervikalen Lymphknoten bestätigt (Eichhorn et al. 1987) bildgebend nicht hinreichend valide erfasst werden kann, fand keinen Eingang in die Auswertung, da eine Lymphknotenvergrößerung nicht *sui generis* auf eine maligne Beteiligung bzw. Metastasierung schließen lassen darf und darüber hinaus bei nur 2 Urothelkarzinompatienten der pN-Status bestimmt wurde (radikale Zystektomie).

4.5.1 Datenauswertung und statistisches Niveau

Zum Zeitpunkt der Planung von Versuchsansatz und Methodenauswahl stand ein vereinfachtes Konzept zur Diskussion: Die Expression alternativer MDM2-Spleißvarianten (positiv vs. negativ) korreliert bei humanen Harnblasen-, Ovarial- und Mammakarzinomen sowie bei Astrozytomen mit dem Grad der Malignität, unabhängig vom p53-Status (Sigalas et al. 1996, Matsumoto et al. 1998, Hori et al. 2000), Einige MDM2-Isoformen wiesen kongruent zu diesem Postulat selbst transformierendes Potential auf (Sigalas et al. 1996, Fridman et al. 2003, Dang et al. 2002, Steinman et al. 2004).

In der Folge konnte eine MDM2-Variante beschrieben werden, die den Progress des Zellzyklus inhibieren - und über „Abbinden“ des MDM2-Proteins selbst (Evans et al. 2001) p53 in seiner den Zellzyklus inhibierenden Funktion aktiv werden lassen kann. Unter diesen Aspekten und bei über die Größe der Varianten hinausgehend fehlender weiterer Zuordnung (z.B. Sequenzierung) wurde die absolute Mehrzahl der Daten lediglich deskriptiv bewertet und auf eine statistische Auswertung auch in Hinblick auf die Fallzahl in den Untergruppen verzichtet.

Weiterhin ist das Vorliegen von MDM2-Varianten an der Gesamtzahl der HBCA sowie an der Zahl der MDM2-Spleißvarianten-positiven Urothelkarzinome relativiert worden, basierend auf der Annahme, dass MDM2-Varianten einen Effekt auf den Progress des Zellzyklus (positiv oder negativ) aufweisen können, während in MDM2-Varianten-negativen Fällen wahrscheinlich andere molekularpathologische Signalwege an der Tumorgenese vordergründig kausal beteiligt sind.

4.5.2 Ausschlussgründe

Von 123 Fällen kamen 54 Fälle zur vorliegenden Auswertung, die Gründe und deren Verteilung für diese Differenz waren bereits in Kapitel 2.1.1 angegeben worden. Die Fälle eines Plattenkarzinoms bzw. eines kleinzellig-anaplastischen Karzinoms der Harnblase wurden basierend auf dem Postulat einer andersartigen Tumorbiologie nicht in die folgenden Analysen einbezogen.

4.5.3 Diskussion der histopathologischen Datengrundlage

Vorteilhaft für die Vergleichbarkeit (Reliabilität, Reproduzierbarkeit und Validität) der Ergebnisse war die Beurteilung sämtlicher Fälle bezüglich Differenzierungsgrad, Tumorstadium und MDM2-Immunhistochemie durch *einen* Pathologen.

Um der Biologie der Urothelkarzinome in der histopathologischen Befundung noch besser zu entsprechen, veröffentlichte und empfahl die WHO 2004 eine neue Klassifikation (Sauter et al. 2004), die jedoch in der vorliegenden Arbeit noch keine Anwendung finden konnte.

Entsprechend der neuen WHO-Klassifikation werden nicht-invasive von invasiven Urothelkarzinomen unterschieden. Neben der Etablierung der papillären Neoplasie niedrig malignen Potenzials (vgl. Kap. 1.2.2) ersetzte die WHO-Definition die Einteilung in drei Grade der Differenzierung durch nur zwei Entitäten und beschränkte sie auf das nicht-invasive Urothelkarzinom (neu: *low grade* vs. *high grade* nach Erhaltensein der Textur in den papillären Formationen in der Übersichtsvergrößerung). Die PUNLMP ähneln histopathologisch den urothelialen Papillomen, weisen jedoch eine erhöhte Proliferation und eine breitere Urothelschicht auf. In der herkömmlichen Klassifikation wurden diese Tumoren unter die hochdifferenzierten papillären Urothelkarzinome Grad I subsumiert. Sie haben aber eine gute Prognose, stehen von der Dignität her noch vor dem *Carcinoma in situ* und entsprechen damit formal noch nicht einem Karzinom.

Unabhängig von der aktuellen Gültigkeit der alten WHO-Klassifikation (Karl et al. 2008) könnten die Analysedaten des Ergebnisteils auf die neue WHO-Klassifikation angewandt - sicher noch differenziertere Gesichtspunkte ergeben, da beispielsweise die Kategorie pTaG1 doch relativ inhomogen in Hinblick auf die neue WHO-Einteilung ist.

Weiterhin fanden in der routinemäßigen histopathologischen Auswertung der maximale Tumordurchmesser (prognostisch relevante Unterscheidung von größer oder kleiner 3cm, besonders bei pT2, [Cheng et al. 1999]), sowie die exakte Aussage über Rezidiv vs. Progress *keine* Berücksichtigung - Daten, die weitere wertvolle Aussagen ermöglichen. Die Befunde aus dem „*substaging*“ gingen wegen geringer Fallzahlen nicht in die Auswertung ein, beinhalten jedoch weitere Informationen, da beispielsweise für pT1 abhängig von der Invasionstiefe die biologische Relevanz dieser Daten mit primären Endpunkten (5-Jahres-progressionsfreies Überleben; 5-Jahres-Überlebensrate; [Hasui et al. 1994; Angulo et al. 1995]) eindrücklich belegt werden konnte.

Letztlich und auch im Hinblick auf die weiter zu spezifizierende Differentialdiagnostik und -Therapie sowie Leitlinienorientierung in der Medizin sind künftig Experimentalansätze anzustreben, die primäre Endpunkte (z.B. 5-Jahresüberlebensrate) und genetische Daten stärker in Relation und in den Fokus der Aufmerksamkeit setzen.

Diese Möglichkeit wurde im Rahmen dieser Arbeit noch nicht realisiert, wird jedoch zukünftig ein zu fordernder Qualitätsmaßstab werden und helfen, die Biologie der Tumorerkrankungen und speziell der Urothelkarzinome adäquat zu erfassen.
Als Kontrollgruppe wurden nicht gegenüber Risikofaktoren exponierte HBCA-Patienten gewählt. Die Alternative, Daten von Patienten mit nicht näher bezeichneten nicht-malignen Erkrankungen der Harnblase zum Vergleich heranzuziehen, wurde nicht genutzt.

4.5.4 Diskussion der Anamnese als Datengrundlage: Expositionsanamnese

Eine grundsätzliche Problematik der epidemiologischen Forschung sui generis stellt die Anamnese dar, da sie in ihrer Eigenheit *a posteriori* erhoben werden muss, und somit zunächst dem Erinnern des Patienten im Zeitpunkt des Interviews mit den äußeren Determinanten (Krankenhaus, perioperative Situation etc.) und darüber hinaus einer nicht zu vernachlässigenden intraindividuellen Komponente (Aktualkrankheit, Gedächtnis, Vigilanz, Begleitmedikation, fokussierte Aufmerksamkeit bzw. Interesse des Patienten etc.) unterworfen sein kann.
Weiterhin müssen eine Vielzahl unterschiedlichster Daten kategorisiert und nach Möglichkeit auch quantifiziert werden. In Hinblick auf den am besten untersuchten und häufigen Risikofaktor inhalativer Nikotinabusus und die Quantifizierung über das Konzept der sog. *packyear*s spricht offenbar zumindest beim Lungenkarzinom vieles für einen Paradigmenwechsel. Neuere Daten zeigten eine überproportional erhöhte Gefährdung bei langer Zeitdauer mit geringem täglichem Konsum, im Vergleich zu starkem Nikotinkonsum über kürzere Zeitdauer bei gleicher Gesamtdosis (Lubin et Caporaso 2006). Weiter muss die erschwerte Quantifizierbarkeit des Passivrauchens Erwähnung finden.
Außerdem ist die Exposition gegenüber Risikofaktoren in Verbindung mit der Entwicklung eines Malignoms nicht generell mit einer schlechten Prognose assoziiert, was wiederum besonders gut für den Nikotinkonsum untersucht, aber auch für andere Karzinogene belegt ist (vgl. Kap. 1.2.1.2). Als entscheidender Faktor in der Tumorgenese jedes zweiten Urothelkarzinoms wurde Nikotinkonsum angeschuldigt, andererseits sind die nikotinassoziierten HBCA wahrscheinlich mit niedrigerem Tumorstadium vergesellschaftet - nochmals ein Verweis auf die Wichtigkeit primärer Endpunkte auch in der epidemiologischen Forschung.
Die Datenerhebung der Berufsexposition gegenüber Karzinogenen über die Anamnese wird zusätzlich zum Erinnerungsfehler (sog. Anamnese-*Bias*) von der Relativität der Angaben (selten / mittelhäufig / häufig, neben der Dauer) während der Befragung verkompliziert.
Grundsätzlich stellt die geringe Kollektivgröße eine Grundproblematik für die Validität der Aussagen dar.

4.5.5 Diskussion der genutzten methodischen Verfahren

Neben den Urothelkarzinomzellen exprimieren auch Stromazellen Proteine, die Effekte auf den Tumorstoffwechsel besitzen können. Daher sind neben der nicht-topologischen Analyse der intrazellulären DNA und RNA (cDNA) die topologische Untersuchung der Immunhistochemie und die *in-situ*-Hybridisierung vorteilhaft angewandte Methoden. Der Antikörper wurde nach der guten Gewebegängigkeit ausgewählt. In Blick auf verschiedene MDM2-Varianten kann der Einsatz mehrerer gegen MDM2 gerichteter Antikörper weitere wertvolle Informationen bieten. Problematischerweise weisen verschiedene Antikörper jedoch eine unterschiedliche Gewebegängigkeit auf, was die Vergleichbarkeit der Daten einschränken kann.

4.6 Nicht dargestellte Befunde für p14ARF

Das Protein p14ARF kann auf molekularer Ebene die MDM-abhängige p53-Ubiquitierung blockieren und so p53 *in vivo* aktivieren (Midgley et al. 2000).

Mutationen des Tumorsuppressor-Gens p14ARF (Exon 1β) waren in 14 Sequenzierungen nicht nachweisbar.

Eigene immunhistochemische Untersuchungen zeigten in nur 11 % eine p14ARF-Protein-Positivität (Antikörper H-132, santa cruz). Bei der hohen prozentualen MDM2-Immunopositivität der Urothelkarzinome sprechen diese Befunde dafür, dass maximal 11 % der Malignome zum Untersuchungszeitpunkt den p14-MDM2-p53-Pfad aktiviert haben und damit eine mögliche Kontrolle der angenommenen MDM2-Überexpression.

4.7 Befunde anderer Arbeitsgruppen am identischen Patientenkollektiv

Am Patientenkollektiv, das auch in der vorliegenden Arbeit untersucht wurde, analysierten Schlott et al. (2004) über eine *real time* PCR (quantitative PCR) die MDM2-mRNA- sowie p14ARF-mRNA-Konzentrationen. Bei Rauchern fand sich eine doppelte MDM2-mRNA(fl)-Menge, jedoch eine halbierte Konzentration der mRNA *des* p14ARF-Tumorsuppressors im Vergleich mit Nichtrauchern. Diese Befunde sprechen für direkte oder vermittelte Effekte von Karzinogenen auf das molekulargenetische Niveau. Die MDM2-mRNA lag in signifikant höherer Konzentration bei fortgeschrittenen Tumorstadien und schlechterer Differenzierung vor (5-fach) in Relation zu frühen Tumorstadien mit hohem Grad der Differenzierung.

