

Für meine Familie

Aus dem Bereich Humanmedizin  
Institut für experimentelle Urologie der Medizinischen Fakultät  
der Universität des Saarlandes, Homburg/Saar

**Funktionelle Charakterisierung genetisch aberranter  
Karzinomzellen bei Primärkulturen von fortgeschrittenen  
Harnblasen-Karzinomen**

Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
**der Medizinischen Fakultät**  
der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

2011



vorgelegt von: Bassem Irscheid  
geb. am: 25.11.1979 in Saarbrücken

## ZUSAMMENFASSUNG

Die radikale Cystektomie ist die Therapie der Wahl bei Patienten mit muskel-invasiv wachsendem Harnblasentumor. Trotz Optimierung der OP-Techniken und der Nachsorge beträgt die 5-Jahre-Überlebensrate beim muskel-invasiven Harnblasenkarzinom je nach Stadium 30 bis 55%. Im Falle einer Metastasierung liegt die mittlere Überlebensrate nach Diagnosestellung sogar bei nur einem Jahr. Für das Therapieversagen sind wahrscheinlich Tumorzellen verantwortlich, die einer lokalen Therapie nicht zugänglich sind und auch nicht immer durch aggressive systemische Chemotherapien behandelbar sind. Die Charakterisierung individueller Tumorzellen sowie die Erfassung von Markern, welche letztendlich das Patientenschicksal bestimmen, gehören nach wie vor zu den größten Herausforderungen in der Tumorforschung. Als Marker für fortgeschrittene Tumore gelten u.a. numerische chromosomale Aberrationen. Die Bestimmung der DNA-Ploidie mittels FISH an histologischen Präparaten ermöglicht zwar die Detektion von Aneuploidien, aber diese Methode ist ungenügend, um Informationen über Tumorentstehung und Tumorprogression der individuellen Tumorzellen zu gewinnen. Auch die Untersuchung von permanenten Zelllinien des Harnblasenkarzinoms erlaubt keine individuelle Aussage über das biologische Verhalten der Tumorzellen und deren mögliche Korrelation zu Aneuploidien: permanente Zelllinien entsprechen phänotypisch sowie genotypisch nicht mehr den Ursprungstumoren und ihr biologisches Verhalten ist ebenfalls verändert. In meiner Arbeit wurde die zytogenetische Charakterisierung mittels FISH der Chromosome 7, 8, 9, 17 und Y von Epithelzellen aus Primärkultur fortgeschrittener Harnblasentumore und normaler Mukosa durchgeführt. Aneuploidien dieser Chromosome stehen in der Literatur in engem Zusammenhang mit invasivem Wachstum. Das Primärmaterial hierzu wurde aus frischen Zystektomiepräparaten gewonnen. Signifikante Aneuploidien, über 73% der Tumorfälle, konnten nachgewiesen werden. Diese korrelierten häufig mit fortgeschrittenem Stadium und Grad der untersuchten Tumore. In einem Invasionsmodell konnten invasiv wachsende Zellen aus den kultivierten Primärkulturen selektiert werden, die funktionelle Charakterisierung dieser Tumorzellpopulationen zeigte polysome Zellklone des Chromosoms 8. Der Nachweis einer Polysomie 8 würde eine prognostische Aussage erlauben und eine therapeutische Konsequenz in Behandlung und Nachsorge für den einzelnen Patienten bedeuten. Andersrum bestünde die Möglichkeit, Patienten mit unauffälligen Befunden aus dem Patientengut auszuwählen, und somit bei diesen ein „overtreatment“ zu verhindern. Das hier vorgestellte patientennahe Modell wäre auch die Grundlage für neuartiges 3D-Zellkulturmodell mit der Möglichkeit die selektierten Zellen weiterzukultivieren und weiterführende funktionelle Untersuchungen - functional genomics- durchzuführen.

## **Functional characterization of genetically aberrant cells in the primary cell culture of advanced bladder carcinomas.**

The radical cystectomy is the therapy of choice for muscle invasive bladder cancer.

In spite of advanced operative techniques, chemotherapies and x-ray-therapy the 5 years survival rate of the muscle invasive bladder carcinoma is still up to 30-50%, in case of metastasis the prognosis is even worse. Occult tumour cells are assumed to be responsible for therapy failure, they seem not to be accessible to local therapy or aggressive chemotherapies. The characterization of the individual tumor cells and the detection of markers, which determine the prognosis of the patient, are still the greatest challenges of the oncological research and medicine. Numerical chromosomal aberrations are known to be markers of high grade transitional cell carcinomas. DNA-changes in histological probes can be detected with FISH (fluorescent in situ hybridization), but important clinical information about genesis and progression of individual tumour cells can not be obtained. Experiments on permanent cell lines do not allow statements about biological functions of the individual tumour: permanent cell lines are often different than the original cancer regarding phenotype, genotype and their biological behaviour. In our study we performed the genetic characterization on primary cell cultures of high grade TCCs and their correspondent normal urothelium with FISH of chromosomes 7, 8, 9, 17 and Y. Many studies showed that these chromosomes are highly correlated to tumour progression and recurrence. We used tissue from radical cystectomies for the primary cell cultures. Results have shown significant aneuploidies in the advanced tumours (73% primary cell culture of tumour tissue vs 20% primary cell culture of normal urothelium tissue). Secondly we were able to select, within cells resulting from primary cell cultures, polysome tumour cell populations in an invasion model. These cells showed a polysomy of chromosome 8. This individual model of invasion could be the basis for a new 3D-cell culture model with the possibility to cultivate selected cells that can be used for further functional experiments. The detection of polysomy 8 in the early stage of the cancer would allow a prognostic statement of the individual tumour and would consequently determine therapy and follow-up. It could be also possible to spare overtreatment to patients with negative results. This individual model of invasion could be the basis for a new 3D-cell culture model with the possibility to cultivate selected tumour cells that can be used for further functional experiments.

# INHALTSVERZEICHNIS

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG</b>	<b>1</b>
1.1	DAS HARNBLASENKARZINOM	1
1.1.1	Definition	1
1.1.2	Epidemiologie	1
1.1.3	Ätiologie	1
1.1.4	Pathogenese	3
1.1.5	Histologie	4
1.1.6	Stadieneinteilung des Harnblasenkarzinoms	4
1.1.7	Therapie	6
1.1.8	Symptome	8
1.1.9	Diagnostik	8
<b>1.2</b>	<b>ZIEL DER ARBEIT</b>	<b>12</b>
<b>2</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>16</b>
<b>2.1</b>	<b>PROBENGEWINNUNG</b>	<b>16</b>
2.1.1	Zellkulturmedien	17
2.1.2	Primärkultur	18
2.1.3	Zellzählung	19
2.1.4	Die mikroskopische Dokumentation der Zelle	20
2.1.5	Immunfärbung	21
2.1.6	Kokultivierungssystem für das Harnblasenkarzinom	22
2.1.7	In-vitro-Invasionsmodell für das Harnblasenkarzinom	23
2.1.8	Beschichten mit Kollagen von Membraneinsätzen	24
2.1.9	Propidiumjodidfärbung	25
<b>2.2</b>	<b>FLUORESZENZ IN SITU HYBRIDISIERUNG</b>	<b>25</b>
2.2.1	Prinzip	25
2.2.2	Plasmidisolation	26
2.2.3	Gelelektrophoretische Auftrennung von Nukleinsäuren	26
2.2.4	Nichtradioaktive Markierung der DNA-Sonde (Nick-Translation)	26
2.2.5	Fällung der markierten DNA	27
2.2.6	Dot-Blot	27
2.2.7	Spezifität der DNA-Sonden	28
2.2.8	FISH an Harnblasenzellen (am Beispiel der 2-kammrigen culturslides)	29
2.2.9	Stringenzwaschung und Detektion	30
2.2.10	FISH an Lymphozyten	31
2.2.11	FISH an Matrigel beschichteten Fluoroblock Invasion chamber mit 8 c-myc	32
2.2.12	FISH an 6-well-Insert mit Stückchenkultur	33
2.2.13	Auswertung der FISH	33

<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>35</b>
<b>3.1</b>	<b>UNTERSUCHTES MATERIAL</b>	<b>42</b>
<b>3.2</b>	<b>ZELLKULTUR</b>	<b>36</b>
<b>3.3</b>	<b>IMMUNZYTOCHEMIE</b>	<b>38</b>
<b>3.4</b>	<b>FLUORESZENZ IN SITU HYBRIDISIERUNG</b>	<b>40</b>
3.4.1	FISH Ergebnisse – Darstellung aller Fälle (Objekträger)	40
3.4.2	Invasionsmodell Fluoroblock/ Matrigel.	54
3.4.3	Vergleiche in 5 Fällen mittels FISH und CGH an Paraffin und Kryomaterial .	59
3.4.4	Follow up der Patienten	61
<b>4</b>	<b>DISKUSSION</b>	<b>62</b>
<b>4.1</b>	<b>ZIEL DER VORLIEGENDEN ARBEIT</b>	<b>62</b>
<b>4.2</b>	<b>ZELLKULTUR</b>	<b>65</b>
<b>4.3</b>	<b>FLUORESZENZ IN SITU HYBRIDISIERUNG</b>	<b>71</b>
4.3.1	Grenzen der FISH	72
4.3.2	Mögliche Ursache für die Fehlinterpretation der FISH-Signale	73
4.3.3	Chromosomenveränderungen bei der Zellkultur des Harnblasenkarzinoms	74
4.3.4	Invasionsmodell	86
4.3.5	FISH an makroskopisch normalem Urothelgewebe	91
<b>4.4</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>94</b>
<b>5</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>98</b>
<b>6</b>	<b>ANHANG mit Auswertungstabellen, Veröffentlichung, Danksagung und Lebenslauf</b>	<b>112</b>

# 1 EINLEITUNG

## 1.1 Das Harnblasenkarzinom

### 1.1.1 Definition

Harnblasenkarzinome sind in über 95% der Fälle Urothelkarzinome. Sie gehen vom Übergangsepithel aus und können in rein papillärer oder in prädominant solider Form auftreten. Plattenepithelkarzinome, Adenokarzinome und Urachuskarzinome sind sehr selten.

### 1.1.2 Epidemiologie

Das Harnblasenkarzinom macht etwa 3% aller bösartigen Tumoren aus. Das Urothelkarzinom der Harnblase ist die vierthäufigste Tumorerkrankung bei Männern, insgesamt sind Männer dreimal so häufig betroffen wie Frauen. In Deutschland werden zur Zeit 30 Neuerkrankungen pro 100 000 Einwohner beobachtet, dies entspricht 15700 neuen Fällen im Jahr. Die Mortalität liegt bei 5000 pro Jahr in Deutschland (USA: 52000 Neuerkrankungen/Jahr, Mortalität 12000/Jahr: Sternberg et al., 2000). Laut WHO verstarben im Jahr 2000 weltweit 132432 Personen an einem Harnblasenkarzinom.

Das Auftreten ist altersabhängig: Erwachsene sind im 5-6 Lebensjahrzehnt am häufigsten betroffen. Patienten unter 45 Jahren erkranken nur sehr selten. Die Inzidenz des Harnblasenkarzinoms ist in industrialisierten Ländern höher als in ländlichen Regionen. Zwischen den Jahren 1939 und 1971 stieg die Inzidenz um 50% an. Dies wird mit einer Zunahme des Kontaktes mit krebserregenden Substanzen in Zusammenhang gebracht. Die Mortalität hingegen hat dank verbesserter Operationstechniken sowie wirksamer lokaler und systemischer Therapieformen in den letzten zwei Jahrzehnten abgenommen.

### 1.1.3 Ätiologie

Die Kausalität zwischen Kanzerogenexposition und Entstehung des Harnblasenkarzinoms ist wie kaum bei einem anderen urologischen Tumor untersucht und erkannt worden. Der Nikotinabusus ist der für die Allgemeinbevölkerung mit Abstand wichtigste Risikofaktor für das Harnblasenkarzinom (Bernardini et al., 2001, International Agency for Research on Cancer, 2004). Auch wenn die in zahlreichen Studien ermittelten Harnblasenkarzinomrisiken schwanken, bleibt unumstritten, dass starke Raucher ein höheres Risiko tragen als weniger starke Raucher (Brennan et al., 2000; 2001).

Der wichtigste berufliche Risikofaktor für die Entstehung von Harnblasenkarzinomen ist die Exposition gegenüber Krebs erzeugende aromatische Amine und Nitrosamine.

Hervorzuheben sind insbesondere Benzidin,  $\beta$ -Naphthylamin, 4-Aminobiphenyl und 4-Chlor-o-toluidin. Betroffen sind die Berufe in der chemischen Industrie, Farbindustrie, gummiverarbeitenden Industrie, Aluminiumindustrie und Textilindustrie, aber auch in Kokereien und im Bergbau sowie in der Druckindustrie. Wenn die Expositionsdauer, der intensive Kontakt und die Histologie übereinstimmen, ist – selbst bei Rauchern – von einem << Berufskarzinom >> auszugehen. Die Liste >> 1301 << der Berufsgenossenschaften umfasst die auslösenden Stoffe. In zwei grundlegenden Arbeiten zur Ätiologie von Krebserkrankungen wird der Anteil beruflich bedingter Harnblasenkarzinome bei Männern auf 10% und bei Frauen auf 5 % geschätzt (Doll et al., 1981; Colditz et al., 1996). Die von 1978 bis 2003 als Berufskrankheiten anerkannten 1200 Fälle von Harnblasenkarzinomen repräsentieren demnach nur einen Bruchteil der durch berufliche Noxen hervorgerufenen Erkrankungen (Hauptverband der gewerblichen Berufsgenossenschaften, 2005). Neben unerkannten Belastungen am Arbeitsplatz sind sicherlich auch unzureichende Erhebungen der Arbeitsanamnese dafür verantwortlich. Diese sollte bei allen Urothelkarzinomen auch im Hinblick auf die Latenzzeit beruflicher Urothelkarzinomen, im Allgemeinen von 10 bis 40 Jahren, besonders gründlich erhoben werden.