Somit konnten Korrelationen zwischen karzinogenen Umweltfaktoren und der isolierten Konzentration der mRNA des onkogenen MDM2-Proteins aufgezeigt werden, während die MDM2-mRNA-Menge (quantitative RNA-PCR) keinen Effekt auf die intrazelluläre Menge des MDM2-Proteins aufwies (semiquantitative Immunhistochemie; Miyajima et al. 2001), was der Schluss aus eigenen Daten bestätigt: Fortgeschrittene Urothelkarzinome wiesen

seltener das MDM2-Protein auf mit deutlicherer Ausprägung im MDM2-Spleißvarianten-positiven HBCA. Darüber hinaus exprimierten nur MDM2-Protein-negative HBCA die MDM2-Variante der Größe 300 bp (ca.).

Die Arbeitsgruppe um Quentin et al. (2004), die ebenfalls Karzinome der selben Patientenpopulation analysierte, fand bei Rauchern eine zehnfach erhöhte mRNA-Konzentration des p16-Gens im Vergleich der Kohorte mit dem niedrigsten Konsumlevel zu der Gruppe mit starkem Nikotinabusus.

Zusammenfassend zeigten sich numerische Abhängigkeiten zwischen der Exposition gegenüber Karzinogenen und dem Vorliegen von MDM2-mRNA-Konzentrationen (Schlott et al. 2004) und MDM2-Spleißvarianten (z. B. der Größe 250 bp [ca.]).

Über den rein deskriptiven Status dieser Daten hinaus sollten experimentelle Interventionsanalysen folgen.

4.8 Spleißvarianten anderer Proteine und Einordnung

Heute sind für die Mehrzahl humaner Proteine Spleißvarianten bekannt, so konnten bspw. seit 2002 für das p53-Gen 10 Varianten charakterisiert werden (Marcel et Hainaut 2009). Darunter finden sich Genprodukte, die die Aktivität des Tumorsupressors p53 synergistisch oder antagonistisch beeinflussen, was das Verständnis um die funktionelle Dynamik dieses zentral wirksamen Zellzyklusgenes und der funktionell eng assoziierten Proteine, z.B. MDM2, weiter revolutioniert und verändern wird.

5. Zusammenfassung

Harnblasenkarzinome gehören weltweit zu den häufigsten malignen Erkrankungen. Ein Teil der Urothelkarzinome weist eine hohe genetische Instabilität mit Tendenz zum Progress - und damit verbunden - schlechter Prognose auf.
Das MDM2-Gen repräsentiert einen der zentralen Knoten bzw. Regulatoren im p53-Pfad des Zellzyklus - also auch der Tumorgenese.

(1) (Fortgeschrittenes) Tumorstadium und MDM2-Spleißvariantenpositivität von Urothelkarzinomen stehen *nicht* in korrelativen Zusammenhang, wie Sigalas et al. (1996) postulierten. Auch zystoskopisch unauffälliges Urothel wies in 2 von 4 Fällen kleine MDM2-Varianten neben der MDM2-mRNA(fl) auf.
In der Literatur wurden MDM2-Varianten mit *onkogenen* Eigenschaften, aber auch mit Zellzyklusprogress *inhibierenden* Effekten beschrieben. Wahrscheinlich kommt *einzelnen* Varianten von MDM2 sogar eine Rolle in nicht malignen oder physiologischen Zellzykluszuständen zu.

(2) Raucher mit hohem Nikotin-Abusus exprimierten seltener die MDM2-Variante 250 bp (ca.), während in der Gruppe beruflich mit Farben und Lacken exponierter Patienten global seltener MDM2-Spleißvarianten vorlagen.

Experimentell bestätigt sind förderliche bzw. positive Effekte bzw. Korrelationen von Umweltfaktoren auf die MDM2-Variantenpositivität (z. B. Chemotherapeutika, Strahlentherapie, Toluol etc.), während eigene Daten darüber hinaus für die Möglichkeit der negativen Assoziation bestimmter Faktoren mit dem Auftreten von MDM2-Varianten sprechen.

Urothelkarzinome exprimierten mit fortschreitender Entdifferenzierung und bei Progress seltener die MDM2-Varianten der Größe 300 und 800 bp (ca.), während die MDM2-Variante der Größe 850 bp (ca.) häufiger bei Rezidiven und fortgeschrittenen Tumoren und die Variante der Größe 700 bp (ca.) unabhängig vom Stadium vorlag.

(3) Differenzierte HBCA zeigten (ohne signifikante Korrelation zur MDM2-Variantenpositivität) eine MDM2-Protein-Expression in der höchsten Frequenz (87,5 % bei pTaG1 vs. 77,8 %; 50 %; 66 % bei der Summe der pTa; pT2; pT3). Wahrscheinlich kommt der MDM2-Akkumulation bei fortgeschrittenen Urothelkarzinomen mit höherer p53-Mutationsrate (Harano et al. 1999) eine geringere Rolle zu als bei den prognostisch günstigeren differenzierten HBCA.

Fortgeschrittene Urothelkarzinome wiesen bei MDM2-Spleißvariantenpositivität deutlich seltener das MDM2-Protein auf als in den Fällen, in denen keine MDM2-Varianten vorlagen.

Die Variante der Größe 300 bp (ca.) war in den MDM2-Protein-negativen HBCA grundsätzlich negativ, wurde jedoch in jedem dritten MDM2-Protein-positiven Urothelkarzinom mit MDM2-Spleißvarianten (30,4 %) exprimiert.

(4) Am Urothelkarzinom wurde ein *in-situ*-Hybridisierungverfahren für MDM2-RNA etabliert mit eingeschränkter Anwendbarkeit auf Paraffingewebe. Die vorliegenden Befunde in Verbindung mit den immunhistochemischen Daten sprechen für eine Beteiligung des Interstitiums beim Harnblasenkarzinom mit aktiviertem MDM2-Gen.

(5) MDM2-Spleißvarianten treten in allen Tumorstadien in Rezidiven häufiger auf. Möglicherweise kommt einigen Varianten eine Rolle an der Entwicklung von Harnblasenkarzinom-Rezidiven zu.

(6) Die Tumorgenese des Urothelkarzinoms geht häufig den Weg der p53-Mutation, deutlich seltener treten MDM2-Genamplifikationen auf, am MDM2-Exon 12 konnten beim Urothelkarzinom keine relevanten Mutationen beschrieben werden. Die Expression von MDM2-Varianten kann ohne deren Sequenzierung zur Risikostratifizierung von Urothelkarzinomen keinen Beitrag leisten.

6. Anhang: Tab. 6.1 bis 6.18

	pTaG1	pTa	pT1	pT2	pT3	G1	G2	G3	Rez	non-R	N
N	16	27	3	18	6	16	23	15	15	39	54
sv pos	8	14	2	13	5	8	17	9	12	22	34
250	2	3		3		2	3	1	2	4	6
300	3	4		2	1	3	3	1	3	4	7
350		2		1			3		1	3	4
380				1				1		1	1
400		1					1			1	1
500				2				2		2	2
700	1	2		4	1	1	2	4	2	5	7
800	4	6		4	2	4	6	2	2	10	12
850	1	2	1	1	1	1	3	1	3	2	5
950		1				1				1	1
1000		1				1			1		1
1100			1		1		2		1	1	2
sv pos	**0.50**	**0.52**	**0.67**	**0.72**	**0.83**	**0.50**	**0.74**	**0.60**	**0.80**	**0.56**	**0.63**
250	0.13	0.11		0.17		0.13	0.13	0.07	0.13	0.10	
300	0.19	0.15		0.11	0.17	0.19	0.13	0.07	0.20	0.10	
350		0.07		0.06			0.13		0.07	0.08	
380				0.06				0.07		0.03	
400		0.04					0.04			0.03	
500				0.11				0.13		0.05	
700	**0.06**	**0.07**		**0.22**	**0.17**	**0.06**	**0.09**	**0.27**	0.13	0.13	
800	**0.25**	**0.22**		**0.22**	**0.33**	**0.25**	**0.26**	**0.13**	**0.13**	**0.26**	
850	0.06	0.07	0.33	0.06	0.17	0.06	0.13	0.07	**0.20**	**0.05**	
950		0.04				0.06	0.04			0.03	
1000		0.04				0.06			0.07		
1100			0.33		0.17		0.09		0.07	0.03	
700	**0.13**	**0.14**		**0.31**	**0.20**	**0.13**	**0.12**	**0.44**	0.17	0.22	
800	**0.50**	**0.43**		**0.31**	**0.40**	**0.50**	**0.35**	**0.22**	**0.17**	**0.45**	
850	0.13	0.14	0.50	0.08	0.20	0.13	0.18	0.11	**0.25**	**0.09**	

Tab. 6.1: Spleißvarianten in Relation zum histopathologischen Befund.
Absolute und relative Häufigkeit bei 54 HBCA. Die letzten 3 Zeilen zeigen selektionierte Daten (sv 700, 800, 850 bp (ca.) Relation zur Zahl der sv-positiven Fälle.

MDM2	pTaG1	pTa	pT1	pT2	pT3	G1	G2	G3	
negativ					800		800		3
	250	250				250			28
				0				0	32
				0			0		65
				350			350		67
				500				500	80
		0					0		82
					700			700	94
				850				850	95
				800,700, 500				800,700, 500	97
		850					850		103
				0				0	104
		700, 400, 350					700, 400, 350		105
				700				700	107
				700				700	111
		0					0		116
	0	0				0			123
10-50 %		800, 350					800, 350		13
		250					250		15
		0					0		22
		0						0	31
	0	0				0			39
				800, 300			800, 300		54
> 50 %	800, 300	800, 300				800, 300			11
		800, 350					800, 350		12
				800, 300			800, 300		16
	0	0				0			19
	800	800				800			21
	0	0				0			25
					0			0	35
	0	0				0			43
		0					0		44
	0	0				0			45
				250			250		48
	0	0				0			50
				250				250	51
				800, 250			800, 250		52
			850				850		56
					800, 300			800, 300	57
	850	850				850			60
	800, 300	800, 300				800, 300			62
				380				380	70
			0					0	71
			1100				1100		72
		300					300		73
					1100		1100		75
					850		850		76
	950	950				950			78
				0				0	83
				0			0		84
	1000,	1000, 300				1000,			86

	300					300			
	0	0				0			89
	800, 700, 250	800, 700, 250				800, 700, 250			91
				700			700		114

Tab. 6.2: Übersicht über sämtliche Fälle nach MDM2-sv und MDM2-IHC.

sv	KG0	KG1	Σ NR	R1+2	R3+4	ER1+2	ER3+4	FA-HBCA
N	5	10	17	3	15	8	9	2
sv +	3/5	6/10	10/17	3/3	10/15	5/8	5/9	2/2
250	2	2	2		1	2		
300	1	2	3		3		1	
350			1		1	1	2	
380				1				
400					1			
500						2		1
700	1	1	2	1	2	1	1	
800	1	3	5		4	1	2	
850		1	1		2	1	1	1
950					1			
1000	1	1	1					
1100			1	1				
sv +	**0.60**	**0.60**	**0.59**	**1.0**	**0.67**	**0.63**	**0.56**	1.0
250	0.40	0.20	0.12		0.07	0.25		
300	0.20	0.20	0.18		0.20		0.11	
350			0.06		0.07	0.13	0.22	
380				0.33				
400					0.07			
500						0.25		0.50
700	0.20	0.10	0.12	0.33	0.14		0.11	
800	0.20	0.33	0.29		0.27		0.22	
850		0.10	0.06		0.14		0.11	0.50
950					0.07			
1000	0.20	0.10	0.06					
1100			0.06	0.33				
250	**0.67**	**0.33**			**0.10**	**0.40**		
300	0.33	0.33	0.30		0.30		0.20	
500						0.40		**0.50**
700	0.33	0.17	0.20		0.20	0.20	0.20	
800	0.33	0.50	0.50		0.40	0.20	0.40	
850		0.17	0.10		0.20	0.20	0.20	**0.50**

1000	**0.33**	**0.17**	**0.10**					

Tab. 6.3: Spleißvarianten in Relation zum Risikoprofil (Anamnese).
Absolute und relative Häufigkeit bei 54 Fällen von HBCA; Raucher mit geringem Konsum (weniger als 20 py) wurden unter **R1+2**, Raucher mit stärkerem Konsum unter **R3+4** gelistet, Exraucher in den beiden Konsumstufen (**ER**) und 2 Fälle mit positiver Familienanamnese (bezüglich HBCA). In **Σ NR** sind alle Nichtraucher zusammengefasst, unabhängig von der beruflichen Exposition. Die letzten 7 Tabellenzeilen beinhalten die auf die sv-positiven (sv +) Fälle bezogene Verteilung einzelner Spleißvarianten und zeigen vergleichbare Relationen in **KG** vs. Expositionsgruppen mit sv 250 bp (ca.) als Ausnahme.