Neben den chemischen Noxen können auch physikalische Einwirkungen wie Traumen und chronischen Infektionen einen Blasentumor induzieren. Hierbei ist besonders die Blasenbilharziose hervorzuheben, welche durch permanente Gewebereizung in Form von Fibrosen, Nekrosen und Geschwüren in manchen Tropengebieten die Entstehung von Blasenkrebs begünstigt (Kantor et al., 1984; IARC Monogr Eval Carcinog Risks Human, 1994; Chitsulo et al, 2004).

Therapiebedingte (iatrogen) Risiken für die Entstehung eines Harnblasenkarzinoms sind Cyclophosphamid als Stickstoff-Lost-Phosphamidester und zytostatisch wirksame alkylierende Substanz (Travis et al., 1995), Strahlentherapie im kleinen Becken besonders beim Cervixkarzinom (Boice et al., 1985) und die Harnableitung mit Dauerkatheter bei Querschnittslähmung.

Aktuell werden auch umweltbedingte Risiken diskutiert. Die Bevölkerung in Großstädten mit hoher Industriedichte scheint stärker betroffen zu sein, weil diese im Vergleich zur ländlichen Bevölkerung ein höheres Harnblasenkarzinomrisiko aufweist (Claude et al., 1988; Olsen et al., 1987; Pesch et al., 1994; Zingg et al., 1985). Das Trinkwasser trägt möglicherweise auch zur Entwicklung von Krebs bei (Goebell et al., 2004). Ursächlich werden die Nebenprodukte der Trinkwasserchlorierung des Trinkwassers (Dunnick et al., 1993; IARC, ed. WHO 1991; Komulainen et al., 1997) und dessen Ozonbehandlung (Thomas EL et al., 1987; Kurokawa

et al., 1983) angeschuldigt. Nach einer 2003 veröffentlichten Studie ist das Harnblasenkarzinomrisiko beim Konsum chlorierten Trinkwassers bei beiden Geschlechtern um etwa 1,2-fache höher als das mittlere Risiko der Allgemeinbevölkerung (Villanueva et al., 2003).

Auch geologisch bedingte hohe Arsenbelastungen des Trinkwassers können das Harnblasenkrebsrisiko erhöhen (Chen et al., 2003; Chiou et al., 2001). Dem im Trinkwasser enthaltene Nitrat wird auch ein gewisses kanzerogenes Potential zugesprochen, weil es in vivo zu Nitrit reduziert werden kann und in Verbindung zu Aminen, in kanzerogene N-Nitroso-Verbindungen übergehen kann (National Academy of Science, 1981). Allerdings lässt sich jedoch nach dem aktuellen Stand der Forschung keine Verbindung zwischen Nitratexposition und Harnblasenkarzinomen ableiten (McGeehin et al., 1993; Ward et al., 2003).

Immer wieder wird der Einfluss der Ernährung auf die Tumorentstehung diskutiert. Als Risikofaktoren können die zu große oder zu geringe orale Flüssigkeitsaufnahme (Altieri et al., 2003; Geoffroy-Perez et al., 2001; Michaud et al., 1999; Villanueva et al., 2006) sowie der hohe Kaffeekonsum angeführt werden (Claude et al., 1986). Aufgrund neuerer Untersuchungen tragen die Verwendung künstlicher Süßstoffe, Alkohol- und Teekonsum nicht zu einer Erhöhung des Harnblasenkarzinoms bei (Zeegers et al., 2004; Claude et al., 1986). Auch Carotinoide, die Vitamine A und C sowie der Verzehr von Gemüse haben keinen erkennbaren Einfluss auf die Entstehung des Karzinoms. Als protektiver Faktor kommt ein häufiger Obstverzehr in Betracht (Zeegers et al., 2001; WRCF, 1997).

Die Häufigkeit der Harnblasenkarzinome steht in Korrelation zur urothelialen Oberfläche: die Harnblase macht ungefähr 93% der gesamten Urotheloberfläche aus und ist bei einer Häufigkeit von 92,5% Hauptlokalisation von Urothelkarzinomen.

#### **1.1.4 Pathogenese**

Aromatischen Aminen und Nitrosaminen, wie  $\beta$ -Naphthylaminen und Benzidin, sowie Tryptophan-Metaboliten (welche bei Rauchern beim Nikotinabbau entstehen) verfolgen im Organismus einen gemeinsamen Stoffwechselweg: sie werden in der Leber zu Orthoaminophenolen metabolisiert, mit Sulfat oder Glukuronsäure konjugiert und anschließend renal ausgeschieden. Die Hydrolyse dieser Substanzen durch die im Urin vorhandene  $\beta$ -Glukoronidase setzt Orthophenole frei, die über eine Veränderung der DNS karzinogen wirken. Über eine Deregulierung des normalen Zellzyklus und der Proliferations- sowie der Apoptosemechanismen kommt es letztendlich zu der Tumorentwicklung (IARC 1989: Tobacco Smoking; Talaska et al., 1991; Malaveille et al., 1996).

### **1.1.5 Histologie**

Harnblasenkarzinome sind zu über 95% Urothelkarzinome. In den restlichen 5% der Fälle findet man Plattenepithelkarzinome, Adenokarzinome oder Rhabdomyosarkome.

Bei dem Urothelkarzinom unterscheidet man histopathologisch eine papilläre Form (80-90 %) und eine solide Form (10-20 %). Erstere zeigt herdförmiges papilläres und multifokales Wachstum und weist eine hohe Rezidivrate von bis zu 70%. Ein rasches infiltratives Wachstum ist eher selten. Das solide Urothelkarzinom hingegen wächst primär flach und nicht papillär, wird aber schnell invasiv. Daher ist seine Prognose deutlich schlechter als bei der papillären Form.

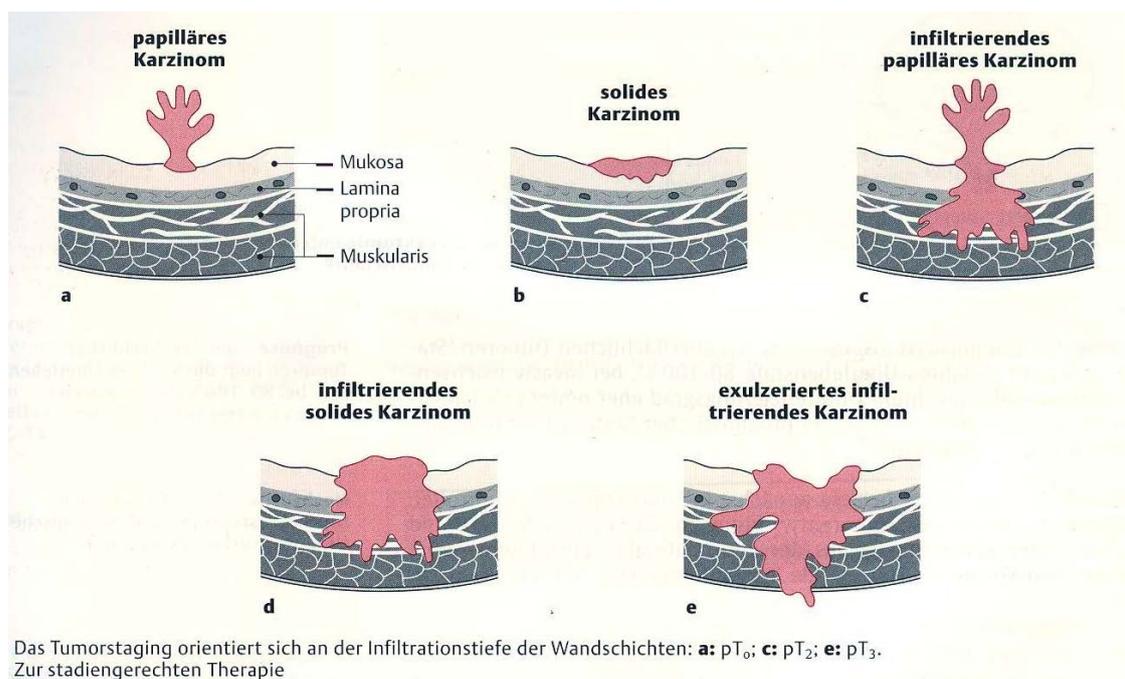
Sonderformen stellen das Carcinoma in situ (Cis oder Tis, 10-15% der Fälle) sowie das Tumorstadium T1/GIII dar.

Das Cis infiltriert nicht die Lamina propria mucosae, und ist somit meist klinisch stumm. Aber es handelt sich um einen biologisch aggressiven Tumor, aus dem sich in 15-35% der Fälle ein infiltrativ ggf. metastasierendes Karzinom mit multizentrischem Wachstumsmuster entwickelt. Diese Tumorart ist häufig aneuploid und zeigt komplexe chromosomale Aberrationen, die von den invasiven Karzinomen nicht zu unterscheiden sind (Tyrkus et al., 1992).

Bei dem Tumorstadium T1/GIII handelt es sich um ein entdifferenziertes, noch oberflächlich wachsendes Harnblasenkarzinom, das in 22% der Fälle Metastasen aufweist und bei einem Drittel der Patienten muskelinfiltrierend wachsen kann.

### **1.1.6 Stadieneinteilung des Harnblasenkarzinoms**

Die Stadieneinteilung erfolgt nach der TNM-Klassifikation für urologische Tumoren der Union International Contra Cancer (UICC) und nach dem Differenzierungsgrad der Tumorzellen (Grading). T beschreibt die lokale Ausdehnung des Primärtumors, N dokumentiert den Lymphknotenbefall und M beschreibt die Metastasierung.



**Abb. 1: Schema Stadieneinteilung**

Tx	Primärtumor kann nicht beurteilt werden
T0	Kein Anhalt für Primärtumor
Tis	Carcinoma in situ
Ta	Nicht invasives papilläres Karzinom
T1	Tumor infiltriert subepitheliales Bindegewebe
T2	Tumor infiltriert oberflächliche Muskulatur
T3	Tumor infiltriert
T3a	- tiefe Muskulatur oder
T3b	- perivesikuläres Gewebe
T4	Tumor infiltriert
T4a	Prostata/ Uterus/ Vagina
T4b	Beckenwand/ Bauchwand

**Tabelle 1: Lokale Ausdehnung des Primärtumors ( nach UICC )**

Nx	Regionäre Lymphknoten können nicht beurteilt werden
N0	Keine regionären Lymphknoten betroffen
N1	Metastase in solitärem Lymphknoten ( bis zu 2 cm im größtem Durchmesser )
N2	Metastase(n) in solitärem Lymphknoten ( 2-5 cm im größtem Durchmesser ) In multiplen Lymphknoten ( keine mehr als 5 cm Durchmesser )

**Tabelle 2: Regionäre Lymphknoten ( nach UICC )**

Mx	Das Vorliegen einer Fernmetastase kann nicht beurteilt werden
M0	Keine Fernmetastase
M1	Fernmetastasen ( Lokalisation sollte mit Indices, wie z.B. oss, pul, hep usw., angezeigt werden )

**Tabelle 3: Metastasierung ( nach IUCC )**

G1	Gut differenziert
G2	Mäßig differenziert
G3	Schlecht differenziert
G4	Anaplastisches Karzinom

**Tabelle 4: Differenzierungsgrad (nach IUCC)**

Klinisch unterscheidet man nach dem TNM-System oberflächlich wachsende (Tis, Ta, T1 N0 M0), lymphogen (T1-4 N1-3 M0) und hämatogen (T1-4 N0-3 M1) metastasierende Harnblasenkarzinome. So orientiert sich die Therapie an das Tumorstadium.

### 1.1.7 Therapie

Die Therapie der Harnblasentumoren erfolgt stadienorientiert.

**Oberflächliche Tumoren Ta-1/G1-2:** Die Grundlage der Behandlung ist die vollständige transurethrale Resektion. Alternativ kann auch eine transurethrale Laserkoagulation erfolgen. Aufgrund der hohen Rezidivquote dieses Tumortyps, sind im weiteren Verlauf engmaschige endoskopische Kontrollen alle 3 Monate erforderlich. Ferner kann die Nachsorge auch mittels Urinzytologie oder FISH erfolgen. Schwierigkeiten bei der alleinigen Urinzytologie ergeben sich nur bei hochdifferenzierten Tumoren (G1), die zytologisch nicht immer eindeutig zu diagnostizieren sind, weswegen die Kontrollzystoskopie doch unumgänglich ist.