sv	**A**	**B**	**C**	**D**	**E**	**F**	**G**	**H**	**J**	**Z**	**Y**	**X**	**W**	**V**
N	9	3	5	5	5	6	2	6	7	7	5	7	5	1
sv +	3	2	1	3	2	5	2	4	3	3	3	6	4	1
250		1							1	1		1	1	1
300			1		1	1	1	1			2	1	2	
350	1					2			1					
400						1								
500	1									1		1		
700	1	1		1		2		2	1	1		1		
800			1		1	2	2	1			1	1	1	
850					1	1		1			1	2		
950				1								1	1	
1100				1										
sv +	**0.33**	**0.67**	**0.2**	**0.6**	**0.4**	**0.83**	**1.0**	**0.67**	**0.43**	**0.43**	**0.6**	**0.86**	**0.8**	**1.0**
250		0.50							0.33	0.33		0.17	0.25	1.0
300			1.0		0.5	0.20	0.5	0.25			0.67	0.17	0.50	
350	0.33					0.40			0.33					
400						0.20								
500	0.33									0.33		0.17		
700	0.33	0.50		0.33		0.40		0.50	0.33	0.33		0.17		
800			1.0		0.5	0.40	0.5	0.25			0.33	0.17	0.25	
850					0.5	0.20		0.25			0.33	0.33		
950				0.33								0.17	0.25	
1100				0.33										
NR	0	0	2	2	0	2	0	2	0	0	0	1	0	0

Tab. 6.4: Spleißvarianten bei den exponierten HBCA-Patienten in Relation zum jeweiligen Karzinogen.
Alle relativen Angaben beziehen sich auf die Zahl sv-positiver Fälle. **A**: Lacke, Farben, Kunstharze, Klebstoffe; **B**: Kunststoffe; **C**: Landwirtschaft: Herbizide, Insektizide, Düngemittel, Abgase; **D**: Asbest; **E**: Glaswolle; **F**: Steinstaub; **G**: Kohlestaub; **H**: Metalldämpfe, Metallstäube; **J**: Holzstaub; **Z**: chemische Lösungsmittel; **Y**: Petroleum, Öle; **X**: Benzol, Toluol, Benzin, Bitumen (PAH), Teer, Gase, **W**: Druckerschwärze; **V**: Motorabgase. **NR**: Nichtraucher. Durch Mehrfachnennungen ergibt die Summe aus den „N“ der zweiten Tabellenzeile mehr als 54 Fälle.

	pTaG1	pTaG1R	pTa	pTaR	pT1	pT1R	pT2	pT2R	pT3	pT3R	G1	G1R	G2	G2R	G3	G3R
N	10	6	18	9	1	2	14	4	6	0	10	6	15	8	14	1
sv +	4	4	8	6	0	2	9	4	5	0	4	4	10	7	8	1
sv +	**0.40**	**0.67**	**0.44**	**0.67**		**1.0**	**0.64**	**1.0**	**0.83**		**0.40**	**0.67**	**0.67**	**0.88**	**0.57**	1.0
250	**0.25**	**0.25**	**0.13**	**0.33**			**0.44**				**0.25**	**0.25**	**0.30**	**0.14**	**0.25**	
300	**0.25**	**0.50**	**0.38**	**0.33**			**0.11**	**0.25**	**0.20**		**0.25**	**0.50**	**0.20**	**0.14**	**0.13**	
350			0.25					0.25					0.20	0.14		
380							0.11								0.13	
400			0.13										0.10			
500							0.11								0.13	
700	**0.25**		**0.25**				**0.22**	**0.50**	**0.20**		**0.25**		**0.10**	**0.14**	**0.38**	1.0
800	**0.75**	**0.25**	**0.63**	**0.17**			**0.33**	**0.25**	**0.40**		**0.75**	**0.25**	**0.50**	**0.14**	**0.25**	
850		**0.25**		**0.33**		**0.50**	**0.11**		**0.20**			**0.25**	**0.10**	**0.29**	**0.13**	
950	0.25		0.13								0.25					
1000		0.25		0.17								0.25				
1100						0.50			0.20				0.10	0.14		

Tab. 6.5: Spleißvarianten-positive Fälle bei 39 Nichtrezidiven und 15 Rezidiven. Auffällig sind insbesondere die Verteilungen der sv der Größen 700, 800, 850 bp (ca.). Vgl. Abb. 3.6 und 3.7. Relative Angaben beziehen sich auf die Zahl MDM2-sv-positiven Urothelkarzinome (mit Ausnahme der Zeile 3). Ersttumoren (z. B. pTaG1) und Rezidive (z. B. pTaG1*R*).

	MDM2-IHC	pTaG1	pTa	pT1	pT2	pT3	G1	G2	G3	
sv positiv	neg	**0.50**	**0.50**		**0.67**	**1.0**	**0.50**	0.57	**0.75**	
	10 - 50 %	0	**0.40**		1.0			0.75		
	> 50 %	**0.54**	**0.56**	0.67	0.75	0.75	**0.54**	0.83	0.50	
sv negativ	neg	**0.50**	**0.50**		**0.33**		**0.50**	**0.43**	**0.25**	
	10 – 50 %	1	**0.60**					0.25		
	> 50 %	**0.46**	**0.44**	0.33	0.25	0.25	**0.46**	0.17	0.50	
sv positiv	neg	1	3		6	2	1	4	6	
sv negativ	neg	1	3		3	0	1	3	2	
n gesamt	neg	2	6		9	2	2	7	8	17
	10 – 50 %	1	5		1	0	1	4	1	6
	> 50 %	13	16	3	8	4	13	12	6	31
N		16	27	3	18	6	16	23	15	54

Tab. 6.6: MDM2-Immunoreaktivität in Relation zu Tumorstadium, Differenzierungsgrad und Spleißvariantenstatus. Berücksichtigung der absoluten Zahlen (untere 4 Zeilen; nicht differenziert nach Rezidiv vs. Nichtrezidiv).

	pTaG1	pTa	pT1	pT2	pT3	G1	G2	G3	
sv-positive HBCA	8	14	2	13	5	8	17	9	34
MDM2-IHC positiv	7	11	2	7	3	7	13	3	23
MDM2-IHC negativ	1	3		6	2	1	4	6	11
sv-positive HBCA									
MDM2-IHC positiv	0.875	0.786	1.0	0.538	0.60	0.875	0.764	0.333	
MDM2-IHC negativ	0.125	0.214	0	0.462	0.40	0.125	0.235	0.667	
	pTaG1	pTa	pT1	pT2	pT3	G1	G2	G3	
sv-negative HBCA	8	13	1	5	1	8	6	6	20
MDM2-IHC positiv	7	10	1	2	1	7	3	4	14
MDM2-IHC negativ	1	3		3		1	3	2	6
sv-negative HBCA									
MDM2-IHC positiv	0.875	0.769	1.0	0.40	1.0	0.875	0.5	0.667	
MDM2-IHC negativ	0.125	0.231	0	0.60	0	0.125	0.5	0.333	

Tab. 6.7: MDM2-sv-positive vs. -negative Urothelkarzinome nach MDM2-Protein-Positivität. Vereinfachte Darstellung ohne Charakterisierung der MDM2-Variante mit Angabe der absoluten und relativen Befunde.

	pTaG1	pTa	pT1	pT2	pT3	G1	G2	G3	N	
MDM2-ICH neg										
sv-pos	1	3	0	6	2	1	4	6	11	**0.647**
sv-neg	1	3	0	3	0	1	3	2	6	**0.353**
250	1.0	0.333				1			1	**0.091**
350		0.333		0.167			0.500		2	0.182
700		0.333		0.500	0.500		0.250	0.667	5	**0.455**
800				0.167	0.500		**0.250**	**0.167**	2	**0.182**
850		1		1			1	1	2	0.182
n gesamt	2	6		9	2	2	7	8	17	
MDM2-IHC pos										
sv-pos	7	11	2	7	3	7	13	3	23	**0.622**
sv-neg	7	10	1	2	1	7	3	4	14	**0.378**
250	0.143	**0.182**		**0.429**		**0.143**	**0.231**	**0.333**	5	**0.220**
300	**0.429**	**0.364**		**0.286**	**0.333**	**0.429**	**0.231**	**0.333**	7	**0.304**
700	0.143	0.091		0.143		0.143	0.077		2	**0.087**
800	0.571	**0.545**		**0.429**	**0.333**	**0.571**	**0.385**	**0.333**	10	**0.435**
850	0.143	0.091	0.5		0.333	0.143	0.154		3	0.130
n gesamt	14	21	3	9	4	14	16	7	37	
N gesamt	16	27	3	18	6	16	23	15	54	

Tab. 6.8: MDM2-negative und -positive Urothelkarzinome nach MDM2-sv-Positivität und einzelnen MDM2-Varianten sowie dem Tumorstadium.
Relativ-Zahlen beziehen sich auf die sv-pos Fälle in den beiden alternativen Gruppen der MDM2-IHC-Immunopositivität. Einzelne HBCA wiesen 2 oder 3 MDM2-sv auf.

	Raucher				Exraucher				Raucher + Exraucher			
	< 10 Jahre	10-20 Jahre	20-30 Jahre	> 30 Jahre	<10 Jahre	10-20 Jahre	20-30 Jahre	> 30 Jahre	< 10 Jahre	10-20 Jahre	20-30 Jahre	> 30 Jahre
N	0	1	3	16	1	4	6	6	1	5	9	22
sv +		0	3	11	0	3	3	4	0	3	6	15
sv +		0	1.0	0.688	0	0.750	0.5	0.667	0	0.6	0.667	0.682
250				1		1	1	1		1	1	2
300			1	2				1			1	3
350				1			2				2	1
380			1								1	
400				1								1
500						1		1		1		1
700				3				2				5
800			1	3			1	2			2	5
850				3		1				1		3
950				1								1
1100			1								1	
250				0.091		0.333	0.333	0.25		0.333	0.167	0.133
300			0.333	0.182				0.25			0.167	0.2
350				0.091			0.667				0.333	0.133
380			0.333								0.167	
400				0.091								0.133
500						0.333		0.25		0.333		0.133
700				0.273				0.5				0.333
800			0.333	0.273			0.333	0.5			0.333	0.333
850				0.273		0.333				0.333		0.2
950				0.091								0.133
1100			0.333								0.167	

Tab. 6.9: Dauer des Nikotinkonsums bei Rauchern und ehemaligen Rauchern nach MDM2-sv.

	NR	Raucher				Exraucher				Raucher + Exraucher			
		<10 St./d	10-20 St./d	20-30 St./d	>30 St./d	<10 St./d	10-20 St./d	20-30 St./d	>30 St./d	<10 St./d	10-20 St./d	20-30 St./d	>30 St./d
N	17	3	13	2	3	2	11	2	1	5	24	4	4
sv +	10	1	10	2	2	2	5	2	0	3	15	4	2
sv +	0.588	0.333	0.679	1.0	0.667	1.0	0.455	1.0	0	0.6	0.625	1.0	0.5
250	2			1		1	1	1		1	1	2	
300	3		2		1		1				3		1
350	1		1		1			1			1	1	1
380			1								1		
400					1								1
500						1	1			1	1		
700	2	1	1		1	1	1			2	2		1
800	5		2	2	1	1	1			1	3	2	1
850	1		3				1				4		
950			1								1		
1000	1												
1100	1		1								1		
250	0.5			0.5		0.5	0.2	0.5		0.333	0.067	0.5	
300	0.333		0.2		0.5		0.2				0.20		0.5
350	0.1		0.1		0.5			0.5			0.067	0.25	0.5
380			0.1								0.067		
400					0.5								0.5
500						0.5	0.2			0.333	0.067		
700	0.2	1	0.1		0.5	0.5	0.2			0.667	0.133		0.5
800	0.5		0.2	1.0	0.5	0.5	0.2			0.333	0.20	0.5	0.5
850	0.1		0.3				0.2				0.267		
950			0.1								0.067		
1000	0.1												
1100	0.1		0.1								0.067		

Tab. 6.10: Täglicher Nikotinkonsum bei Rauchern und ehemaligen Rauchern nach MDM2-sv.