Bei hoher und schneller Rezidivneigung, bei multikokalem Auftreten oder bei zusätzlichem Nachweis eines Carcinoma in situ ist der Einsatz einer intravesikalen Instillationstherapie mit verschiedenen Chemotherapeutika nötig. Aktuell werden vor allem Adriamycin, Mitomycin C, Doxorubicin, Cisplatin und Epirubicin eingesetzt. Bestimmte Kombinationen haben sich bewertet wie M-VAC (Methotrexat/Vincristin/Adriamycin/Cisplatin) oder GC (Gemcitabin/Cisplatin). Zur weiteren Senkung der Rezidivrate ist die intravesikale Immuntherapie mit dem Bacillus-Calmette-Guérin (BCG)-Impfstoff ebenfalls möglich (Lamm et al., 1985; Herr et al. 1985; Herr et al. 1988). Jedoch lässt sich eine Progression damit nicht verhindern, dies unterstreicht erneut die Wichtigkeit der endoskopischen

Kontrollen. Die hauptsächliche Nebenwirkung der Instillationstherapie ist die chemische Zystitis. Insbesondere bei BCG-Instillationen sind systemische Reaktionen bis hin zur Sepsis mit Todesfolge sowie auch Organtuberkulosen (z. B. Nieren, Prostata, Hoden) beschrieben worden (Lamm et al., 1992).

**Carcinoma in situ:** Aufgrund seiner biologischen Aggressivität ist eine alleinige transurethrale Resektion nicht ausreichend. Adjuvant muss eine Blaseninstillationstherapie angeschlossen werden, mit welcher gute Remissionserfolge zu erzielen sind. Bei Progredienz ist eine radikale Zystektomie unausweichlich.

**Tumorstadium T1/G3:** Eine Chemoinstillationstherapie ist bei noch oberflächlichen, aber entdifferenzierten Karzinomen gerechtfertigt, anderenfalls muss eine radikale Zystektomie erfolgen.

**Muskelinfiltrierendes Harnblasenkarzinom:** Bei fortgeschrittenen Harnblasenkarzinomen (Stadium T2-T4a, N0-NX, M0), ist meist die Indikation zu einer radikalen Zystektomie gegeben, sofern der Patient operabel ist. Zu Beginn des Eingriffs werden die pelvinen Lymphknoten beidseits reseziert und histologisch untersucht. Wird bei der intraoperativen Schnellschnittuntersuchung keine lymphogene Metastasierung nachgewiesen, erfolgt beim Mann die kurative Entfernung von Harnblase, Prostata sowie dem distalen Harnleiter, bei der Frau die Entfernung von Harnblase und Harnröhre, der Gebärmutter und Adnexe sowie des distalen Ureters. Welche Art der Harnableitung gewählt wird, hängt vom Tumorstadium, einem eventuellen Befall der prostatistischen Harnröhre sowie von patienteneigenen Faktoren ab (Alter, Komorbidität, persönliche Wünsche, etc.). Die operative Harnableitung kann mittels Ileum-Conduit oder Kolon-Conduit als inkontinentes Stoma erfolgen. Bewährt haben sich auch Ersatzblasenkonstruktionen aus Dünn- und Dickdarm als sog. kontinente Harnableitung wie z.B. Typ Mainz-Pouch oder Typ Ileum-Neoblase. Die Miktion kommt entweder durch Einmalkatheterisierung oder durch Bauchpresse zustande.

Weiter fortgeschrittene Tumorstadien sind wegen einer bereits eingetretenen Metastasierung in der Regel einer lokalen radikalen Operation nicht mehr zugänglich. In diesem Fall muss eine Polychemotherapie erwogen werden, eventuell in Kombination zu einer palliativen TUR und/ oder Zystektomie. Verschiedene Polychemotherapieschemata stehen zu Zeit zur Verfügung. Nennenswert ist das M-VAC Schema, eine Kombination aus Cisplatin mit Gemcitabine oder Methotrexat, Vinblastin und Doxorubicin. Klinische Remissionen sind in bis zu 50% der Fälle zu erreichen.

Auch nach einer Zystektomie ist eine onkologische Nachsorge zunächst alle 3 Monate notwendig (Urinzytologie mit oder ohne FISH, sonographische und radiologische Kontrollen: bei Männern die verbliebene Harnröhre nicht vergessen mit Entnahme einer Spülzytologie).

Lokalrezidive nach radikaler Zystektomie sind selten, prognostisch bestimmend ist das Auftreten von Fernmetastasen.

Die Prognose ist bei oberflächlichen Blasentumoren sehr gut. Eine Tumorprogression ist mit etwa 5% die Ausnahme. Bei muskelinfiltrierenden Tumoren beträgt die 5-Jahres-Überlebensrate nach (5JÜR) radikaler Operation 30-55%. ( Stadium p2/pN0/M0 60-75%, Stadium pT3/pN0/M0 20-36% ).

Es muß erwähnt werden, dass nicht nur fortgeschrittene TTCs eine Indikation zur Zystektomie darstellen. Auch das Rezidiv eines oberflächlichen high-grade TCCs sowie eine Schrumpfblass nach Chemotherapie rechtfertigen eine Zystektomie.

### **1.1.8 Symptome**

Die schmerzlose Mikro- oder Makrohämaturie ist das typische Erst- bzw. Frühsymptom von Blasenkarzinomen, unabhängig von ihrer Größe oder Malignitätsgrad. Weitere Beschwerden sind Dysurie, Pollakisurie sowie Urgesymptomatik. Da diese ein Karzinom maskieren können, sind persistierende und therapieresistente Dysurien jenseits des 40. Lebensjahres verdächtig auf Blasentumor. Jede Dysurie, die sich nicht durch die benigne Prostatahyperplasie oder durch einen Harnwegsinfekt erklären lässt, bedarf einer weiteren Abklärung.

Im Spätstadium deuten Flankenschmerzen auf Nierenstauung durch Tumorinfiltration oder Lymphknotenmetastasen im Bereich der Ureterostien. Im fortgeschrittenen Tumorstadium können sich suprasymphysäre und perineale Schmerzen als unspezifische Symptome bemerkbar machen. Zudem treten Anämie, Leistungsminderung und Gewichtsabnahme auf.

### **1.1.9 Diagnostik**

**Urinstatus.** Bei der Abklärung einer Hämaturie oder bei Verdacht auf Harnblasenkarzinom wird zunächst der Urin untersucht. Im Urinsediment werden dann überwiegend mikroskopisch nicht verformte (epitheliale oder frische) Erythrozyten nachgewiesen, im Gegensatz zu den dysmorphen Erythrozyten der Glomerulonephritis, die durch die Passage durch die Tubuli deformiert sind.

**Sonographie.** Bei gefüllter Blase vermag die perkutane Ultraschalldiagnostik einen Blasentumor, vor allem exophytisch wachsende Tumore, zu identifizieren.

**Bildgebende Verfahren.** Zur Abklärung einer Mikro- oder Makrohämaturie ist das Urogramm obligat. Blasen Tumoren stellen sich im Urogramm wie auch im Zystogramm nur ungenügend dar. Mit dem Urogramm wird aber eine Blutungsquelle in Harnleitern und Nierenbecken ausgeschlossen. Ferner erhält man Informationen darüber, ob der Blasentumor zu einem Aufstau der Nieren geführt hat.

CT- oder MRT-Abdomen mit Ausscheidungsphase sind gut geeignet, um ein fortgeschrittenes Harnblasenkarzinom zu erfassen. Die Kernspintomographie ist hierbei der Computertomographie nur geringfügig überlegen. Man bekommt dabei noch einen Anhalt über die lokale Tumorausbreitung, insbesondere ob Nachbarorgane infiltriert sind. Insbesondere viszerale Metastasen oder großknotige Lymphknotenmetastasen sind erkennbar. Die Infiltrationstiefe in die Harnblase und die Lymphknoten-Metastasierung im kleinen Becken werden von beiden Techniken schlecht erfasst. Lymphknotenvergrößerungen unter 1 cm und Mikrometastasen werden somit übersehen. Bei muskel-invasiven TCCs sind weiterhin Röntgen-Thorax und CT-Thorax (Lungenmetastasen), Knochenszintigraphie (Knochenmetastasen) sowie Ultraschall der Leber (Lebermetastasen) notwendig.

**Zystoskopie und transurethrale Resektion.** Des Weiteren ist bei schmerzloser Makro- oder Mikrohämaturie eine Blasenspiegelung unerlässlich, denn durch sie kann die endgültige Sicherung der Diagnostik erfolgen. Die Zystoskopie wird mit einem starren oder neuerdings mit flexiblen Fiberglasinstrumenten durchgeführt. Ist die Blase unauffällig, versucht man zu eruieren, aus welchem Ostium der blutige Urin kommt. Die Sensitivität der Zystoskopie wurde in den letzten Jahren verbessert, wie z. B. durch die Instillation von 5-Aminolaevulinsäure, die vor allem malignes Gewebe fluoreszenzmarkiert - bei blauem Licht leuchtet der Tumor rötlich – auch photodynamische Diagnostik genannt (Kriegmair et al., 1994; Zaak et al., 2001).

**Exfoliative Urinzytologie.** Die Urinzytologie erfasst mittelgradig- oder entdifferenzierte Tumorzellen sowie ein Carcinoma in situ. Diagnostische Versager sind durch hochdifferenzierte Tumoren bedingt, die in ihrem Zellbild normalem Urothel oder entzündlichen Veränderungen gleichen (insbesondere bei Urolithiasis). Es soll nicht der erste Morgenurin untersucht werden, in dem die Zellen durch die lange Einwirkung des Harns zerstört werden. Die Proben werden sedimentiert oder aber über Mikrofilter abgesaugt. Die

gewonnenen Zellen werden fixiert und/oder nach verschiedenen Färbetechniken angefärbt und nach folgenden Malignitätskriterien beurteilt.

- Verschiebung der Kernplasmarelation,
- Prominenz und Irregularität der Kernmembran,
- Chromatinvermehrung mit Transparenzverlust des Zellkerns,
- Änderung der Chromatinfineinstruktur,
- Vermehrung und Entrundung des Kernkörperchens
- Entrundung und Varianz der Zellkerne

**Neue diagnostische Methoden.** Zusätzlich zu diesen zytologischen Untersuchungen gibt es verschiedene neue Marker zur nicht-invasiven Diagnostik des Harnblasenkarzinoms.

Das Epithel der Blasenschleimhaut kann durch Analyse der DNA mit Hilfe der Flowzytometrie klassifiziert werden.

Zelloberflächenmarker werden zur Diagnostik und zur Erfassung der Prognose eingesetzt. Prognostisch bedeutsam ist z.B. der Verlust der Blutgruppenantigene, die normalerweise auf gesunden Epithelzellen nachzuweisen sind.

Verschiedene Testverfahren stehen zur Verfügung, wie der Blasentumorantigen (BTA r)-Test, der das aus Tumorepithelzellen abgegebene Protein detektiert. Ferner gehört der NMP22 Test dazu, der mittels eines Enzym-Immunoassays (ELISA) ebenfalls ein Blasentumor-assoziiertes Protein (nuclear matrix protein, NMP) im Urin nachweisen kann. Er wird sowohl als Früherkennungstest als auch im follow-up eingesetzt (Eissa et al., 2002; Ngyuen et al., 2008; Hutterer et al., 2008). Über ein ELISA-Verfahren ist es möglich die Hyaluronidase-Aktivität im Urin zu messen, bei fortgeschrittenen TCC ist diese um das 5- bis 8-fache erhöht (Pham et al., 1997). In diesem Zusammenhang ist die Detektion der HYAL1 (Hyalurodinase) und RNA survivin-Expression in Urothelzellen mittels rt-PCR als neuer diagnostischer Marker des TCCs vielversprechend (Eissa et al., 2010).

Auch der Nachweis von weiteren Biomarkern, wie z.B. die RNA-Sequenz des Telomerase-Enzyms im Urin sowie das Lewis-X-Antigens an abgeschilferten Tumorzellen, ist mittlerweile etabliert (Golijanin et al., 1995; Friedrich et al., 2002; Eissa et al., 2007; Mowatt G et al., 2010).

Beispielweise stehen kommerzielle Tests wie ImmunoCyt™ zum Monitoring von TCC-Patienten zur Verfügung: monoklonale markierte Antikörper reagieren mit spezifischen zellulären Markern von Urothelzellen im gewonnenen Urin. Mit monoklonalen Antikörpern kann man tumorassoziiertes Antigen auf den Zellen immunhistologisch oder

immunzytologisch identifizieren. Durch Anwendung solcher monoklonaler Antikörper kann die Sensitivität der Zytologie (Immunzytologie) verbessert werden. Monoklonale Antikörper sind nicht in der Lage, ein spezifisches Tumorantigen zu identifizieren. Tumorassoziierte Antigene werden jedoch quantitativ unterschiedlich bei benignen und malignen Zellen exprimiert.

Zudem erfolgt auch seit 2001 die multitarget FISH (Fluoreszierende-in-situ-Hybridisierung) - Detektion von Blasen Tumoren an Urothelzellen im Urin (Skacel et al., 2001), wie z.B. UroVysion™ (Vysis-Abbott, Downers Grove, IL). An Urothelzellen, die leicht in den Urin abgeschilfert werden, können nach Uringewinnung, Zellisolierung und entsprechender Vorbehandlung genetische Veränderungen (numerische Aberrationen) mittels FISH an einem bestimmten Locus detektiert werden. Untersuchungen haben gezeigt, dass bei Urothelkarzinomen besonders häufig Vermehrungen (Polysomie) der Chromosomen 3, 7 und 17 beobachtet werden, und dass bereits in der Frühphase der Tumorentstehung Verluste von Chromosom 9 und des 9p21-Locus gefunden werden können, der das p16-Tumorsuppressor-Gen enthält. So werden zum Beispiel beim UroVysion-Test™ Aneuploidien der Chromosomen 3, 7 und 17 und den Verlust des 9p21-Locus identifiziert. Laut Kriterien bei Auswertung von 25 malignen Zellen gelten mehr als 5 Zellen mit mehr als einem zusätzlichen Chromosom als FISH positiv. So konnten die numerischen chromosomalen Aberrationen des TCCs, die bis dato am Primärpräparat oder an permanenten Zelllinien nachgewiesen wurden, an den abgeschilfertem Urothelzellen im Urin ebenfalls nachgewiesen werden (Skacel et al., 2002,2004; Bollmann et al., 2005). Diese UroVysion-Technik wird immer mehr zur nicht-invasiven Überwachung von Blasen tumorpatienten eingesetzt (Zwarthoff et al., 2008). Aber auch der Erfolg von intravesikalen Therapien, wie z.B. BCG (Bacille de Guérin)-Instillation, kann mittels UroVysion nicht-invasiv verfolgt werden (Halling et al., 2008; Whitson et al., 2009).

In verschiedenen Studien konnte mittels FISH an Urothelzellen gezeigt werden, dass bei den fortgeschrittenen Harnblasenkarzinomen, die im Mittelpunkt der vorliegenden Arbeit stehen, weitaus mehr Aneuploidien auftraten als bei niedrig maligneren TCCs (Detgyar et al, 2004; Inoue et al., 2004). Die Chromosomen 7, 8, 9 und 17 wiesen beim high-grade TCC die meisten chromosomalen Veränderungen auf.

Zusammenfassend ist die Grundlage der Diagnostik eines Blasen tumors die Durchführung einer Urethozystoskopie sowie die transurethrale Tumorresektion mit anschließender

histologischer Untersuchung des gesamten Tumors. Diese Faktoren entscheiden über eine weitergehende Diagnostik und Therapie. Bei gesicherten Karzinomen (muskelinfiltrierenden Tumoren und prognostisch ungünstigen Tumoren T1/GIII sowie Cis) werden zur Ausbreitungsdiagnostik und präoperativ bildgebende Verfahren wie Computertomographie des Abdomens, Leberultraschall und Knochenszintigraphie angewendet.

## **1.2 Ziel der Arbeit**

Die Untersuchungen des Harnblasenkarzinoms fanden im Rahmen eines Projektes der Doktor Robert Pflieger-Stiftung zur Charakterisierung molekularer und genetischer Marker für das invasiv wachsende Harnblasenkarzinom statt.

Obwohl das Transitionalkarzinom zum Zeitpunkt der Erstdiagnose in 70% der Fälle oberflächlich wachsend ist, sind Rezidive innerhalb von 5 Jahren sehr häufig. Davon geht ein signifikanter Anteil (10-30%) in ein invasives Wachstum mit Infiltration der Harnblasenmuskulatur über. Somit stellt das TCC ein ideales Modell dar, um einen kausalen Zusammenhang zwischen veränderter Zellfunktion und genetischer Aberration herzustellen. In der vorliegenden Arbeit sollen unter Verwendung von Fluoreszenz-In-Situ-Hybridisierung (FISH) Primärkulturen des invasiven TCCs untersucht werden.

Fluoreszenz-In-Situ-Hybridisierung basiert auf der Basenpaarung von markierten DNA-Sonden mit ihren komplementären DNA-Zielsequenzen in den Metaphasechromosomen oder Interphasezellen, also auch unabhängig von der Zellzyklusphase, daher auch Interphasezytogenetik genannt (Pinkel et al., 1986a und 1986b). FISH kann für verschiedenste Präparate angewandt werden: von zytogenetischen Standard-Präparaten über formalinfixierte Gewebe bis hin zu Ausstrichen (Smears) und Tupfpräparaten. Gall und Pardue sowie John et al. entwickelten im Jahre 1969 die Methode der in situ Hybridisierung, doch erst Ende der 80er Jahre revolutionierte die FISH die molekulare Zytogenetik.

Auf der Tatsache basierend, dass RNA- und DNA-Moleküle mit den markierten DNA-Sonden stabile Hybride eingehen, erfolgt im nächsten Schritt die Markierung, die Sichtbarmachung der Sonde. Dabei stehen zwei Verfahren zur Verfügung: die direkte Markierung mit einem Fluoreszenzfarbstoff und die indirekte Markierung mit einem nichtfluoreszierenden Label. Die indirekt markierten DNA-Sonden werden mit einem Sekundärreagenz wie Biotin und DIG, z.B. über Ausbildung eines Protein- oder eines Antikörperkomplexes, sichtbar gemacht. Die biotinmarkierten DNA-Sonden im Hybrid

werden durch Avidin-Streptavidin detektiert (Manuelidis et al., 1982; Dirks et al., 1991; Wiegant et al., 1991). Bei der Markierung mit dem von Boehringer Ingelheim entwickelten Digoxigenin-System erfolgt die Detektion mit einem anti-dig-Antikörper, also immunologisch (Kessler et al., 1990, 1991).

So bietet die FISH ein breites Spektrum an Einsatzmöglichkeiten. Mit Zentromer-Sonden entsteht eine Bindung an die repetitive Satelliten-DNA eines Chromosoms, so können numerische Aberrationen, vor allem in der Tumordiagnostik, nachgewiesen werden (Cremer et al., 1986; Pinkel et al., 1988; Joos et al., 1994). Aber auch die genaue genomische Lokalisation eines Gens, sowie strukturelle Veränderungen die Amplifikation von Onkogenen, die Deletion von Tumorsuppressorgenen, Mikrodeletionen und Translokationen können mittels Locus-spezifischen Sonden erfasst werden.

Insbesondere für die Detektion von numerischen und spezifischen Chromosomenanomalien in soliden Tumoren ist eine FISH-Analyse von Interphasezellen mit zentromerspezifischen Proben von großem Nutzen: diese sind aufgrund ihrer vergleichsweise langsamen Proliferation in vivo und in vitro für die konventionelle zytogenetische Analyse schwer zugänglich (Devilee et al., 1988; Persons et al., 1993; Takahashi et al., 1994; Alcaraz et al., 1994). Beim Harnblasentumor konnten im letzten Jahrzehnt mittels FISH verschiedene tumorassoziierte chromosomale Anomalien nachgewiesen werden.

Während nicht invasive Grad I und II TCCs primär diploid sind und nur wenige chromosomale Veränderungen aufweisen, zeigen die invasiven Grad III und IV Karzinome zahlreiche numerische und strukturelle Chromosomenveränderungen, die mit einer Zunahme des DNA-Gehaltes einhergehen (Fadl-Elmula et al., 2000, 2002; Jiang et al., 2003, Ribal et al., 2004; Leonardo et al., 2005). Die bisherigen zytogenetischen Befunde beim TCC wurden überwiegend am histologischen Material bzw. aus DNA-Präparaten von frisch asservierten Proben sowie an permanenten Zelllinien gewonnen. Neben Untersuchung am Tiermodell wurden Untersuchungen des invasiven Verhaltens des TCCs an permanenten Zelllinien wie z.B. RT4 und RT112 durchgeführt (Booth et al., 1997; Martinez-Torrecuadra et al., 2005). Zellkulturen finden besonders in der Forschung breite Anwendung. Permanente Zellkulturen sind in der Lage sich unaufhörlich zu teilen und zu wachsen. Permanente Zelllinien bilden rasch eine gleichmässige/uniforme und künstliche Zellpopulation, so dass sie für verschiedene Testsysteme ideal einsetzbar sind, beispielsweise bei der Untersuchung von Substanzen bezüglich ihren Einfluss auf die Signaltransduktion und ihren zytotoxischen Effekt auf die Zelle. Das biologische Verhalten der kultivierten Zellen kann also in der Grundlagenforschung fast unbegrenzt untersucht werden.

Allerdings gehen diese Fähigkeiten der unbegrenzten Teilbarkeit und des raschen Wachstums von permanenten Zelllinien mit dem Verlust ihrer natürlichen Funktion einher. Sie gelten als genetisch „ verwildert “. In einer Studie von 2005 konnte gezeigt werden, dass permanente Zelllinien im Zuge der Langzeitkultur Alterationen ihrer DNA aufweisen (Parson et al., 2005). Dabei wurden 4 Leukämie-Zelllinien mittels short-tandem-repeat (STR) profiling (DNA-fingerprints) mit dem Ausgangstumor verglichen. In den Zelllinien Jurkat und CCRF-CEM konnten wesentliche genetische Veränderungen verzeichnet werden.

Somit scheinen Wachstumsraten, Invasionsverhalten, tumor-host Interaktionen und zelluläre Antwort auf exogene Faktoren (Chemotherapie, Radiatio) im Vergleich zu den primären Tumoren deutlich verändert zu sein (Rockwell et al., 1980). In dieser Veröffentlichung wurde bereits 1980 auf die Grenzen des Einsatzes von permanenten Zelllinien als zuverlässige Grundlage eines humanen Tumormodells aufmerksam gemacht. Dabei ist allerdings zu beachten, dass die untersuchten permanenten Zelllinien u.a. von Tieren stammten. Insbesondere wurde darauf hingewiesen, dass permanente Zelllinien das langsame Wachstum sowie die Zelldifferenzierung eines Ursprungstumors ähnlicher Herkunft nicht wiedergeben. Gerade im Tiermodell wachsen sie schnell, synchron und aggressiv (anaplastisch), so dass Unterschiede im Stoffwechsel und in der Pharmakokinetik im Vergleich zum Primärtumor bzw. zu den Zellen aus der Primärzellkultur angenommen werden. Das biologische Verhalten von permanenten Zelllinien ist dem des Ursprungstumors nicht gleichzusetzen. Somit ist ihr Einsatz für ein adäquates experimentelles Modell eines humanen Karzinoms, in unserem Fall des Harnblasenkarzinoms, kritisch zu betrachten.

Die Arbeitshypothese meiner Arbeit ist, dass die aneuploiden Zellklone, die aus einer Zellpopulation einer Primärkultur von fortgeschrittenen TCCs isoliert werden, die genetischen Veränderungen und das biologische Verhalten des Ursprungstumors zuverlässig wiederhergeben. Berichte über FISH an primären Zellkulturen des Harnblasenkarzinoms sind spärlich. Überhaupt sind wenige Artikel über erfolgreiche Primärkulturen des TCCs in der Literatur zu finden. Nicht selten erfolgten im Anschluss keine zytogenetischen Untersuchungen, sondern bevorzugt Untersuchungen im Hinblick auf die Genotoxizität und Chemosensitivität der Epithelzellen bei experimentellem Einsatz von verschiedenen Chemotherapeutika (Burgues et al., 2007; Flieger et al., 2008). Es gibt zwar auch einige Daten über short-term Kulturen aus exfolierten Urothelzellen (Okuna et al., 1999; Herz et al., 1993), aber auch hier wurden keine FISH-Untersuchungen durchgeführt und darauf hingewiesen, dass die Zellen im Verlauf der Kultur einer Zytodifferentiation unterliegen, auch epitheliale-mesenchymale Transition genannt. Primärkulturen von oberflächlich wachsenden TCCs

scheinen schwieriger zu kultivieren als Primärkulturen von muskel-invasiven TCCs (Celis et al., 1999). Darüberhinaus sind Urothelzellen aus dem Ureter für die Primärkultur besser geeignet als Urothelzellen aus der Harnblasenmukosa. Der Proliferationserfolg von Epithelzellen aus Ureterschleimhaut liegt bei 98% im Vergleich zu 71% bei Urothelzellen der Harnblasenschleimhaut (Flieger et al., 2008).

In der vorliegenden Arbeit erfolgte die Charakterisierung genetisch aberranter Karzinomzellen an Primärkulturen des fortgeschrittenen Harnblasenkarzinoms. Zu diesem Zweck wurden die Chromosomen 7, 8, 9, 17 und Y für die FISH-Untersuchungen ausgewählt. Das Primärmaterial hierzu wurde aus frischen Zystektomiepräparaten gewonnen. In der Literatur sind Aneusomien dieser Chromosome mit Tumorprogression und – Rekurrenz assoziiert und in den fortgeschrittenen Stadien des TCCs vermehrt nachweisbar (Tsukamoto et al., 2002; Cheng et al., 2001; Cianculli et al., 2000; Pycha et al., 1998).

Ziel des Forschungsvorhabens ist die Etablierung eines in-vitro-Invasionsmodells mit der Möglichkeit einer funktionellen Charakterisierung der selektierten Zellen, um eine Korrelation zwischen Invasionsverhalten und genetischen Veränderungen beim TCC herzustellen. Anders ausgedrückt, ist das Ziel meiner Arbeit zu klären, ob gerade die in der Primärkultur invasiv wachsenden Zellen genetisch aberrant sind, bzw. umgekehrt, ob die in einer Population vorhandenen aneusomen Zellen bevorzugt invasiv wachsen. Das Wissen über bestimmte Aneuploidien die mit invasivem Wachstum einhergehen, würde im Frühstadium der Erkrankung von TCC-Patienten eine Einteilung in Risikogruppen ermöglichen. Eine genaue funktionelle Charakterisierung des einzelnen TCCs würde dem Kliniker wichtige Informationen über den Krankheitsverlauf liefern und Therapiekonzept sowie Nachsorge des Patienten maßgebend beeinflussen.