	Non-Rez sv + (n = 22/39)	Non-Rez sv - (n = 17/39)	Rezidiv sv + (n = 12/15)	Rezidiv sv - (n = 3/15)
MDM2 neg	0.32	0.24	0.33	0.33
MDM2 < 50 %	0.05	0.18	0.17	
MDM2 > 50 %	0.64	0.59	0.50	0.67

Tab. 6.11: Semiquanititative MDM2-IHC bei Rezidiven vs. Nicht-Rezidiven.
MDM2-Protein bei 15 Rezidiven vs. 39 Nicht-Rezidiven (Non-Rez) und MDM2-Spleißvariantenpositiven (sv +) und -negativen (sv -) Urothelkarzinomen mit Angabe der absoluten Fallzahlen.

Non-Rezidive (n = 39)	pTaG1 sv + (n = 4)	pTaG1 sv - (n = 6)	Non-pTaG1 sv + (n = 18)	Non-pTaG1 sv - (n = 11)
MDM2 neg	**0**	**0**	0.39	0.36
MDM2 < 50%	0	0.17	0.06	0.18
MDM2 > 50%	1.0	0.83	0.56	0.45
Rezidive (n = 15)	R-pTaG1 sv + (n = 4)	R-pTaG1 sv - (n = 2)	R-Non-pTaG1 sv + (n = 8)	R-Non-pTaG1 sv - (n = 1)
MDM2 neg	0.25	0	0.38	1.0
MDM2 < 50%	0	0	0.25	
MDM2 > 50%	0.75	1.0	0.38	

Tab. 6.12: Semiquantitative MDM2-IHC nach Prognosefaktor.
MDM2-Protein bei Nichtrezidiven und Rezidiven bezüglich des sv-Status und der Alternative pTaG1 vs. Nicht-pTaG1: Die jeweilige Entität z. B. Nicht-pTaG1 mit MDM2-Spleißvarianten (Non-pTaG1 sv+) ergibt 100%, angegeben wurde die Verteilung der MDM2-Immunopositivität der Urothelkarzinome dieser Gruppe mit Angabe der absoluten Gruppengrößen.

Agens	Hersteller, Ort
Agarose	Biozym, Darmstadt
Aqua bidest.	E. Merck, Darmstadt
Anti-Digoxigenin-Ak (HRP-konjugiert, Dako© P5104)	DAKO Diagnostika GmbH, Hamburg
Aquamount	Gurr, Hanau
Borsäure	E. Merck, Darmstadt
Bromphenolblau-Auftragspuffer	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim
DAB = 3,3 Diaminobenzidin	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim
DEPC	Roth, München
Dig-RNA-Labeling-Mix (No. 1277073)	Roche, Mannheim
Dnase I (Rnase free, No. 776785)	Roche, Mannheim
DTT-Lösung	AppliChem, Darmstadt
EDTA	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Eisessig (konzentrierte Essigsäure)	E. Merck, Darmstadt
Ethanol abs.	E. Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid	E. Merck, Darmstadt
Gene-RulerTM 100 bp	MBI Fermentas, Vilnius, Litauen
Desoxynukleotide (je 100 mM)	Amersham Pharmacia Biotech Inc., München
Formamid ($HCONH_2$)	E. Merck, Darmstadt
Hämalaun (Meyers Hämalaun)	E. Merck, Darmstadt
HCl (Chlorwasserstoffsäure)	E. Merck, Darmstadt
Hybridisierungspuffer (Dako© S3304)	DAKO Cytomation, Dänemark
Magnesiumchlorid	E. Merck, Darmstadt
Natriumcitrat	E. Merck, Darmstadt
Natriumchlorid	E. Merck, Darmstadt
Natriumhydrogenphosphat	E. Merck, Darmstadt
Natriumhydroxid (NaOH)	E. Merck, Darmstadt
Oligonukleotid-*Primer* [vgl. Kap. 2.2.2]	MWG-BIOTECH-AG, Ebersberg
Peroxidase-blockierendes Reagenz (Dako© S2023)	DAKO Diagnostika GmbH, Hamburg
Proteinase K (Dako© S 3020)	DAKO Diagnostika GmbH, Hamburg
Random Primer (3 µg / µl)	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
RnaseOUT TM Ribonuclease Inhibitor	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
SDS (Natriumdodecylsulfat)	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Standard Gene Ruler 100 bp DNA Ladder	MBI Fermentas, Wilna (Littauen)
10xReaktionspuffer	Amersham Pharmacia Biotech Inc., München
RNA-Later	Ambion, Huntingdon, Cambridgeshire, U.K.
Superase-In (bzw. Rnase-out, No. 2694)	Ambion, Huntingdon, Cambridgeshire, U.K.
Taq-Polymerase	Amersham Pharmacia Biotech Inc., München
Tris	E. Merck, Darmstadt
Tween 20	USB, Bad Homburg
T3-RNA-Polymerase (No. 2062)	Ambion, Huntingdon, Cambridgeshire, U.K.
T7-RNA-Polymerase (No. 2082)	Ambion, Huntingdon, Cambridgeshire, U.K.
Xylenblau-Auftragspuffer	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim
Xylol	E. Merck, Darmstadt
Zitronensäure	E. Merck, Darmstadt

Tab. 6.13: Verwendete Chemikalien.

Ziel	*Primer*		Amplikon
MDM2	s	5' - TTCATGCAATGAAATGAATCC – 3'	
Exon 12	as	5' - ATTGGTTGTCTACATACTGG - 3'	
(DNA)		95° C 7', 40 x [95° C 45''/50° C 30''/72° C 30''] 72° C 7'	510 bp
D12S80	s	5' - CCAGCCTGGAATGATATGTA - 3'	
(DNA)	as	5' - GAATGTCAATGGACCAGATG – 3'	
		95° C 7', 40 x [95° C 45''/56° C 45''/72° C 1'] 72° C 7'	ca. 220 bp
D12S83	s	5' - TTTTTGGAAGTCTATCAATTTGA - 3'	
(DNA)	as	5' - TAGCAGAGAAAGCCAATTCA - 3'	
		95° C 7', 40 x [95° C 45''/56° C 45''/72° C 1'] 72° C 7'	ca. 110 bp
MDM2	s1	5' - CTGGGGAGTCTTGAGGGACC - 3'	
(cDNA)	s2	5'-CGCGAAAACCCCGGGCAGGCAAATGTGCA-3'	
	as	5' - CAGGTTGTCTAAATTCCTAG - 3'	
		94° C 1', 40 x [94° C 10''/ 60° C 1'/ 68° C 2'] 72° C 7'	<ca.1,6 kbp

Tab. 6.14: PCR – *Primer*, Reaktionsbedingungen und Größe der Amplikons.

Kit	Hersteller, Ort
ABI PRISM TM BigDye Terminator Kit	Perkin-Elmer, Darmstadt
DAKO ChemMate (TM) Detection Kit Alkaline Phosphatase / RED	DAKO Diagnostika, Hamburg
QIA quick Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden
RNeasy-Kit	Qiagen, Hilden

Tab. 6.15: Verwendete kommerzielle Reaktionsansätze (sog. Kits).

Agens	Hersteller, Ort
AmmoniumAcetat (pH = 7.5, 7.5 M)	57,8 g NH_4Acetat (pH 7,5 mit Eisessig einzustellen) ad 100 ml DEPC-*Aqua* autoklavieren, aliquotieren, pH kontrollieren (Verwendung für RNA)
Citrat-Puffer (pH = 6.0)	9 ml Stammlösung A (4,2 g Citronensäure ad 200ml H_2O dest.) + 41 ml Stammlösung B (14,7 g NaCitrat ad 500 ml H_2O dest.) ad 500 ml H_2O dest.
DEPC-*Aqua* DEPC-*Aqua*	0,5 ml DEPC ad 1000 ml H_2O bidest.
EDTA-Lösung (pH = 8.0, 0.5 M)	(pH 8,0 mit 10 N NaOH einzustellen) ad 500 ml DEPC-H_2O, autoklavieren, aliquotieren, pH kontrollieren, (Verwendung für RNA)
Fast Red	450 µl DAKO Puffer F + je 15µl Red1/ Red2/ Red3 + 5 µl Levamisole (DAKO Diagnostika GmbH, Hamburg)
10 x PBS (pH = 7.2)	2,76 g NaH_2PO_4 x 2 H_2O + Na_2HPO_4 x 2 H_2O + 76 g NaCl ad 1000 ml = *phosphate buffered saline* DEPC-H_2O, autoklavieren, dann pH 7.2 mit 1 N NaOH einzustellen (Verwendung für RNA)
SDS - Lösung (10 %)	10 g SDS ad 100 ml Aqua bidest.
20 x SSC (pH = 7.0)	175 g NaCl + 88 g Na_3-Zitrat ad 1000 ml aqua bidest. (pH mit HCl einstellen), standard saline citrate
1 x TAE - Puffer	10 ml 50 x TAE-Puffer ad 500 ml DEPC-*Aqua*

50 x TAE - Puffer	242 g TRIS + 57,1 ml Eisessig + 100 ml 0,5 M EDTA-Lösung ad 1000 ml DEPC-H_2O
10 x TBS-Puffer (pH = 7.6)	30,28 g Tris + 43,83 g NaCl ad 500 ml aqua bidest. (pH mit 5 M HCl einzustellen)
1 x TBS-Tween	100 ml 10 x TBS-Puffer + 900 ml aqua bidest. + 2000 µl Tween 20
TBE-Puffer	6,05 g Tris + 3,09 g Borsäure + 0,293 g EDTA ad 1000 ml H_2O dest.
Tris-Puffer (pH = 7.4, 0.05 M)	12,1 g Tris + 17 g NaCl ad 2000 ml H_2O dest. mit 1 N HCl bei RT auf pH = 7,4 einzustellen
Waschpuffer 1 [vgl. Kap. 2.2.5.3]	7,5 ml vom 20 x SSC + 1,5 ml vom 10 % SDS ad 150 ml H_2O bidest., entspricht 1 x SSC mit 0.1 % SDS
Waschpuffer 2 [vgl. Kap. 2.2.5.3]	1,0 ml vom 20 x SSC + 1,0 ml vom 10 % SDS ad 100 ml H_2O bidest., entspricht 0.2 x SSC mit 0.1 % SDS

Tab. 6.16: Verwendete Puffer und weitere Lösungen.

Gerät	Hersteller, Ort
Agarose-Gel-Kammer	Stratagene, Heidelberg
Automatisierter Sequenzer	ABI Prism TM 310 PE Biosystems Division, Applied Biosystems, U.S.A.
Dokumentationsprinter	BioDocControler, VideoGraphic Printer UP890-CE
Eismaschine	Scotsman AF-1D
Feuchte Kammer	[handelsüblich]
Glasküvetten	Schott, Göttingen
Glaskolben (2 l, 4 Stück)	Schott, Göttingen
Illuminiszenzquelle	BIOMETRA TI, Göttingen
Laborwaage	Schütt GmbH, Göttingen
Mikro-Dismembrator	B. BRAUN, BIOTECH INTERNATIONAL
Mikrowelle (750 W)	Siemens
Photometer	Ultrospec 3000UV/Visible Spectrometer, Pharmacia Biotech, Freiburg
Pipetten	Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg
Sterilisator	[handelsüblich]
Thermocycler	BIOMETRA T gradient Thermoblock, Göttingen
Transformator	[handelsüblich]
Vakuumzentrifuge	EPPENDORF Concentrator 5301, Hamburg
Vortexer	Schütt GmbH, Göttingen
Zentrifuge	EPPENDORF Centrifuge 5417R, Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg

Tab. 6.17: Technisches Zubehör.

Material	Hersteller, Ort
Aluminiumfolie	[handelsüblich]
Eindeckmittel	Roth, Nürnberg
Einmalhandschuhe, talkumfrei	[handelsüblich]
Fettstift	Roth GmbH, Nürnberg
Flüssiger Stickstoff	[handelsüblich]
Objektträger beschichtet, Deckgläser	Roth, Nürnberg
Pipettenspitzen	Eppendorf, Hamburg
Reagiergefäße (sog. E-*Cups*)	Eppendorf, Hamburg
Skalpelle und Spatel	Roth, Nürnberg
Sterilisierte bzw. autoklavierte Pinzetten	[handelsüblich]

Tab. 6.18: Verbrauchsmaterial.

7. Literatur

Adsay NV, Sakr WA, Grignon DJ (1997): Flat-type transitional cell carcinoma in situ. Pathol Case Rev 2, 115–121

Altwein JE (2007): Primärprävention beim Harnblasenkarzinom - was gibt es Neues. Urologe A 46, 616-21

Angulo JC, Lopez JI, Grignon DJ, Sanchez-Chapado M (1995): Muscularis mucosae differentiates two populations with different prognosis in stage T1 bladder cancer. Urology 45 (1), 47-53

Anton-Culver H, Lee-Feldstein A, Taylor TH (1992): Occupational and bladder cancer risk. Am J Epidemiol 136, 89-94

Arai T, Nakano T, Fukuhisa K (1991): Second cancer after radiation therapy for cancer of the uterine cervix. Cancer 67, 398-405

Argentini M, Barboule N, Wasylyk B (2000): The contribution of the RING finger domain of MDM2 to cell cycle progression. Oncogene 19 (34), 3849-57

Augustine A, Herbert JR, Kabat GC (1988): Bladder cancer in relation to cigarette smoking. Cancer Res 48, 4405-8

Baker GL, Kahl LE, Zee BC, Stolzer BL, Agarwas AK, Medsger Ta (1987): Malignancy following treatment ofrheumatoid arthritis with cyclophosphamide. Long-term case-control follow-up study. Am J Med 83, 1-9

Barak Y, Juven T, Haffner R, Oren M (1993): mdm2 expression is induced by wild type p53 activity. EMBO J 12, 461-8

Barak Y, Gottlieb E, Juven-Gershon T, Oren M (1994): Regulation of mdm2 expression by p53: Alternative promoters produce transcripts with nonidentical translation potential. Genes Dev 8, 1739-49

Bartel F, Meye A, Würl P, Kappler M, Bache M, Lautenschläger C, Grünbaum U, Schmidt H, Taubert H (2001): Amplification of the MDM2 gene, but no expression of splice variants of MDM2 mRNA, is associated with prognosis in soft tissue sarcoma. Int J Cancer 95, 168-75

Bartel F, Pinktert D, Fiedler W, Kappler M, Würl P, Schmidt H, Taubert H (2004): Expression of alternativeely and aberrant spliced transcripts of MDM2 mRNA is not tumor-specific. Int J Oncol 24 (1), 143-51

Bates MN, Smith AH, Hopenhayn-Rich C (1992): Arsenic ingestion and internal cancers: a review. Am J Epidemiol 135, 462-76

Batzler WU, Giersiepen K, Hentschel S, Husmann G, Kaarsch P, Katalinic A, Kieschke J, Kraywinkel K, Meyer M, Stebenow R: Krebs in Deutschland. Häufigkeiten und Trends, 6. Auflage; Verlag Robert Koch-Institut, Saarbrücken 2008, 82-86

Bento MJ, Barros H (1997): Life style and occupational risk factors in bladder cancinoma. Acta Med Port 10, 39-45

Bishop JM (1991): Molecular themes in oncogenesis. Cell 64, 235-48

Bjerregaard BK, Raaschou-Nielsen O, Sørensen M, Frederiksen K, Christensen J, Tjønneland A, Overvad K, Chapelon FC, Nagel G, Chang-Claude J (2006): Tobacco

smoke and bladder cancer in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition. Int J Cancer 19, 2412-6.

Blumentals WA, Foulis PR, Schwartz SW, Mason TJ (2004): Analgesic therapy and the prevention of bladder cancer. Urol Oncol 22, 11-5

Boddy MN, Freemout PS, Borden KLB (1994): The p53-associated protein MDM2 contains a newly characterized zinc-finger domain called the RING finger. Trends Biochem Sci 19, 198-9

Boice JD, Engholm G, Kleinerman RA (1988): Radiation dose and second cancer risk in patients treated for cancer of the cervix. Radiat Res 116, 3-55

Boorjian S, Cowan JE, Konety BR, DuChane J, Tewari A, Carroll PR, Kane CJ (2007): Bladder cancer incidence and risk factors in men with prostate cancer: results from Cancer of the Prostate Strategic Urologic Research Endeavor. J Urol 177 (3), 883-7

Boring CC, Squires TS, Tong T (1993): Cancer statistics 1993. CA Cancer J Clin 43, 7

Boyd SD, Tsai KY, Jacks T (2000): An intact HDM2 RING-finger domain is required for nuclear exclusion of p53. Nat Cell Biol 2, 563-8

Bueso-Ramos CE, Yang Y, deLeon E, McCown P, Stass SA, Albitar M (1993): The human MDM2 oncogene is overexpressed in leukemias. Blood 82, 2617-23

Bueso-Ramos CE, Manshouri T, Haidar MA, Yang Y, McCown P, Ordonez N, Glassman A, Sneige N, Albitar M. (1996): Abnormal expression of MDM-2 in breast carcinomas. Breast Cancer Res Treat 37, 179-88

Candeias MM, Malbert-Colas L, Powell DJ, Daskalogianni C, Maslon MM, Naski N, Bourougaa K, Calvo F, Fåhraeus R (2008): p53 mRNA controls p53 activity by managing Mdm2 functions. Nat Cell Biol 10, 1098-105

Case RA, Hosker ME, McDonald DB, Pearson JT (1954): Tumours of the urinary bladder in workmen engaged in the manufacture and use of certain dyestuff intermediates in the British chemical industry. Part I. The role of aniline, benzidine, alpha-naphthylamine, and beta-naphthylamine. Br J Ind Med 50, 389-411

Cahilly-Snyder L, Yang-Geng T, Francke U, George DL (1987): Molecular analysis and chromosomal mapping of amplified genes isolated from a transformed mouse 3T3 cell line. Somatic Cell Mol Genet 13, 235-44

Candeias MM, Malbert-Colas L, Powell DJ, Daskalogianni C, Maslon MM, Naski N, Bourougaa SK, Calvo F, Fåhraeus R (2008): p53 mRNA controls p53 activity by managing Mdm2 functions. Nat Cell Biol 10, 1098-105

Carta P, Aru G, Cadeddu C, Gigli G, Papi G, Charta F, Nurchis P (2004): Martality for pancreatic cancer among aluminium smelter workers in Sardinia, Italy. G Ital Med Lav Ergon 26, 83-9

Castaño-Vinyals G, Cantor KP, Malats N, Tardon A, Garcia-Closas R, Serra C, Carrato A, Rothman N, Vermeulen R, Silverman D (2008): Air pollution and risk of urinary bladder cancer in a case-control study in Spain. Occup Environ Med 65, 56-60

Castelao JE, Yuan JM, Skipper PL, Tannenbaum SR, Gago-Dominguez M, Crowder JS, Ross RK, Yu MC (2001): Gender- and smoking-related bladder cancer risk. J Natl Cancer Inst 93, 538-45.

Castelao JE, Yuan JM, Gago-Dominguez M, Skipper PL, Tannenbaum SR, Chan KK, Watson MA, Bell DA, Coetzee GA, Ross RK (2004): Carotenoids/ vitamin C and smoking-related bladder cancer. Int J Cancer 110, 417-23

Chandler DS, Singh RK, Caldwell LC, Bitler JL, Lozano G (2006): Genotoxic stress induces coordinately regulated alternative splicing of the p53 modulators MDM2 and MDM4. Cancer Res 66 (19), 9502-8

Chen CH, Shun CT, Huang KH, Huang CY, Tsai YC, Yu HJ, Pu YS (2007): Stopping smoking might reduce tumour recurrence in nonmuscle-invasive bladder cancer. BJU Int 100, 281-6

Chen CJ, Chuang YC, Lin TM, Wu HY (1985): Malignant neoplasms among residents of a blackfoot disease-endemic area in Taiwan: high arsenic artesian wellwater and cancers. Cancer Res 45, 5895-9

Chen J, Lin J, Levine AJ (1995): Regulation of transcription functions of the p53 tumor suppressor by the mdm2 oncogene. Mol Med 1, 142-52

Chen J, Marechal V, Levine AJ (1993): Mapping of the p53 and mdm2 interaction domains Mol Cell Biol 13, 4107-14

Chen J, Wu X, Lin J, Levine AJ (1996): mdm2 inhibits the G1 arrest and apoptosis functions of the p53 tumor suppressor protein. Mol Cell Biol 16, 2445-52

Cheng L, Neumann RM, Scherer BG, Weaver AL, Leibovich BC, Nehra A, Zincke H, Bostwick DG (1999): Tumor size predicts the survival of patients with pathologic stage T2 bladder carcinoma: a critical evaluation of the depth of muscle invasion. Cancer 85 (12), 2638-47

Claude J, Kunze E, Frentzel-Beyme R, Paczkowski K, Schneider J, Schubert H (1986): Life-style and occupational risk factors in cancer of the lower urinary tract. Am J Epidemiol 124, 578-89

Claude J, Frentzel-Beyme R, Kunze E (1988): Occupation and risk of cancer of the lower urinary tract among men. A case control study. Int J Cancer 41, 371-9

Coleman MP, Esteve J, Damiecki P, Arslan A, Renard H (eds), (1993): Trends in cancer incidence and mortality. International Agency for Research on Cancer Lyon, IARC Sci Publ 121, 543-76

Cordon-Cardo C, Latres E, Drobnjak M, Oliva MR, Pollack D, Woodruff JM, Marechal V, Chen J, Brennan F, Levine AJ (1994): Molecular Abnormalities of mdm2 an p53 Genes in Adult Soft Tissue Sarcomas. Cancer Res 54, 794-9

Cukuranovic R, Ignjatovic M, Stefanovic V (1991): Urinary tract tumors and Balkan nephropathy in the South Morava River basin. Kidney Int Suppl 34, 80-4.

Cutler SJ, Heney NM, Friedell GH: Longitudinal study of patient with bladder cancer: factors associated with disease recurrence and progression. In: Bladder cancer; hrsg. v. Bonney WW, Prout GR JR. 1. Aufl., Williams & Wilkins, Baltimore 1982, 762-63

Dang J, Kuo ML, Eischen CM, Stepanova L, Sherr CJ, Roussel MF (2002): The RING domain of Mdm2 can inhibit cell proliferation. Cancer Res 62 (4), 1220-30

Dorp vF, Eisenhardt A, Goebell PJ, Gschwend J, Jäger T, Jakse G, Jocham D, Krege S, Lümmen G, Otto T: Harnblasenkarzinom; in: Uroonkologie; hrsg. v. Rübben H; 4. Auflage; Springer Medizin Verlag Heidelberg 2007, 300-372

Duro D, Bernard O, Dela Valle V, Berger R, Larsen CJ (1995): A new type of p16INK4a/MTS1 gene transcript expressed in B-cell malignancies. Oncogene 11, 21-9

Eichhorn T, Schroeder HG, Glanz H, Schwerk WB (1987): Histologisch kontrollierter Vergleich von Palpation und hochauflösender Sonographie in der Diagnose zervikaler Lymphknotenmetastasen. Laryngeol Rhinol Otol 66 (5), 266-74

Elenbaas B, Dobbelstein M, Roth J, Shenk T, Levine AJ (1996): The mdm2 oncoprotein binds specifically to RNA through its RING finger domain. Mol Med 2, 439-51

Epstein JI, Amin MB, Reuter VR, Mostofi FK (1998): The World Health Organization / International Society of Urological Pathology consensus classification of urothelial (transitional cell) neoplasms of the urinary bladder. Am J Surg Pathol 22, 1435-48

Evans SC, Viswanathan M, Grier JD, Narayana M, El-Naggar AK, Lozano G (2001): An alternatively spliced HDM2 product increases p53 activity by inhibiting HDM2. Oncogene 20, 4041-9

Fakharzadeh SS, Trusko SP, George DL (1991): Tumorigenetic potential associated with enhanced expression of a gene that is amplified in a mouse tumor cell line. EMBO J 10, 1565-9