## 2 MATERIAL UND METHODEN

# Organigramm

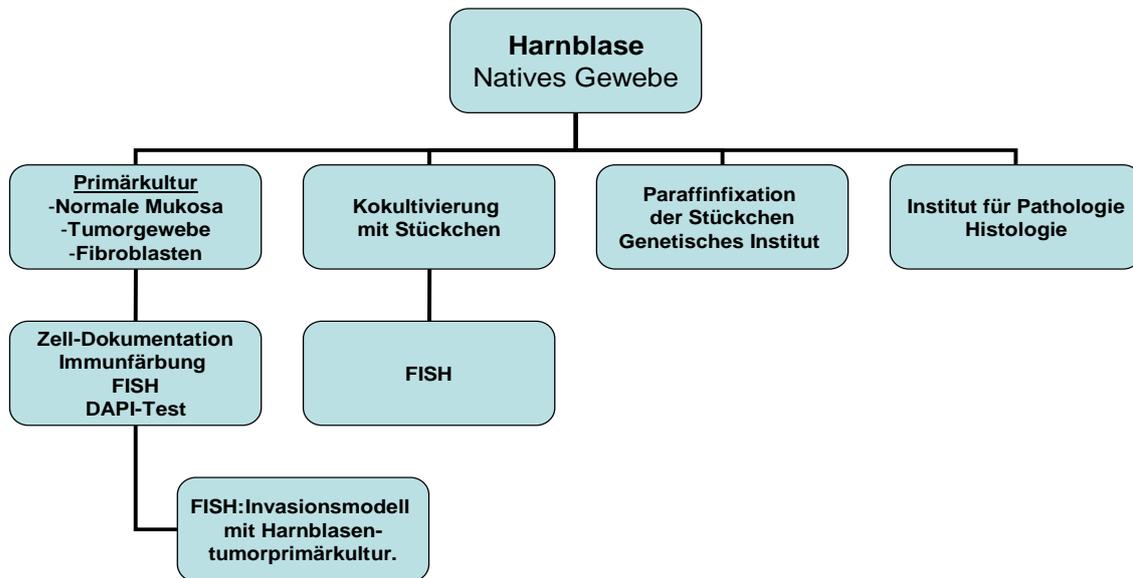


Abb. 2: Organigramm des Arbeitsprotokolls

### 2.1 Probengewinnung

In der vorliegenden Arbeit stammte das gewonnene Gewebematerial aus radikalen Zystektomien (Klinik für Urologie/ Universitätskliniken Homburg). Indikation zur operativen Therapie war Rezidivverhalten und invasives Wachstum. Insgesamt wurden 60 radikale Zystektomien bei Diagnose eines invasiven wachsenden Harnblasenkarzinoms (Harnblasenentfernung mit Anlage einer Harnableitung) 2001 durchgeführt. Im Allgemeinen wurde die gesamte Blase direkt nach Entfernung in vivo in das Institut für Pathologie der Universitätsklinik Homburg (Leiter: Prof. Dr. Remberger) transportiert. Dort erfolgte zeitnah durch einen Pathologen die Entnahme von Proben aus einem makroskopisch tumorverdächtigen und einem tumorfreien Areal, also „gesunde“ Harnblasenmukosa. Die Proben wurden sofort in Transportmedium überführt und in das Zellkulturlabor zur weiteren Aufarbeitung weitergeleitet.

Das Transportmedium setzte sich aus DMEM/ F-12 (Sigma) ohne fötales Kalbsserum und doppelter Konzentration Penicillin/Streptomycin (Life-Technologies, 2U/1µg/ml) zusammen.

Die Primärkultur wurde am selben Tag angelegt. Parallel dazu wurden in einigen Fällen Stückchen in flüssigem Stickstoff schockgefroren und in gepuffertem Formalin fixiert, und im Genetikinstitut der Universität des Saarlandes mittels CGH (comparative genomic hybridization), SKY (spektrale Karyotypisierung) und FISH charakterisiert.

## **2.2. Zellkultur**

Alle weiteren Schritte wurden im Zellkulturlabor unter einer Sterilwerkbank durchgeführt. Prinzipiell handelt es sich hierbei um einen Arbeitsplatz, welcher von äußerer Kontamination durch Viren, Bakterien, Sporen etc. geschützt ist. Durch das sogenannte "Horizontal/vertical-laminar-flow" System der eingesetzten Heraeus-Werkbank (Herasafe HS12) war eine partikelfreie (= gefilterte) Luft über die Arbeitsfläche gewährleistet, und so eine Kontamination des Zellmaterials weitgehend verhindert.

Alle verwendeten Materialien und Geräte (Flaschen, Petrischalen, Pipetten, Skalpelle, usw.) waren steril.

### **2.1.1 Zellkulturmedien**

Für die Kultivierung von Harnblasenepithelzellen wurde DMEM/ F12 Medium (Dulbeccos MEM/ Nutrient Mix F12, 1:1, Sigma) verwendet, welches 48 Stunden vor Gebrauch wie folgt komplettiert wurde (auf 500 ml):

- L- Glutamin (Biochrom) 5 ml - 0,3 mg/ml
- EGF (Epithelial Growth Factor, Sigma) 0,5 ml - 10 ng/ml
- Insulin (Sigma) 0,5 ml - 4µg/ml
- Cholera toxin (Sigma) 10 µl - 10 ng/ml
- Hydrocortison (Sigma) 0,5 ml - 1 µg/ml
- Fötale Kälberserum (FCS, Life Technologies) 10%
- Penicillin/ Streptomycin (Life Technologies) 5ml - 1 U/1µg/ml
- NEA (nicht essentielle Aminosäuren, Gibco) 5 ml

Neben dem epithelial growth factor (EGF), sind es Insulin und Cholera toxin die das Fibroblastenwachstum vor allem in der Initialphase der Kultivierung hemmen und das epitheliale Wachstum fördern.

Für die Kultivierung von Fibroblasten wurde DMEM- Medium (Gibco) mit 10% Fötalem Kälberserum (FCS) und 1 U/ml bzw. 1 µg/ml Penicillin/Streptomycin verwendet. Die

Mediumzusätze wurden der Grundlösung durch einen Sterifilter (Millipore) beigelegt und im Brutschrank auf Sterilität getestet. Die Medien wurden vor Gebrauch auf Raumtemperatur erwärmt.

### **2.1.2 Primärkultur**

Die Proben wurden steril mit einem Skalpell zu kleinen Stückchen mit einer Kantenlänge von ca. 2-3 mm präpariert. Dabei wurde darauf geachtet, das Tumorgewebe bzw. die normale Mukosa-Epithelschicht von den darunter liegenden Bindegewebsanteilen makroskopisch zu trennen, um möglichst eine homogene Zellpopulation anzuzüchten. Zum Gewinn von Fibroblasten hingegen, wurden Gewebestückchen aus der Schicht entnommen, die sich unterhalb der gesunden Mukosa befand.

Die Stückchen wurden mittels einer sterilen Pasteurpipette unter leichtem Sog in eine Zellkulturflasche (Becton Dickinson 25 cm<sup>2</sup>) plaziert und mit einem Tropfen des entsprechenden Mediums (DMEM/ F12 für Tumor- und Mukosagewebe, DMEM für die Fibroblastenkultur) befeuchtet und in den Brutschrank gestellt (Heraeus 6000; 37°C, 5%ige CO<sub>2</sub>-Atmosphäre). Dabei ist zu beachten, dass nicht nur die Nährstoffe und Wachstumsfaktoren sondern auch die spezifische Umgebung, das sog. micro-environment, zu einer Selektion beiträgt. Das Auswachsen von Zellen aus dem Stückchen wurde täglich mit einem Umkehrmikroskop (Axiovert 100S, Objektiv 10x) beobachtet. Nach dem Auswachsen von Zellen – in der Regel nach 5-15 Tagen – wurden die Stückchen vorsichtig mit dem entsprechenden Medium geflutet. Ein Mediumwechsel war erforderlich, sobald ein Farbumschlag des im Medium enthaltenen Indikators Phenolrot von rotorange nach gelb erfolgte, meistens nach 2-3 Tagen.

Bei gutem Wachstum entwickelte sich der Zellrasen rasch, so dass schon nach 2 bis 3 Wochen die gesamte Wachstumsfläche bedeckt war. Diese Zellkultur wurde als Stück 0 (S0) Passage 0 (P0) bezeichnet. Nach Erreichen dieser Konfluenz wurden die Stückchen vorsichtig mit einer Pasteurpipette angesaugt und entweder erneut auf frische Kulturflaschen oder andere Trägermaterialien ausgepflanzt oder in den meisten Fällen in Einfriermedium (DMEM/ DMSO- Dimethylsulfoxid, Sigma) gebracht und in flüssigem Stickstoff gelagert. Der Zellrasen, der sich als Monolayer gebildet hat, wurde mit EDTA-Trypsin-Lösung (Gibco, BRL 1x solution, 0,25% Trypsin und 0,02% EDTA) nach Absaugen des Mediums etwa 3 min im Brutschrank inkubiert (2 ml für 25 cm<sup>2</sup> bzw. 5 ml für 75 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen). Im Umkehrmikroskop konnte man das Ablösen des Monolayers verfolgen. Durch leichtes Klopfen der Kulturflaschen an die Handfläche konnte dieser Vorgang mechanisch unterstützt

werden und so, das vollständige Ablösen der Zellen vom Boden der Zellkulturflasche erreicht werden. Die Zellsuspension wurde in das Zentrifugenröhrchen (mit Rundboden, Becton Dickinson) überführt und 3 min in einer Jouan Zentrifuge mit Schwenkrotor zentrifugiert (1100/U= ca. 250 g). Der Überstand wurde vorsichtig abgekippt, das Pellet in 1 ml DMEM/F12 bzw. DMEM resuspendiert. Von dieser Lösung erfolgte nach einer Trypanblaufärbung die Auszählung mittels Neubauer-Zählkammer unter dem Umkehrmikroskop. Aliquote Teile der Suspension wurden auf Zellkulturflaschen (25 cm<sup>2</sup> oder 75 cm<sup>2</sup>) verteilt und dementsprechend die Passage 1 (P1) hergestellt. Meist wurden im Stadium der Passage 2 (P2) die Zellen auf Objektträgerkulturkammern (culture slides, Becton Dickinson) oder FluoroBlok (8µm Inserts 24 Well, Matrigel™, BD Sciences) weiterkultiviert. Bei Erreichen einer ausreichenden Zelldichte auf dem Boden der Objektträgerkulturkammer wurden die Zellen fixiert.

Dafür wurde der Objektträger (2-kammerig):

- kurz in PBS (phosphat puffered saline) gewaschen
- 10 min mit Methanol bei – 20°C ( oder auf Eis ) fixiert
- 3x 2 min in PBS gewaschen

Nach diesem Schritt wurde der Objektträger entweder mit einem Glycerin-PBS-Gemisch (= 90% Glycerin + 10% PBS) bedeckt, bei – 20°C für spätere Versuche zwischengelagert, oder direkt im Anschluss nach Protokoll weiterverarbeitet.

Der Rest der Zellsuspension wurde in flüssigem Stickstoff gelagert und für weitere Untersuchungen bereitgestellt.

**PBS-Lösung:** Ein Liter Lösung enthält: 8,0 g Natriumchlorid (NaCl), 0,2 g Kaliumchlorid (KCl), 1,44 g Dinatriumhydrogenphosphat (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) und 0,24 g Kaliumdihydrogenphosphat (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>)

### 2.1.3 Zellzählung

Zur Zellzählung wurde eine Neubauer-Zählkammer verwendet. Nach Trypsinierung und Zentrifugation wurde das Zellpellet in 1 ml Zellkulturmedium resuspendiert, bei sehr dichter Zellzahl sogar mit bis zu 5 ml Medium verdünnt. Mit einer Pasteurpipette wurde eine kleine Probe der Zellsuspension in die Neubauer-Zählkammer überführt und jeweils 3 kleine Quadranten von jeweils 4 äußeren Quadranten ausgezählt und mit dem Kammerfaktor multipliziert unter Rücksichtnahme des Verdünnungsfaktors. Nach Trypsinierung konnte bei guter Zelldichte eine Zellzahl von circa  $1 \times 10^7$  Zellen/ ml ermittelt werden. Für die Erstellung

einer neuen Zellpassage mussten pro 75 cm<sup>2</sup> Zellkulturflasche 1-2x 10<sup>6</sup> Zellen berechnet werden (für 25 cm<sup>2</sup> ca. 5x 10<sup>5</sup> Zellen).

Bei den doppel-kammerigen Objektträgern reichten ca. 1x10<sup>4</sup> Zellen pro Kammer.

Für die 24-well Fluoroblock insert (Matrigel-gecoatet<sup>TM</sup>, BD Biosciences) benötigte man eine Zellzahl von ca. 2,5. 10<sup>4</sup> Zellen pro insert.