Fang S, Jensen JP, Ludwig RL, Vousden KH, Weissmann AM (2000): Mdm2 is a RING finger dependent ubiquitin protein ligase for itself and p53. J Biol Chem 275, 8945-51

Finlay CA (1993): The mdm2 oncogene can overcome wild-type p53 suppression of transformed cell growth. Mol Cell Biol 13, 301-6

Fridman JS, Hernando E, Hemann MT, De Stanchina E, Cordon-Cardo C, Lowe SW (2003): Tumor promotion by Mdm2 splice variants unable to bind p53. Cancer Res 63 (18), 5703-6

Fuchs SY, Adler V, Buschmann T, Yin Z, Wu X, Jones SN, Ronai Z (1998): JNK targets p53 ubiquitination and degradation in nonstressed cells. Genes Dev 12, 2658-63

Gall JP et Pardue ML (1969): Formation and detection of RNA-DNA hybrid molecules in cytological preparations. Genetics 63, 378-83

García Mediero JM, Angulo Cuesta J, Luján Galán M, Rodríguez García N, Berenguer Sánchez A (2007) : Smoking habit and superficial bladder tumours' natural history. Actas Urol Esp 31, 349-54

Geyer RK, Yu ZK Maki CG (2000): The mdm2 RING-finger domain is required to promote p53 nuclear export. Nat Cell Biol 9, 569-73

Giglio S, Mancini F, Gentiletti F, Sparaco G, Felicioni L, Barassi F, Martella C, Prodosmo A, Iacovelli S, Buttitta F (2005): Identification of an aberrantly spliced form of HDMX in human tumors: a new mechanism for HDM2 stabilization. Cancer Res 65 (21), 9687-94

Golka K, Rettenmeier AW, Goebell PJ (2006): Ursachen des Harnblasenkrebses und Möglichkeiten der Prävention. Urologe A 45, 346-51

Gordon O, Carel RS, Kordish E (2004): The role of occupational exposures in etiology of bladder cancer. Harefuah 143, 772-4

Groah SL, Weiztenkamp DA, Lammertse DP, Whiteneck GG, Lezotte DC, Hamman RF (2002): Excess risk of bladder cancer in spinal cord injury: evidence for an association

between indwelling catheter use and bladder cancer. Arch Phys Med Rehabil 83 (3), 346-51

Gun RT, Pratt N, Ryan P, Roder D (2006) : Update of mortality and cancer incidence in the Australian petroleum industry cohort. Occup Environ Med 63, 476-81

Habuchi T, Kinospita H, Yamada H, Kakehi Y, Ogawa O, Wu WJ, Takahashi R, Sugiyama T, Yoshida O (1994): Oncogene amplification in urothelial cancers with p53 gene mutation or MDM2 amplification. J Natl Cancer Inst 86, 1331-5

Haines DS, Landers JE, Engle LJ George DL (1994): Physical and functional interaction between wild-type p53 and mdm2 proteins. Mol Cell Biol 14, 1171-8

Hamlin JL, Milbrandt JD, Heintz NH, Azizkhan JC (1984): DNA sequence amplification in mammalian cells. Int Rev Cytol 90, 31-82

Harano H, Wang C, Gao J, Uchida T (1999): p53 tumor suppressor gene mutation and prognosis in 105 cases of bladder cancer - the relationship between mutation of the p53 gene with clinicopathological features and smoking. Nippon Hinyokika Gakkai Zasshi 90 (4), 487-95

Harper ME et Saunders GF (1981): Localization of single copy DNA sequences on G-banded human chromosomes by in situ hybridization. Chromosoma 83, 431-9

Hasui Y, Osada Y, Kitada S, Nishi S (1994): Significance of invasion to the mucosae on the progression of superficial bladder cancer. Urology 43 (6), 782-6

Haupt Y, Maya R, Kazaz A, Oren M (1997): Mdm2 promotes the rapid degradation of p53. Nature 387, 296-9

Hayes RB, Friedell GH, Zahm SH, Cole P (1993): Are the known bladder cancer risk-factors associated with more advanced bladder cancer? Cancer Causes Control 4, 157-62

Hayne D, Arya M, Quinn MJ, Babb PJ, Beacock CJ, Patel HR (2004): Current trends in bladder cancer in England and Wales. J Urol 172 (3), 1051-5

Heighway J, Mitchell ELD, Jones D, White GRM, Santibànez Koref MF (1994): A transcribed polymorphism and sublocalisation of MDM2. Hum Genet 93, 611-2

Hess MJ, Zhan EH, Foo DK, Yalla SV (2003): Bladder cancer in patients with spinal cord injury. J Spinal Cord Med 26 (4): 335-8

Hölzel D, Blasenkarzinom; in: Krebs. Häufigkeiten, Befunde und Behandlungsergebnisse – Perspektiven für die Krebsdiskussion und eine quantitative klinisch-epidemiologische Onkologie aus dem Tumorregister München; hrsg. v. Hölzel D, Klamert A, Schmidt M; Verlag Zuckschwerdt München 1996, 385-98

Holick CN, De Vivo I, Feskanich D, Goivannucci E, Stampfer M, Michaud DS (2005): Intake of fruits and vegetables, carotenoids, folate, and vitamins A, C, E, and risk of bladder cancer among women (US). Cancer Causes Control 16, 1135-45

Holick CN, Giovannucci EL, Stampfer MJ, Michaud DS (2007): Prospective study of body mass index, height, physical activity and incidence of bladder cancer in US men and women. Int J Cancer 120, 140-6

Honda R et Yasuda H (1999): Association of p19ARF with Mdm2 inhibits ubiquitin ligase activity of MDM2 for tumor auppressor p53. EMBO J 18, 22-7

Honda R et Yasuda H (2000): Activity of MDM2, a ubiquitin ligase, toward p53 or itself is dependent on the RING finger domain of the ligase. Oncogene 19 (11), 1473-6

Honda R, Tanaka H, Yasuda H (1997): Oncoprotein mdm2 is a ubiquitin ligase E3 for tumor suppressor p53. FEBS Lett 420, 25-7

Hori MS, Shimazaki J, Inagawa S, Itabashi M, Hori M (2000): Alternatively spliced MDM2 transcripts in human breast cancer in relation to tumor necrosis and lymph node involvement. Pathol Int 50, 786-92

Husgafvel-Pursiainen K, Boffetta P, Kannio A, Nyberg F, Pershagen G, Mukeria A, Constantinescu V, Fortes C, Benhamou S (2000): p53 Mutations and Exposure to Environmental Tobacco Smoke in a Multicenter Study on Lung Cancer. Cancer Res 60, 2906-11

Ioachim E, Charchanti A, Stavropoulos NE, Skopelitou A, Athanassiou ED, Agnantis NJ (2000): Immunhistochemical expression of Retinoblastoma gene product (Rb), p53 protein, mdm2, c-erbB-2, HLA-DR and proliferation indices in human urinary bladder carcinoma. Histol Histopathol 15, 721-7

Jacobs EJ, Henion AK, Briggs PJ, Connell CJ, McCullough ML, Jonas CR, Rodriguez C, Calle EE, Thun MJ (2002): Vitamin C and vitamin E supplement use and bladder cancer mortality in a large cohort of US men and women. Am J Epidemiol 156 (11), 1002-10

Jahnson S, Karlsson MG (2000): Tumor mapping of regional immunostaining for p21, p53, and mdm2 in locally advanced bladder carcinoma. Cancer 89 (3), 619-29

John HA, Birnstiel ML, Jones KW (1969): RNA-DNA hybrids at the cytological level. Nature 223, 582-7

Kälble T (2001): Ätiopathologie, Risikofaktoren, Umwelteinflüsse und Epidemiologie des Harnblasenkarzinoms. Urologe 40, 447-50

Kälble T, Riedasch G, Pomer S, Möhring K (1988): Harnblasentumoren unter Immunsuppression nach Nierentransplantation. Akt Urol 19, 304-9

Kamat AM, Nelkin GM (2005): Atorvastatin: a potential chemopreventive agent in bladder cancer. Urology 66 (6), 1209-12

Kamyshan IS, Klimenko IA, Kirichenko SA Urologiia (2000): Urinary bladder cancer in patients with tuberculous and post-tuberculous cystitis. Urologiia 2, 21-4.

Karl A, Zaak D, Tilki D, Hungerhuber E, Staehler M, Denzinger S, Stanislaus P, Tritschler S, Strittmatter F, Stief C, Burger M (2008): Diagnostik des Harnblasenkarzinomes. Der Urologe 47 (3), 357-67

Kiemeney LA, Straatman H, Witjes JA (1996): Decreasing bladder cancer mortality in The Netherlands. Br J Urol 78, 686-90

Ko LJ et Prives C (1996): p53 : puzzle and paradigm. Genes Dev 10, 1054-72

Korkolopoulou P, Christodoulou P, Kapralos P, Exarchakos M, Bisbiroula A, Hadjiyannakis M, Georgountzos C Thomas-Tsagli E (1997): The role of p53, mdm2 and c-erb B-2 oncoproteins, epidermal growth factor receptor and proliferation markers in the prognosis of urinary bladder cancer. Pathol Res Pract 193, 767-775

Koss LG (1979): Mapping of the urinary bladder: its impact on the concepts of bladder cancer. Hum Pathol 19, 533-48

Kraus A, Neff F, Behn M, Schuermann M, Muenkel K, Schlegel J (1999): Expression of alternatively spliced mdm2 transcripts correlates with stabilized wild type p53 protein in human glioblastoma cells. Int J Cancer 80 (6), 930-4

Kubbutat MGH, Ludwig RL, Levine AJ, Vousden KH (1999): Analysis of the degradation function of Mdm2. Cell Growth Diff 10, 87-92

Kussie PH, Gorina S, Marechal V, Elenbaas B, Moreau J, Levine AJ, Pavletich NP (1996): Structure of the mdm2 oncoprotein bound to the p53 tumor suppressor transactivation domain. Science 274, 948-53

Kvam BM, Romundstad PR, Boffetta P, Andersen A (2005): Cancer in the Norwegian printing industry. Scand J Work Environ Health 31, 36-43

Ladanyi M, Cha C, Lewis R, Jhanwar SC, Huvos AG, Healey JH (1993): MDM2 gene amplification in metastatic osteosarcoma. Cancer Res 53 (1), 16-8

Lai Z, Freedman DA, Levine AJ, McLendon GL (1998): Metal and RNA binding properties of the hdm2 RING finger domain. Biochemistry 37 (48), 17005-15

Landers JE, Haines DS, Strauss JFR, George DL (1994): Enhanced translation: a novel mechanism of mdm2 oncogene overexpression identified in human tumor cells. Oncogene 9, 2745-50

Landers JE, Cassel SL, George DL (1997): Translational enhancement of mdm2 oncogene expression in human tumor cells containing a stabilized wild-type p53 protein. Cancer Res 15, 3562-8

LaRue H, Allard P, Simoneau M, Normand C, Pfister C, Moore L, Meyer F, Têtu B, Fradet Y (2000): P53 point mutations in initial superficial bladder cancer occur only in tumors from current or recent cigarette smokers. Carcinogenesis 21, 101-6

Leach FS, Tokino T, Meltzer P, Burrell M, Oliner JD, Smith S, Hill DE, Sidransky D, Kinzler KW, Vogelstein B (1993): p53 mutation and mdm2 amplification in human soft tissue sarcomas. Cancer Res 53, 2231-4

Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B (1997): Genetic instability in colorectal cancers. Nature 386, 623-7

Lents NH, Wheeler LW, Baldassare JJ, Dynlacht BD (2008): Identification and characterization of a novel Mdm2 splice variant acutely induced by the chemotherapeutic agents adriamycin and actinomycin D. Cell Cycle 7 (11), 1580-6

Levine AJ (1992): The p53 tumor-suppressor gene. N Engl J Med 14, 1350-2

Levine AJ, Momand J, Finlay CA (1991): The p53 tumor suppressor gene. Nature 351, 453-6

Levine AJ, Perry ME, Chang A, Silver A, Dittmer D, Wu M, Welsh D (1994): The 1993 Walter Hubert Lecture: the role of the p53 tumour-suppressor gene in tumorigenesis. Br J Cancer 69 (3), 409-16