#### **2.1.4 Die mikroskopische Dokumentation der Zelle**

Die Beobachtung und Dokumentation des zellulären Wachstums in vitro ist einer der Grundpfeiler der Zellkultur. Das Bild im Umkehrmikroskop vermittelt direkt Informationen über Wachstumsdichte, Mitoserate, Zellmorphologie aber auch über eine mögliche Kontamination. Am Umkehrmikroskop Nikon Eclipse TS 100 / Zeiss Axiovert S 100 wurde eine fotografische Dokumentation der Zellkulturen durchgeführt.

Die Morphologie der Zelle in vitro ist ein wichtiges Kriterium für die Zellanalyse. Allgemein und besonders in unserem Falle wurde zwischen Fibroblasten bzw. fibroblastoid wachsenden Zellen und den epitheloiden Zellen oder Epithelzellen unterschieden. Dazwischen liegen alle möglichen Übergangsformen. Wie unter 2.1.2 beschrieben, wurden durch den Zusatz von bestimmten epithelialen Wachstumsfaktoren im Medium sowie durch die Beschaffenheit der Wachstumsfläche die notwendigen Voraussetzungen für Proliferation und Differenzierung geschaffen.

Fibroblasten erscheinen in der Regel, in der dicht gewachsenen Kultur, als schmale Zellen mit sehr kleinen Zellkernen mit kaum erkennbaren Nukleoli in einem fischzugartigen Wachstumsmuster. In späteren Passagen oder bei zu dünner Aussaat fallen sie allerdings eher breit aus mit einem großen Zytoplasmasaum.

Entgegen der landläufigen Meinung wachsen Tumorzellen schlecht und relativ langsam in vitro und sind auf einen gut funktionierenden Zell-Zell-Kontakt angewiesen. Somit ist die Zelldichte ein wichtiger Parameter in der Zellkultur, der durch genaue Zellzählung und Zell-Aussaat gewährleistet wird

Epithelzellen zeigen dagegen meist ein kubisches Aussehen mit einem deutlichen Zytoplasmasaum.

Neben Zellform und Wachstumsmuster sind das Kern/Zytoplasmaverhältnis sowie die Nukleoligröße weitere wichtige Kriterien zur Beurteilung der in vitro wachsenden Zelle. Beide Parameter lassen sich im Umkehrmikroskop mit Phasenkontrastierung darstellen und dokumentieren. Große und polymorphe Nukleoli sind bei vielen Tumoren (v.a.

Prostatakarzinom, kleinzelliges Lungenkarzinom) ein Marker zur positiven Identifizierung der Tumorzelle in vivo und in Zellkultur.

### 2.1.5 Immunfärbung

Immunhistochemisch besteht die Möglichkeit, die kultivierten Zellen auf ihre epitheliale bzw. mesenchymale Herkunft hin zu untersuchen. So bietet die Immunfärbung, neben der Morphologie, eine weitere Unterscheidungsmöglichkeit der Zellen. Mit Hilfe von fluoreszenz-farbstoffmarkierten Antikörpern gegen Cytokeratinfilamente (CK18) in epithelialen Zellen und gegen Vimentinfilamente, die für Zellen mesenchymaler Abkunft (Fibroblasten, Chondrozyten, Makrophagen, Endothelzellen usw.) charakteristisch sind, werden die Elemente des Zytoskelettes, Tonofilamente oder intermediäre Filamente, sichtbar gemacht.

Protokoll zur Immunfärbung an Objektkulturkammern (Becton Dickinson):

- Medium absaugen und Objektträger 3x3 min in PBS (Herstellung Seite 19) waschen
- 10 min in Aceton bei – 20°C fixieren
- Culture slide bei Raumtemperatur 10 min in Blockierungslösung (bestehend aus 80 ml Tris/ HCl, 20 ml FCS und 3 g BSA bei pH: 7,2) legen
- Antikörperlösung in 50µl/Kammer: CK 18 (Dako, 1:20 verdünnt in PBS/0,1% BSA) oder Vimentin (Dako, 1:100 verdünnt in PBS/0,1% BSA) 60 min bei Raumtemperatur in feuchter Kammer inkubieren
- 3x3 min in PBS waschen (CK18- und Vimentin markierte culture slides getrennt waschen)
- ab hier im Dunkel arbeiten: sekundäre Antikörperlösung GaM-FITC (Dianova) oder GaM-Cy3 (Dianova) bei der CK18 Färbung im Verhältnis 1:200 und bei Vimentinfärbung 1:100 30 min bei Raumtemperatur in feuchter Kammer inkubieren.
- 3x3 min in PBS waschen
- mit Antifade eindecken
- Aufbewahrung bei 4°C

Die Beurteilung erfolgte am Fluoreszenzmikroskop (Nikon Eclipse TS 900)

### 2.1.6 Kokultivierungssystem für das Harnblasenkarzinom

Das verwendete Kultursystem (Falcon, Becton Dickinson) ist in Abbildung 3 (Seite 23) dargestellt und bestand aus einer Polystyrolplatte (Companionplate) mit 6 Vertiefungen (6-well). In die Vertiefungen wurden Membraneinsätze (insert) eingefügt, mit einer feinporigen Membran aus Polyethylenterephthalat (PET) mit einer Porengröße von  $0,4 \mu\text{m}$  in einer Dichte von  $1,6 \times 10^6/\text{cm}^2$ . Die Poren sind permeabel für höhermolekulare Stoffe wie Nährstoffe, Wachstumsfaktoren, Hormone, usw. Inserts für 6-well-Companionplate haben eine Wachstumsfläche von  $4,2 \text{ cm}^2$ . Die Membranen sind beständig gegen verschiedene Fixiermittel wie Methanol, Ethanol oder Paraformaldehyd. Darüber hinaus sind sie formstabil und lassen sich leicht mit Hilfe eines Skalpells ausschneiden. Bei gleichzeitiger Kultivierung unterschiedlicher Zelltypen in den beiden Kompartimenten (Insert und Companionplate) sind zwischen den zwei verschiedenen Zelltypen bzw. den zwei Kammern parakrine Wechselwirkungen möglich. Aufgrund ihrer Transparenz erweisen sich diese PET-Membranen für die Durchlicht- und Fluoreszenzmikroskopie als geeignet.

Die Beschichtung von Membraneinsätzen erfolgte mit humaner extrazellulärer Matrix (ECM, aus humaner Plazenta, Collaborative Biomedical Products, Becton Dickinson). ECM hat zudem den Vorteil, dass es sich um ein Gemisch aus Laminin, Kollagen IV und Heparansulfatproteoglykan handelt und somit der eigentlichen Basalmembran nahe kommt. Eine Beschichtungskonzentration von  $5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  wurde gewählt. Nach Angaben des Herstellers wurde die ECM-Stammlösung mit serumfreiem Medium auf die benötigte Konzentration verdünnt. Pro Insert ( $4,2 \text{ cm}^2$ ) wurden  $500 \mu\text{l}$  Beschichtungslösung aufgetragen und durch vorsichtiges Schwenken gleichmäßig verteilt. Die Membranen wurden 2 Stunden offen unter der sterilen Werkbank stehen gelassen. Anschließend wurde die überschüssige Lösung abgesaugt und mit serumfreiem Medium gespült. Die beschichteten Inserts konnten direkt eingesetzt werden und mehrere Wochen steril eingeschweißt bei  $4^\circ\text{C}$  gelagert werden.

In dieser Arbeit wurden die gewonnenen Gewebestückchen aus dem Ursprungstumor auf der Membran kultiviert, die Fibroblasten darunter auf dem Kammerboden der Companionplate. Die Fibroblasten stammten nicht vom selben Patienten, da die Gewinnung von Fibroblastenkulturen bis zur Verwendbarkeit in der Kokultivierung etwa 10-20 Tage dauert. Somit handelte es sich um ein heterologes Modell. Auch hier wurden die Stückchen wie in 2.1.2 behandelt.

Die Fibroblasten und deren Abbauprodukte dienten als Attractant zur Migration bzw. Invasion für die Tumorzellen im Insert.

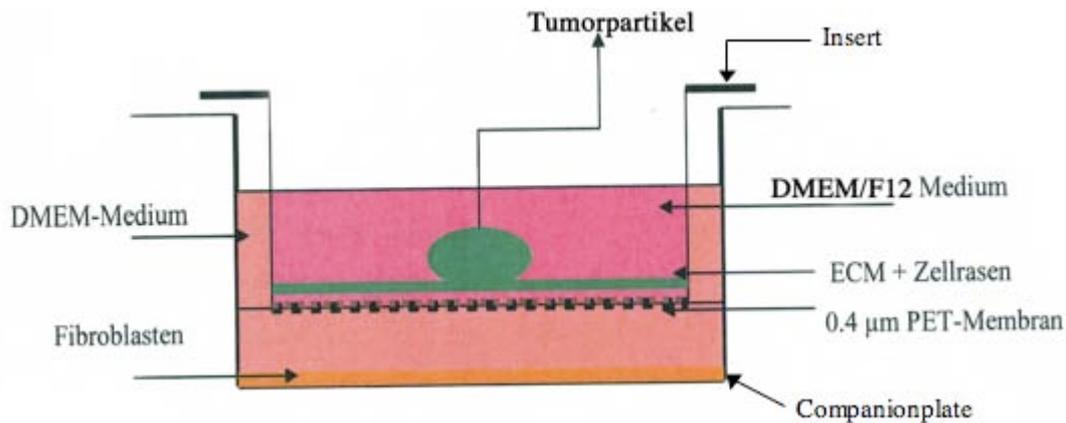


Abb. 3: Ko-Kultivierungsmodell mit Partikel

### 2.1.7 In-vitro-Invasionsmodell für das Harnblasenkarzinom

Als zweiten Ansatz eines in vitro-Invasionsmodell für das Harnblasenkarzinom wurden bereits charakterisierte Harnblasenkarzinomzellen (keine Stückchen, meistens Passage 4-6) aus Primärkultur in 24-well-Membraneinsätze (BIOCOAT Insert Variety Pack, Fluoroblok, 8µm Porengröße, Matrigel- oder Kollagenbeschichtet, BD Biosciences) gebracht. In der Companionplate befanden sich Medium und Attractants. Der Unterschied zur Kokultivierung besteht in der Anwesenheit der Matrigel-Schicht, die die Zellen durchwandern müssen, um auf die Rückseite der Membran zu kommen. Nach ca. 48 Stunden Inkubation im Brutschrank konnte eine Migration der Zellen durch die Matrigelschicht und durch die Poren beobachtet werden. Der Einsatz des Fluoroblocks ermöglicht mittels Propidium-Jodidfärbung den Nachweis der Zellmigration (siehe 2.1.9). An der Unterseite der Membran konnte eine FISH an den gewanderten Zellen durchgeführt werden. Mit der Collagen-Beschichtung, die zuerst angewendet wurde, konnte auch nach 72 Stunden keine Invasion, also Durchwanderung, der Zellen detektiert werden.

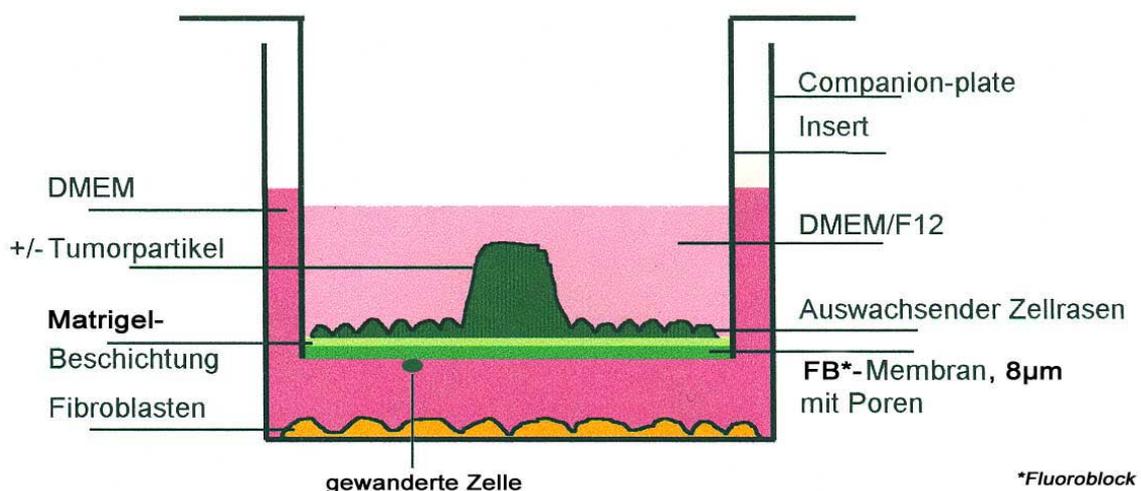


Abb. 4: Invasionsmodell, mit u. ohne Partikel

### 2.1.8 Beschichten mit Kollagen von Membraneinsätzen

Sinn des Beschichtens mit Kollagen war ebenfalls Stromagewebe zu imitieren, und somit möglichst in vivo ähnliche Bedingungen zu schaffen.