Lianes P, Orlow I, Zhang ZF, Oliva MR, Sarkis AS, Reuter VE, Cordon-Cardo C (1994): Altered patterns of MDM2 and TP53 expression in human bladder cancer. J Natl Cancer Inst 86 (17), 1325-30

Lianes P, Orlow I, Zhang ZF, Oliva MR, Sarkis AS, Reuter VE, Cordon-Cardo C (1997): Altered Patterns of MDM2 and TP53 Expression in Human Bladder Cancer. J Nat Canc Inst 86, 1325-30

Lin J, Chen B, Elenbaas B, Levine AJ (1994): Several hydrophobic amino acids in the p53 N-terminal domain are required for transcriptional activation, binding to mdm2 and the adenovirus 5 E1B 55kD protein. Genes Dev 8, 1235-46

Lin J, Spitz MR, Dinney CP, Etzel CJ, Grossman HB, Wu X (2006): Bladder cancer risk as modified by family history and smoking. Cancer 107 (4), 705-11

Litt M et Luty JA (1989): A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. Am J Hum Genet. 44, 397-401

Lohrum MA, Ashcroft M, Kubbutat MH, Vousden KH: Contribution of two independent MDM2-binding domains in p14ARF to p53 stabilization. Curr Biol 10, 539-42

Lonardo F, Ueda T, Huvos AG, Healey J, Ladanyi M (1997): p53 and mdm2 alterations in osteosarkomas. Cancer 79, 1541-7

Lopez JI, Angulo JC (1995): The prognostic significance of vascular invasion in stage T1 bladder cancer. Histopathology 27 (1), 27-33

Lopez-Abente G, Gonzalez CA, Errezola M (1991): Tobacco smoke inhalation pattern, tubacco type and bladder cancer in Spain. Am J Epidemiol 134, 830-9

Lu ML, Wikman F, Orntoft TF, Charytonowicz E, Rabbani F, Zhang Z, Dalbagni G, Pohar KS, Yu G, Cordo-Cardo C. (2002): Impact of alterations affecting the p53 pathway in bladder cancer of clinical outcome, assessed by conventional and array-based methods. Clin Cancer Res 8 (1), 171-9

Lubin JH, Caporaso NE (2006): Cigarette smoking and lung cancer: modeling total exposure and intensity. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 15 (3), 517-23

Ludwig M, Kochel HG, Fischer C, Ringert RH, Weidner W (1996): Human papillomavirus in tissue of bladder and bladder carcinoma specimens. A preliminary study. Eur Urol 30, 96-102

Lukas J, Gao D-Q, Keshmeshian M, Wen W-H, Tsao-Wei D, Rosenberg S, Press MF (2001): Alternative and aberrant messenger RNA splicing of the mdm2 oncogene in invasive breast cancer. Cancer Res 61, 3212-9

Lutzeyer W, Rübben H, Dahm HJ (1982): Prognostic parameters in superficial bladder cancer: an analysis of 315 cases. Urology 127 (2), 250-2

Marcel V, Hainaut P (2009): p53 isoforms – a conspiracy to kidnap p53 tumor suppressor activity? Cell Mol Life Sci 66 (3), 391-406

Marchetti C, Poggi P, Farina A, Gritti A, Scelsi L, Scelsi R (1996): Structure of the initial lymphatics of the human urinary bladder with invasive urothelial tumors. Lymphology 29 (3),118-25

Marechal V, Elenbaas B, Piette J, Nicolas JC, Levine AJ (1994): The ribosomal L5 protein is associated with mdm-2 and mdm-2-p53 complexes. Mol Cell Biol 14 (11), 7414-20

Martin K, Trouche D, Hagemeier C, Sorensen TS, Thangue NBL, Kouzarides T (1995): Stimulation of E2F/DP1 transcriptional activity by MDM2 oncoprotein. Nature 375, 691-4

Mastrangelo G, Fedeli U, Fadda E, Milan G, Lange JH (2002): Epidemiologic evidence of cancer risk in textile industry workers: a review and update. Toxicol Ind Health 18, 171-81

Matsumoto R, Tada M, Nozaki M, Zhang C-L, Sawamura Y, Abe H (1998): Short alternative splice transcripts of the mdm2 oncogene correlate to malignancy in human astrocytic neoplasms. Cancer Res 58, 609-13

Matsumura T, Yoshihama Y, Kimura T, Shintani S, Alcalde RE (1996): p53 and MDM2 expression in oral squamous cell carcinoma. Oncology 53, 308-12

McCredie M, Stewart JH, Ford JM, McLennan RA (1983): Phenacetin containing analgesics and cancer of the bladder or renal pelvis in women. Br J Urol 55, 220-4

Meddeb M, Valent A, Danglot G, Nguyen VC, Duverger A, Fouquet F, Terrier-Lacombe MJ, Oberlin O, Bernheim A (1996): MDM2 amplification in a primary alveolar rhabdomyosarcoma displaying a t(2;13)(q35;q14). Cytogenet Cell Genet 73, 325-30

Melamed MR, Voutsa NG, Grabstald H (1964): Natural history and clinical behaviour of in situ carcinoma of the human urinary bladder. Cancer 17: 1533-45

Michaud DS, Pietinen P, Taylor PR, Virtanen M, Virtamo J, Albanes D (2002): Intakes of fruits and vegetables, carotenoids and vitamins A, E, C in relation to the risk of bladder cancer in the ATBC cohort study. Br J Cancer 21 (9), 960-5

Michaud DS, Holick CN, Giovannucci E, Stampfer MJ (2006): Meat intake and bladder cancer risk in 2 prospective cohort studies. Am J Clin Nutr 84, 1177-83

Michaud DS, Platz EA, Giovannucci E (2007): Gonorrhoea and male bladder cancer in a prospective study. Br J Cancer 96, 169-71

Micheli A, Mariotto A, Giorgi Rossi A, Gatta G, Muti P (1998): The prognostic role of gender in survival of adult cancer patients. Eur J Cancer 34 (14), 2271-8

Midgley CA, Desterro JM, Saville MK, Howard S, Sparks A, Hay RT, Lane DP (2000): An N-terminal p14ARF peptide blocks Mdm2-dependent ubiquitination in vitro and can activate p53 in vitro. Oncogene 19, 2312-23

Mitchell EL, White GR, Santibanez-Koref MF, Varley JM, Heighway J (1995): Mapping of gene loci in the Q13-Q15 region of chromosome 12. Chromosome Res 3 (4), 261-2

Miyajima K, Tamiya S, Oda Y, Adachi T, Konomoto T, Toyoshiba H, Masuda K, Tsuneyoshi M (2001): Relative quantitation of p53 and mdm2 gene expression in leiomyosarcoma; a real-time semi-quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction. Cancer Lett 164 (2), 177-88

Mohseni M, Zand S, Aghamir S (2004): Effect of smoking on prognosis factors of transitional cell carcinoma of the bladder. Urol J 1, 250-2

Momand J, Zambetti GP, Olson DC, George D, Levine AJ (1992): The mdm2 oncogene product forms a complex with the p53 protein and inhibits p53-mediated transactivation. Cell 69, 1237-45

Momand M, Jung D, Wilczynski S, Niland J (1998): The mdm2 gene amplification database. Nucleic Acids Res 26, 3453-9

Mostofi FK, Sobin LH, Torloni H: Histologic typing of bladder tumors. In: World Health Organization international histologic classification of tumours. Springer Geneva 1973, 37-51

Moulin JJ, Clavel T, Buclez B, Laffitte-Rigaud G (2000): A mortality study among workers in a French aluminium reduction plant. Int Arch Occup Environ Health 73, 323-30

Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H (1986): Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. Cold Spring Harb Symp Quant Biol 51, 263-73

Muto S, Horie S, Takahashi S, Tomita K, Kitamura T (2000): Genetic and epigenetic alterations in normal bladder epithelium in patients with metachronous bladder cancer. Cancer Res 60, 4021-5

Oliner JD, Kinzler KW, Meltzer PS, George DL, Vogelstein B (1992): Amplification of a gene encoding a p53-associated protein in human sarcomas. Nature 358, 80-3

Oliner JD, Pietenpol JA, Thiegalingam S, Gyuris J, Kinzler KW, Vogelstein B (1993): Oncoprotein MDM2 conceals the activation domain of tumour suppressor p53. Nature 362, 857-60

Olson D, Marechal V, Momand J, Chen J, Romocki C, Levine AJ (1993): Identification and characterization of multiple mdm2 proteins and mdm2 p53 protein complexes. Oncogene 8, 2353-60

Otto A, Deppert W (1993): Upregulation of mdm-2 expression in Meth A tumor cells tolerating wild-type p53. Oncogene 8, 2591-603

Park BJ, Lee SJ, Kim LI, Lee SJ, Lee CH, Chang SG, Park JH, Chi SG (2000): Frequent alteration of p63 expression in human primary bladder carcinomas. Cancer Res 60 (13), 3370-4

Parkin DM (2008): The global burden of urinary bladder cancer. Scand J Urol Suppl 218, 12-20

Parsons JT, Parsons SJ: Protein-tyrosine kinases, oncogenes and cancer; in: Important advances in oncology; DeVita VT, Hellman S, Rosenberg SA (eds); Lippincott, Philadelphia 1993; 3-17

Pedersen-Bjergaard J, Ersboll J, Hansen VL (1988): Carcinoma of the urinary bladder after treatment with cyclophosphamid for non Hodgkin's lymphoma. N Engl J Med 318, 1028-32

Pelucchi C, La Vecchia C, Negri E, Dal Maso L, Franceschi S (2002): Smoking and other risk factors for bladder cancer in women. Prev Med 35, 114-20

Pelucchi C, Bosetti C, Negri E, Malvezzi M, La Vecchia C (2006): Mechanismus of disease: The epidemiology of bladder cancer. Nat Clin Pract Urol 3, 327-40

Picksley SM, Lane DP (1993): The p53-mdm2 autoregulatory feedback loop: a paradigm for the regulation of growth control by p53? Bioessays 15, 689-90

Piette J, Neel H, Marèchal V (1997): Mdm2 keeping p53 under control. Oncogene 15, 1001-10

Ponder BA, Wilkinson MM (1981): Inhibition of endogenous tissue alkaline phosphatase with the use of alkaline phosphatase conjugates in immunohistochemistry. J Histochem Cytochem 29, 981-4

Poremba C, Yandell DW, Metze D, Kamanabrou D, Bocker W, Dockhorn-Dworniczak B (1995): Immunohistochemical detection of p53 in melanomas with rare p53 gene mutations is associated with mdm-2 overexpression. Oncol Res 1995 7 (7-8), 331-9

Primdahl H, von der Maase H, Christensen M, Wolf H, Orntoft TF (2000): Allelic deletions of cell growth regulators during progression of bladder cancer. Cancer Res 60 (23), 6623-9

Puente D, Hartge P, Greiser E, Cantor KP, King WD, González CA, Cordier S, Vineis P, Lynge E, Chang-Claude J (2006): A pooled analysis of bladder cancer case-control studies evaluating smoking in men and women. Cancer Causes Control 17, 71-9

Quentin T, Henke C, Korabiowska M, Schlott T, Zimmerman B, Kunze E (2004): Altered mRNA expression of the Rb and p16 tumor suppressor genes and of CDK4 in transitional cell carcinomas of the urinary bladder associated with tumor progression. Anticancer Res 24, 1011-23

Radosavljevic V, Jankovic S, Markovic-Denic Lj (2001): Risk factors for urinary bladder cancer. Srp Arh Celok Lek 129, 180-2

Radovanovic Z, Krajinovic S (1979): The Balkan endemic nephropathy and urinary tract tumors. Arch Geschwulstforsch 49, 444-7

Raitanen MP, Nieminen P, Tammela TL (1995): Impact of tumour grade, stage, number and size, and smoking and sex, on survival in patients with transitional cell carcinoma of the bladder. Br J Urol 76, 470-4

Randi G, Pelucchi C, Negri E, Talamini R, Galeone C, Franceschi S, La Vecchia C (2007): Family history of urogenital cancers in patients with bladder, renal cell and prostate cancers. Int J Cancer 121, 2748-52

Ratnasinghe LD, Graubard BI, Kahle L, Tangrea JA, Taylor PR, Hawk E (2004): Aspirin use and mortality from cancer in a prospective cohort study. Anticancer Res 24 (5B), 3177-84

Rehn L (1895): Blasengeschwülste bei Fuchsin-Arbeitern. Arch Klin Chir 50, 588-600

Reifenberger G, Liu L, Ichimura K, Schmidt EE, Collins VP (1993): Amplification and overexpression of the mdm2 gene in a subset of human malignant gliomas without p53 mutations. Cancer Res 53, 2736-9

Reifenberger G, Ichimura K, Reifenberger J, Elkahloun AG, Meltzer PS, Collins VP (1996): Refined mapping of 12q13-q15 amplicons in human malignant gliomas suggests CDK4/SAS and MDM2 as independent amplification targets. Cancer Res 56 (22), 5141-5

Rolland E, Bitker MO, Richard F (2007): Radiation-induced tumours after irradiation for localized prostate cancer: review and proposals for long-term follow-up. Prog Urol 17 (7), 1302-4

Roth J, Dobbelstein M, Freedman DA, Shenk T, Levine AJ (1998): Nucleo-cytoplasmic shuttling of the mdm2 oncoprotein regulates the levels of the p53 protein via a pathway used by the human immunodeficiency virus rev protein. EMBO J 17, 554-64

Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA (1988): Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. Science 239, 487-91

Sanger F, Nicklen S, Coulson AR (1977): DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proc Natl Acad Sci USA 74, 5463-7

Sauter G, Algaba F, Amin MB, Busch C, Cheville J, Gasser T, Grignon DJ, Hofstadter F, Lopez-Beltran A, Epstein JI: Tumors of the urinary system: Non-invasive urothelial tumours; in: WHO Classification of Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs: eds. Eble JN, Sauter G, Epstein JI, Sesterhenn IA; IARC Press Lyon, 2004, 110-117

Schimke RT (1984): Gene amplification in cultured animal cells. Cell 37, 705-13

Schlott T., Reimer S, Jahns A, Ohlenbusch A, Ruschenburg I, Nagel H, Droese M (1997): Point mutations and nucleotide insertions in the mdm2 zinc finger structure of human tumors. J Pathol 182, 54-61

Schlott T, Quentin T, Korabiowska M, Budd B, Kunze E (2004): Alteration of the MDM2-p73-p14ARF pathway related to tumour progression during urinary bladder carcinogenesis. Int J Mol Med 14, 825-36

Schöffski P, Dunst J, Höltl W, Schmoll HJ: Harnblasenkarzinom; in: Kompendium Internistische Onkologie; hrsg. v. Schmoll HJ, Höffken K, Possinger K; Band II; Springer Verlag Heidelberg 2006, 4977-5018

Serra C, Bonfill X, Sunyer J, Urrutia G, Turuguet D, Bastús R, Roqué F, 't Mannetje A, Kogevinas M (2000): Bladder cancer in the textile industry. Scand J Work Environ Health 26 (6), 476-81

Shiina H, Igawa M, Shigeno K, Yamasaki Y, Urakami S, Yoneda T, Wada Y, Honda S, Nagasaki M (1999): Clinical significance of mdm2 and p53 expression in bladder cancer. A comparison with cell proliferation and apoptosis. Oncology 56, 239-47

Sigalas I, Calvert AH, Anderson JJ, Neal DE, Lunec J (1996): Alternatively spliced mdm2 transcripts with loss of p53 binding domain sequences: transformation ability and frequent detection in human cancer. Nat Med 2, 912-7

Simon R, Struckmann K, Schraml P, Wagner U, Forster T, Moch H, Fijan A, Bruderer J, Wilber K, Mihatsch MJ, Gasser T, Sauter G (2002): Amplification pattern of 12q13-q15 genes (MDM2, CDK4, GLI) in urinary bladder cancer. Oncogene 21 (16), 2476-83

Slattery ML, Schumacher MC, West DW, Robinson LM (1988): Smoking and bladder cancer. Cancer 61, 402-8

Sobin DH et Wittekind C: TNM classification of malignant tumours. 6th ed; Wiley-Liss, New York 2002

Stark GR et Wahl GM (1984): Gene amplification. Annu Rev Biochem 53, 447-91

Steenland K, Palu S (1999): Cohort mortality study of 57,000 painters and other union members: a 15 year update. Occup Environ Med 56 (5), 315-21

Steinman HA, Burstein E, Lengner C, Gosselin J, Pihan G, Duckett CS, Jones SN 2004: An Alternative Splice Form of Mdm2 Induces p53-independent Cell Growth and Tumorigenesis. J Biol Chem 279 (6), 4877–86

Stoehr R et Hartmann A (2007): Histopathologie und Molekulargenetik des Harnblasenkarzinoms. Onkologe 12, 1058-66

Störkel S: Typing, Grading und Staging beim Harnblasenkarzinom: Pathomorphologische Parameter und deren Bedeutung für die Klinik; in: Blasenkarzinom; hrsg. v. Lehmann J, Retz M, Stöckle M; Springer Verlag, Berlin 2005, 1-10

Sturgeon SR, Hartge P, Silverman DT, Kantor AF, Linehan WM, Lynch C, Hoover RN (1994): Associations between bladder cancer risk factors and tumor stage and grade at diagnosis. Epidemiology 5 (2), 218-25

Tamborini E, Della Torre G, Lavarino C, Azzelli A, Carpinelli P, Pierotti MA, Pilotti S (2001): Analysis of the molecular species generated by MDM2 gene amplification in liposarkomas. Int J Cancer 92, 790-6

Taubert H, Schuster K, Brinck U, Bartel F, Kappler M, Lautenschläger C, Bache M, Trump C, Schmidt H, Holzhausen HJ, Würl P, Schlott T (2003): Loss of heterozygosity at 12q14-15 often occurs in stage I soft tissue sarcomas and is associated wirth mdm2 amplification in tumors at various stages. Mod Pathol 16 (11), 1109-16

Tautz D (1989): Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. Nucleic Acids Res 25, 6463-71

Tawfik NH (1987): Carcinoma of the urinary bladder associated with schistosomiasis in Egypt: the possible causal relationship. Princess Takamatus Symp 18, 197-209

Thörn M, Bergström R, Johannson AM, Ramström L, Persson I, Malmström PU (1997): Trends in urinary bladder cancer in Sweden 1960-93 with special reference to histopathology, time period, birth cohort and smoking. Cancer Causes Control 8, 560-7

Tuna B, Yörükoğlu K, Tüzel E, Güray M (2003): Expression of p53 and mdm2 and their significance in recurrence of superficial bladder cancer. Pathol Res Pract 199 (5), 323-8

Uchida T, Minei S, Gao JP, Wang C, Satoh T, Baba S (2002): Clinical significance of p53, mdm2 and bcl-2 expression in transitional cell carcinoma of the bladder. Oncol Rep 2, 253-9

Ugnat AM, Luo W, Semenciw R, Mao Y (2004): Occupational exposure to chemical and petrochemical industries. Chronic Dis Can 25, 7-15

Viscoli CM, Lachs MS, Horwitz RI (1993): Bladder cancer and coffee drinking: a summary of case control research. Lancet 341, 1432-7

Walker AR, Walker BF, Segal I (1994): Schistosomiasis and malignancy. S Afr Med J 84, 211-5

Wallerand H, Bakkar AA, de Medina SG, Pairon JC, Yang YC, Vordos D, Bittard H, Fauconnet S, Kouyoumdjian JC, Jaurand MC (2005): Mutations in TP53, but not FGFR3, in urothelial cell carcinoma of bladder are influenced by smoking: contribution of exogenous versus endogenous carcinogens. Carcinogenesis 26, 177-84

Watanabe T, Hotta T, Ichikawa A, Kinoshita T, Nagai H, Uchida T, Murate R, Saito H (1994): The mdm2 oncogene overexpression in chronic lymphocytic leukemia and low-grade lymphoma of B-cell origin. Blood 84, 3158-65

Weber JL, May PE (1989): Abundant class of human DNA polymorphisms which can be typed using the polymerase chain reaction. Am J Hum Genet 44, 388-96

Weng MW, Lai JC, Hsu CP, Yu KY, Chen CY, Lin TS, Lai WW, Lee H, Ko JL (2005): Alternative splicing of MDM2 mRNA in lung carcinomas and lung cell lines. Environ Mol Mutagen 46 (1), 1-11

Wu X, Bayle JH, Olson D, Levine AJ (1993): The p53-mdm2 autoregulatory feedback loop. Genes Dev 7, 1126-36

Xiao ZX, Chen J, Levine AJ, Modjtahedi N, Xing J, Sellers WR, Livingston DM (1995): Interaction between the retinoblastoma protein and the oncoprotein MDM2. Nature 375, 694-8

Yamaguchi N, Watanabe S, Okubo T, Takahashi K (1991): Work-related bladder cancer risks in male Japanese workers: estimation of attributable fraction and geographical correlation analysis. Jpn J Cancer Res 82, 624-31

Danksagung

Zunächst danke ich den Patienten, die durch ihr Einverständnis und ihre aktive Teilnahme diese Arbeit ermöglicht haben.

Herrn Prof. Dr. rer. nat. Thilo Schlott, ehem. Abteilung Zytopathologie im Zentrum Pathologie der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen, danke ich für die Überlassung des Themas der Arbeit sowie für wertvolle Anregungen und Herrn Prof. Dr. med. Manfred Droese, Direktor der ehem. Abteilung Zytopathologie, für die wissenschaftliche Unterstützung.

Weiterhin danke ich Herrn Prof. Dr. med. Ekkehard Kunze, ehem. Direktor der Abteilung Osteopathologie und Hämatopathologie, für die Validierung der immunhistochemischen Befunde und Supervision der epidemiologischen Analyse.

Mein besonderer Dank gilt darüber hinaus Frau Andrea Kubitz sowie Herrn Dr. rer. nat. Thomas Quentin für wertvolle technische Anregungen und Hinweise und die fachliche Begleitung.

Den Kolleginnen und Kollegen meiner Arbeitsgruppe, namentlich Frau Nadine Käthe, Frau Friederike Jäckel und Herrn Christian Henke, danke ich für die fruchtbare Zusammenarbeit und angenehme Arbeitsatmosphäre.

Für die finanzielle Unterstützung danke ich der Else-Kröner-Fresenius-Stiftung Bad Homburg.

Cottbus im Dezember 2009 Matthias D. Woitow

Lebenslauf

Am 14. Januar 1975 wurde ich als erstes Kind von Herrn Karl-Heinz Woitow und Frau Jutta Woitow, geb. Friedrich, in Cottbus geboren.
In den Jahren 1981 bis 1991 besuchte ich die Polytechnische Oberschule in Kolkwitz. Das Abitur legte ich am Ersten Gymnasium Cottbus (Teil der Erweiterten Oberschule) im Jahr 1993 ab.
Nach Leisten meines Zivildienstes am Carl-Thiem-Klinikum Cottbus 1993/ 94 nahm ich das Studium der Psychologie an der Technischen Universität Dresden auf. Nach dem erfolgreichen Ablegen des Vordiploms wechselte ich zum Sommersemester 1998 zum Studium der Medizin an die Georg-August-Universität Göttingen. Zwei Tertiale meines Praktischen Jahres (Pädiatrie und Chirurgie) leistete ich am Klinikum Oldenburg, das Tertial Innere Medizin in Lachen, Schweiz. Parallel zum Studium arbeitete ich über etwa fünf Jahre im Evangelischen Krankenhaus Weende in den Abteilungen für Pneumologie bzw. Internistische Intensivmedizin
Im November 2004 schloss ich das Medizinstudium mit dem dritten Staatsexamen ab und erhielt meine Approbation.
Im März 2005 begann ich meine Tätigkeit als Arzt in Weiterbildung zunächst im Klinikum Riesa-Großenhain in der Inneren Klinik (CA Dr. med. W. Reichel). In der Folge arbeitete ich in der Neurologischen Klinik Weimar (CA PD Dr. med. R. Malessa). Seit Februar 2009 setze ich meine Weiterbildung in der Medizinischen Klinik III des Carl-Thiem-Klinikums Cottbus (CA Dr. med. M. Prediger) fort.