Um 24-well Inserts ohne coating (in companion plates, Becton Dickinson Labware) mit Kollagen I zu beschichten galt folgendes Protokoll:

In Abhängigkeit von der benötigten Gesamtmenge an Kollagenlösung (ca. 350 µl pro Well rechnen) ist die benötigte Menge an Kollagen I-Gel (2,9 mg/ml, BD Biosciences) nach folgender Formel zu erhalten:

$$\frac{\text{Endvolumen} \times \text{gewünschte Konzentration (2mg/ml)}}{\text{vorhandene Konzentration}} = \text{benötigte Gesamtmenge Koll-I-Lsg}$$

Der errechneten Collagen I Lösung gaben wir folgendes zu:

- 10 x PBS in Volumen:  $\frac{\text{Endvolumen}}{10}$
- Aqua dest. Auffüllen bis Endvolumen erreicht wurde
- 20 µl Phenolrot (um den pH-Wert anzuzeigen)
- zuletzt 1 N NaOH in geringen Mengen zugeben, tröpfchenweise (5 µl-weise z.B.) zugeben bis die Farbe rot erreicht wurde. Ist die Kollagen-I-Lösung lila, dann muss eine 0,02 N Essigsäure bis zum Farbumschlag nach rot dazugegeben werden.

Bei all diesen Schritten wurden die Lösungen auf Eis verwahrt.

Um die ideale Menge bzw. Schichtdicke zu ermitteln, wurden verschiedene Volumina der Kollagenlösung z.B. 100/150/200/250 µl in die Inserts eingefügt und 30 min bei 37°C inkubieren (gelieren). Nach diesem Schritt wurde Medium (300 µl) auf das Gel gegeben und Zellen eingesät ( $2,5 \times 10^4$  pro Insert).

Erfolg der Invasion der Zellen ( Zellen der Zelllinie T24 ) an die Unterseite des Inserts wurde durch eine anschließende Propidiumjodidfärbung mikroskopisch erfasst. Dabei zeigte sich eine Menge von Collagen I Lösung von 150 bis 200µl als ideale Barriere für die Zellen.

### 2.1.9 Propidiumjodidfärbung

Die Fluoroblock-Membran wurde von beiden Seiten, also von oben und unten, mit 1ml PBS 3 min lang gewaschen. Nach 10 min Fixierung in Methanol (-20°C) erfolgte ein erneuter Waschgang in PBS über 3 min. Anschließend wurde nur von unten (untere Membranseite, also Companionplate) im Dunkeln in einer Propidiumjodidlösung (Propidiumjodid 10 mg, Sigma) 50 µg/ml in PBS 1 min gelagert (eher kürzer als länger).

Im Fluoreszenz-Umkehrmikroskop waren die gewanderten Zellen als leuchtend rote Punkte darstellbar. Zum einen um den Migrationserfolg nachzuweisen, und zum anderen um eine ausreichende Anzahl von Zellen (mindestens 150) für die FISH-Untersuchung sicherzustellen. Mit dem Kollagengel konnte sogar nach 3 Tagen Inkubation keine Migration festgestellt werden, sodass wir uns zum Einsatz von 24-well Platte mit Matrigel-gecoateten inserts entschieden (BD Bioscience). Nach Hydrierung laut Anleitung konnten die Inserts gleich verwendet werden.

## 2.2 Fluoreszenz in situ Hybridisierung

### 2.2.1 Prinzip

Die Fluoreszenz in situ Hybridisierung ist eine Methode, um numerische oder strukturelle Veränderungen von Chromosomen und Genen, wie Amplifikation und Deletion, zu detektieren. Vorteil der Methode ist, dass sie vielfältig einsetzbar ist: an Metaphasen- und an Interphase-Zellkernen wie auch an ganzen Zellen oder sogar Gewebeschnitten. Mit Hilfe von spezifischen Sonden, die vorher markiert wurden, können Zentromere oder Gene von bestimmten Chromosomen dargestellt werden. In dieser Arbeit wurden ausschließlich zentromerspezifische Sonden eingesetzt.

Zur Erfassung von numerischen Aberrationen der Chromosomen 7, 8, 9, 17 und Y in Harnblasen(karzinom)zellen wurden folgende zentromerspezifischen DNA-Sonden eingesetzt.

- Zentromer spez. Sonde 7 (p $\alpha$ 7t1)
- Zentromer spez. Sonde 8 (D8Z2)
- Zentromer spez. Sonde 9 (D9Z1)
- Zentromer spez. Sonde 17 (D17Z1)
- Zentromer spez. Sonde Y (DYZ3)

### **2.2.2 Plasmidisoliation**

Die DNA-Sonden lagen als Plasmide in kompetenten Zellen (*E. coli*) vor. Diese wurden nach Standardprotokollen vermehrt. Die anschließende Plasmidisoliation zur Aufreinigung der Plasmide wurde mit einem Plasmidisolationskit (Plasmid Midi Kit, Qiagen) nach dem Protokoll des Herstellers durchgeführt. Dieser Schritt erfolgte im Institut für Humangenetik der Universität Homburg.

### **2.2.3 Gelelektrophoretische Auftrennung von Nukleinsäuren**

Zur Bestimmung der Fragmentlänge und der Reinheit der isolierten Plasmid-DNA wurde eine Gelelektrophorese durchgeführt (nach Maniatis et al., 1982). Es wurden dabei 1-1,5%ige Agarosegele in 1x TAE-Elektrophoresepuffer verwendet.

1xTAE: 100 mmol Tris-HCL, 50 mmol Acetat, 1 mmol EDTA, pH: 8,0

### **2.2.4 Nichtradioaktive Markierung der DNA-Sonde (Nick-Translation)**

Unter der Verwendung der Nick-Translation (Rigby et al., 1977) zur Markierung einer DNA-Sonde kann deren Hybridisierung mit der Ziel-DNA sichtbar dargestellt werden. Diese Methode beruht darauf, dass DNase I bei sehr niedriger Enzymkonzentration in Anwesenheit von Magnesiumsalzen an statistisch verteilten Stellen eines DNA-Substrats Einzelstrangabschnitte, sog. „nicks“, erzeugt. Die dabei auftretenden freien 3'-OH-Enden dienen der *E. coli* DNA-Polymerase I als Primer. Die DNA-Polymerase I synthetisiert dann komplementär zum unbeschädigten Strang an den „nicks“ in 5'-3'-Richtung neue DNA. Durch die gleichzeitig ablaufende 5'-3'-Exonuklease-Aktivität der DNA-Polymerase I werden vom 5'-Ende der „nicks“ aus Nukleotide abgebaut. Aufgrund dessen wandert die Öffnung im DNA-Strang das Molekül entlang. Durch die DNA-Polymerase I werden die abgebauten Nukleotide durch biotin- oder digoxigeninmarkierte Desoxyribonukleotid-triphosphate ersetzt.

Die in dieser Arbeit eingesetzten DNA-Sonden wurden sowohl mit Biotin als auch mit Digoxigenin markiert. Die Biotinylierung erfolgte mit Biotin-Nick Translation Mix (Roche Molecular Biochemicals) für in situ Sonde nach Angaben des Herstellers, dabei wurde das Biotin als Biotin-14-dATP eingebaut. Zur Markierung mit Digoxigenin wurde das DIG-Nick Translation Mix für in situ Sonden (Roche Molecular Biochemicals) verwendet, wobei dem Nukleotidgemisch das Digoxigenin als dig-11-dUTP zugesetzt wurde.

### 2.2.5 Fällung der markierten DNA

Nach erfolgter Nick-Translation wurden die markierten DNA-Fragmente aus dem Enzym-Nukleotid-Mix durch eine Fällung entfernt.

Protokoll:

- Zugabe von jeweils 10 µg single strand salmon sperm-DNA (ca. 300 bp durchschnittliche Fragmentlänge), 1/30 Volumen Natrium-acetat und 3 Volumen Ethanol abs. zu den Ansätzen
- Inkubation bei – 20°C für mindestens 30 min, über Nacht
- Proben 30 min bei 14000 Upm und 4°C zentrifugieren (Hermle Z233 MK-Kühlzentrifuge- Rotor 220.59 V07)
- Überstand vorsichtig abkippen, das Pellet mit 70% igem Ethanol kurz waschen
- Zentrifugation wiederholen und Überstand erneut entfernen
- Das Pellet 20 min in einer SpeedVac (Appligene) trocknen
- Das Pellet in 30 µl TE-Puffer lösen ( SIGMA TE-Puffer: 10 mmol Tris HCl, pH 7, 0,1 mmol EDTA )

Die in TE-Puffer gelöste DNA kann bei – 20°C aufbewahrt werden.

Die Fragmentlänge der markierten DNA-Sonde wurde mittels Gelelektrophorese, wie unter 2.3.7 beschrieben, kontrolliert. Für die FISH eignete sich eine Fragmentlänge von 200-500 bp am Besten.

### 2.2.6 Dot-Blot

Der Einbau der markierten Nukleotide wurde mit dem Dot-Blot überprüft. Hierzu wurde eine Verdünnungsreihe der markierten DNA-Sonde hergestellt, die auf einen positiv geladenen Nitrozellulosefilter (Millipore) transferiert und über eine enzymgekoppelte Farbreaktion sichtbar gemacht wurde:

- Verdünnung der DNA-Sonde mit A. dest. 1:10, 1:100, 1:1000, 1:10000, 1:100000. Die Proben wurden in aufsteigender Konzentration auf den Nitrozellulosefilter übertragen und getrocknet
- „Crosslinken“ der DNA mittels UV-Strahlung (254 nm, Stratalinker 1800, Stratagene) auf der Membran
- 1 min in Puffer A waschen
- Den Filter 30 min bei 37°C in Dot-Blot-Puffer 1/3% BSA inkubieren und kurz in Puffer A min waschen

- Mit Anti-dig-Alkalischer Phosphatase (1:40000) und/oder Streptavidin-Alkalischer Phosphatase (1:1000) in Puffer 1 30 min bei 37°C inkubieren
- 3x 5 min in Puffer A waschen
- 3x 5 min in Puffer B waschen
- Die Farbreaktion: 44 µl NBT und 33 µl BICP in 10 ml Puffer B auf Membran geben und ca. 5 min bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubieren
- Die Reaktion mit 70% Ethanol abstoppen, bevor die Hintergrundfärbung zu stark wird
- Die Membran trocknen lassen und anschließend in Folie einschweißen

Puffer A: 100 mmol Tris-Base, pH 7,5, 150 mmol NaCl

Puffer B: 100 mmol Tris-Base, pH 9,5, 100 mmol NaCl, 50 mmol MgCl<sub>2</sub>

Anti-dig-Alkalische Phosphatase (Serva)

NBT: Nitroblau Tetrazolium (25 mg/ml, Boehringer Mannheim)

BICP: 5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl Phosphat (50 mg/ml, Boehringer Mannheim)

### 2.2.7 Spezifität der DNA-Sonden

Damit eine Hybridisierung zwischen den doppelsträngigen DNA-Molekülen der Zielsequenz und der Sonden-DNA stattfand, mussten sie in denaturierter Form vorliegen. Darüber hinaus waren mehrere Parameter für den Erfolg dieser spezifischen Bindung entscheidend: die DNA-Konzentration der betreffenden Einzelstränge, die Kationenkonzentration sowie der GC-Gehalt der Nukleinsäuremoleküle (wobei die Schmelztemperatur entscheidend ist). Die optimale Hybridisierungstemperatur in wässrigen Salzlösungen liegt für die meisten Nukleinsäuremoleküle zwischen 60-75°C und damit zu hoch für eine FISH. Um auch thermische Strangbrüche durch diese hohen Temperaturen zu verhindern, wurde der Hybridisierungslösung (kurz Hybmix) Formamid zugesetzt. 1% Formamid senkt die Schmelztemperatur um 0,72°C.

Ein Problem bei der Hybridisierung stellen unerwünschte Fehlhybridisierungen mit ähnlichen Sequenzen anderer Chromosome dar, die durch ungenügend stringente Bedingungen zustande kommen. Aus diesem Grunde war eine optimale Zusammensetzung der Hybridisierungslösung, in der sich die markierte Sonden-DNA befand, besonders wichtig und musste für jede Probe einzeln ermittelt werden. Die optimalen Stringenzbedingungen und die Markierungsqualität der Sonden wurden vor den eigentlichen Versuchen an Lymphozytenpräparaten ausgetestet.

### 2.2.8 FISH an Harnblasenzellen (am Beispiel der 2-kammrigen Objektkulturträger)

Die verwendeten Harnblasenepithelzellen wurden nach dem Auswachsen in der Zellkulturflasche, wie in 2.2.3 beschrieben, auf Objektkulturkammern in der Passage 2 oder 3 gesät und kultiviert.

- Nach Methanolfixierung (bei  $-20^{\circ}\text{C}$ ) 3x 2 min mit PBS/Tween20 0,02% (= 100  $\mu\text{l}$  Tween 20 auf 500 ml PBS) waschen
- 5 min in PFA 4% bei Raumtemperatur unter Abzug fixiert. Ein vorangehender Pepsinverdau ist nicht nötig
- 3 x 2 min in PBS/Tween waschen
- In einer aufsteigenden Alkoholreihe (Ethanol: 50%, 70%, 80% und 96%) je 2 min dehydratisieren und lufttrocknen lassen
- Der Hybmix für die DNA-Sonden 7,8 ,9 ,17 und Y setzte sich folgendermaßen zusammen (insgesamt 10  $\mu\text{l}$ ):
  - 6,0  $\mu\text{l}$  ( 60% ) FA (Formamid)
  - 1  $\mu\text{l}$  20x SSC-Lösung (30 mmol/l Natriumchlorid+ 3 mmol/l Natriumcitrat pH7)
  - 1  $\mu\text{l}$  SSSS (single strand salmon sperm-DNA)
  - 1  $\mu\text{l}$  Aqua dest.

Jeweils 0,5  $\mu\text{l}$  der Sonde 1 (bio-markiert) und Sonde 2 (dig-markiert) oder beim Einsatz nur einer Sonde 0,5  $\mu\text{l}$  Sonde mit zusätzlich 0,5  $\mu\text{l}$  A. dest.

Nach Zugabe der Sonde/-n wurde stets mit einer Pipette vor dem Gebrauch die Lösung vorsichtig gemischt. Auf eine ausgesuchte Stelle, mit dicht-gewachsenen aber nicht überlappenden Zellen, wurden 10  $\mu\text{l}$  Hybmix aufgetragen und mit einem kleinen Deckgläschen (18x18 mm) abgedeckt. Dabei sollte man verhindern, dass sich Luftblasen bilden, um eine bessere Hybridisierung zu ermöglichen. Nach Versiegelung mit Fixogum (Rubber Zement) wurden Ziel- und Sonden-DNA bei  $80^{\circ}\text{C}$  auf einer Heizplatte denaturiert. Die Versiegelung des Deckgläschens mit Fixogum sollte ein Austreten des Hybmix und ein Austrocknen der Zellen bzw. Kerne im Zuge der Denaturierung vermeiden. Dies würde zum einen ein Diffundieren der Sondenfragmente behindern, und zum anderen die Hybridisierungsbedingungen verfälschen.

Die Hybridisierung erfolgte über Nacht in einer feuchten Kammer bei  $37^{\circ}\text{C}$ .

### 2.2.9 Stringenzwaschung und Detektion

Das folgende Protokoll gilt für die Detektion von Doppelhybridisierungen von biotin- und digoxigeninmarkierten Sonden. Die Durchführung aller Schritte erfolgte bei 37°C.

Nach der Hybridisierung wurden das Fixogum und das Deckgläschen vorsichtig entfernt.

- Objektträger 3x5 min in 55% FA (Formamid) / 2x SSC bei 42°C in einem Schüttelwasserbad waschen
- Anschließend Objektträger in 4x SSC/0,05% Tween20 5 min waschen
- 100 µl Blockingreagenz (Roche) 4xSSC-BR (50 µl pro Feld) auf OT pipettieren und längliches Deckglas (24x60mm) drauflegen und 15 min in einer feuchten Kammer inkubieren

Ab hier wurde im Dunkeln gearbeitet, um das Ausbleichen des Flurochroms zu verhindern.

Nach dem Blocken erfolgte die Detektion der biotinylierten Sonde. Dafür wurde Streptavidin FITC (Fluorescein-Isothiocyanat) Stammlösung (DAKO) eingesetzt.

- Inkubation mit Streptavidin FITC in 4xSSC-Blockingreagenz 1:100 Verdünnung, davon 100 µl auf den Objektträger geben, erneute Abdeckung durch ein Deckglas, für 30 min in feuchter Kammer
- 3x 2min in 4x SSC/ 0,05% Tween 20 waschen nach Entfernung des Deckglases

Es folgte die Detektion der digoxigenierten Sonde und eine Verstärkung des Biotin-Signals mit anti-DIG-Cy3-Antikörper (Dianova, Hamburg) und Bio-anti-Streptavidin (Dianova, Hamburg).

- Inkubation in 1:200 Verdünnung beider Antikörper in 4xSSC-BR, davon 100 µl auf den Objektträger, Abdeckung durch ein Deckglas, 30 min in feuchter Kammer.
- Um die Qualität der Signale durch Amplifikation noch zu bessern, erfolgte ein dritter Schritt der Detektion. Hierzu wurden Goat-anti-mouse-Cy3 (Dianova, Hamburg) und Streptavidin FITC (DAKO) eingesetzt.
- Inkubation in 1:200 Verdünnung beider Antikörper in 4xSSC-BR, Abdeckung mit Deckglas, für 30 min in feuchter Kammer.
- 3x2 min waschen in 4xSSC/0,05% Tween20 nach Abschütteln des Deckgläschens

- in aufsteigender Alkoholreihe (Ethanol: 50%, 70%, 80%, 96%) jeweils 5 min dehydrieren.
- Lufttrocknen lassen.
- Zum Schluss wurden die Kerne in Vectaschild Dapi (Vector Laboratories, Burlingame, USA) eingedeckt und konnten untersucht oder bei 4°C gelagert werden.

Verwendete Lösungen:

- 20xSSC: 3 M NaCl, 0,3 M NaCitrat, pH 7
- 5xPBS: 1 g KCl, 1 g KH<sub>2</sub>P0<sub>4</sub>, 40 g NaCl, 7,3 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>3</sub> in 1L A.dest. lösen
- PFA 4%: 8 g PFA (Paraformaldehyd) in 200 ml PBS,
- Blocking Reagenz: 4xSSC, 0,1% Tween20, 0,5 % Blocking Reagent (Roche)

### 2.2.10 FISH an Lymphozyten

Zur Überprüfung der Spezifität und Markierungsqualität der bei der Fluoreszenz in situ Hybridisierung eingesetzten DNA-Sonden war es nötig, diese zunächst auf gesunden Zellen auszutesten. Dazu wurden Lymphozytenpräparate verwendet, die aus Standardprotokollen aus peripherem Blut hergestellt wurden. Die Metaphasepräparate wurden wie unter 2.2.8-9 behandelt, es erfolgte nur zusätzlich vor der Fixierung mit PFA ein Pepsinandaue zur besseren Probenpenetration.

- 15 min Pepsinverdaue: 10 mg/100 ml 0,01 M HCl bei 37°C

Die Sondenqualität wurde in der vorliegenden Arbeit an Lymphozyten aus Vollblut von gesunden Spendern getestet. Die einzelnen Sonden wurden im Institut für Humangenetik hergestellt und in der vorliegenden Arbeit eingesetzt. Für eine möglich exakte Beurteilung, musste eine bestimmte Anzahl von Zellen/Zellkernen ausgezählt und statistisch ausgewertet werden (Kibbelaar et al., 1993). Bei jeder Kontrollhybridisierung wurden mindestens 200 Zellkerne beurteilt. Der Grenzwert (für ein, drei, und mehr Signale) besteht aus dem Mittelwert plus dreifacher Standardabweichung (nach Stilgenbauer et al., 1993). Ein solcher Grenzwert sollte aufgetretene Hybridisierungsartefakte und Fehler bei der Auszählung nachträglich bereinigen. Das ist besonders für die Beurteilung von monosomen Zellpopulationen wichtig. Bei soliden Tumoren ist die Sensitivität, Chromosomenverluste zu erfassen, geringer als Zugewinne zu erfassen (van Dekken et al., 1990; Wolman et al., 1993). Beim Harnblasenkarzinom konnten ähnliche Beobachtungen gemacht werden (Hopman et al., 1989, 1991). Bei einer FISH mit repetitiven Proben an normalen diploiden Zellen trat bei über 15% der Zellen nur ein Signal auf. Aus dem Grunde wurde von einer echten Monosomie von

den Autoren gesprochen, wenn mehr als 20% der Zellen ein Signal aufwiesen. Als Zugewinn galt, wenn mehr als 5 bis 10% der Zellen 3 oder 4 Signale zeigten. Das ist gut im Einklang mit den überlieferten Grenzwerten (für Lymphozyten) des Instituts für Genetik in dieser Arbeit.

### **2.2.11 FISH an Matrigel beschichteten Fluoroblock Invasion chamber mit 8 c-myc**

Die 8q24 (c-myc) spezifische DNA-Probe (Chromosome 8q24/Alphasatellite 8 cocktail Probe, Dual-colour direct labelled, Q-BIOgene) dient der Detektion des C-MYC Genes auf Chromosom 8 in der 8q24 Region, zudem ist eine Chromosome 8 Alpha-Satellit Probe eingebaut, die eine Chromosomenidentifikation erleichtern soll. Die 8 c-myc DNA-Probe ist mit Rhodamin (Exc. max. 565 nm, Em. max. 590 nm) direkt markiert, die 8 Alpha-Satellit Probe mit Fluorescein (Exc. max. 495 nm, Em. max. 525 nm) direkt markiert.

Nach ca. 48 Stunden Inkubationszeit wurden die Companionplate aus dem Brutschrank genommen, das Medium aus dem Insert und Companionplate abgesaugt und mit PBS gewaschen. Danach wurde die Membran vorsichtig mit einem Skalpell aus dem Insert gelöst und mit der Unterseite (mit den gewanderten Zellen) nach oben auf einen Objektträger gelegt. Fixogum wurde rund um die Membran appliziert und luftgetrocknet, um anschließend folgende Schritte durchführen zu können.

- Objektträger mit geklebter Membran 3x3min in 2xSSC waschen
- Nach Methanolfixierung – 20°C 5 min in 4% PFA bei Raumtemperatur fixieren
- Dehydrierung durch aufsteigende Ethanolreihe (50%, 70%, 80%, 95%)
- 2 µl der Sondenlösung auf die Membran geben, mit Deckglas (18x18 mm oder kleiner) bedecken und Fixogum großzügig abdichten
- 10 min auf Heizplatte bei 80°C denaturieren und anschließend über Nacht in feuchte Kammer bei 37°C lagern
- Am nächsten Tag Deckglas und Fixogum mit Pinzette entfernen und die Membran erneut mit Fixogum auf einen Objektträger vor den Waschschrritten anheften.
- Objektträger mit Membran 3x5 min in 4x SSC + 0,1% SDS (Triton) bei 42°C in einem Wasserbad (ohne Schütteln) waschen
- Anschließend 2x5 min in 2xSSC bei Raumtemperatur waschen
- In aufsteigender Ethanolreihe (50%, 70%, 80%, 95%) jeweils 2 min dehydratisieren
- Mit 10µl Vectaschild Dapi (Vector Laboratories, Burlingame, USA) eindecken

### 2.2.12 FISH an 6-well-Insert mit Stückchenkultur

Nach Ausbildung einer Monolayer wurden die Stückchen unter sterilen Bedingungen vorsichtig von der Membran entfernt und in flüssigen Stickstoff aufbewahrt oder weiter in Kultur gebracht. Die Präparate wurden nicht mit Pepsin angedaut und nach 1,2 und 3 minütigem Waschen der Inserts in PBS 10 min in Methanol bei -20°C fixiert. Die Fluoreszenz in situ Hybridisierung sowie die anschließende Stringenzwaschung und Detektion erfolgten nach dem Protokoll unter 2.2.8 und 2.2.9. Vor der Hybridisierung mussten die Inserts mittels Fixogum noch auf einen Objektträger geklebt werden. Vor der Stringenzwaschung wurden die Inserts vom Objektträger wieder gelöst und nach der Detektion wurden die Membranen ausgeschnitten und mit der bewachsenen Seite nach oben auf einen Objektträger mit einem Tropfen Antifade/DAPI aufgelegt. Auf die Membran wiederum wurde ein Tropfen DAPI gegeben und das Ganze mit einem Deckglas (24x60 mm) abgedeckt.

Die Auswertung der FISH gestaltete sich in diesem Ansatz schwierig. Um das Stückchen rum wuchsen die Zellen nicht im Monolayer, so dass die Zellkerne übereinander lagen und eine genaue Zuordnung eines Signals zu einem bestimmten Zellkern nicht möglich war. Die geschichteten Zellen erschwerten wahrscheinlich das Erreichen einer guten Stringenz. Die Stückchenkultur von Harnblasenkarzinom auf Inserts als Ko-Kultivierung bedarf einer Optimierung.

### 2.2.13 Auswertung der FISH

Die Auswertung der FISH wurde an dem Nikon Eclipse TS900 Auflichtfluoreszenzmikroskop mit den entsprechenden Filtern durchgeführt.

	<b>NU ( DAPI )</b>	<b>MWIBA ( FITC )</b>	<b>MWIG ( CY3 )</b>
Anregungsfilter	340-380 nm	465-495 nm	510-560 nm
Emissionsfilter	> 420 nm	515-555 nm	590 nm
Strahlenteiler Transmission	400 nm	505 nm	565 nm

**Tabelle 5: Fluoreszenzfilter für FISH-Auswertung**

Pro Präparat wurden meist 200 Zellkerne auf die Anzahl ihrer Fluoreszenzsignale hin ausgezählt. Das Auszählen der Präparate erfolgte nach den Kriterien von Hopman und Mitarbeitern (Hopman et al., 1991), nach denen überlappende Kerne nicht gewertet werden und Signale, die nicht mehr als eine Signaltbreite voneinander getrennt liegen, als ein Signal

---

gezählt werden. Um die Beurteilung weiter zu standardisieren, nahmen wir noch die Kriterien (Delivee et al., 1988, 1990) in Anspruch:

- die Signale in einem Kern sollen in etwa die gleiche Größe oder die gleiche Intensität besitzen
- gepaart FISH-spots (sogenannte split-spots) werden als ein Signal gezählt
- suboptimale Hybridisierungen (zu hoher Hintergrund, schlechte Morphologie der Zellen, diffuse Signale) sollten wiederholt werden.

Um die Qualität der einzelnen Sonden zu kontrollieren, wurde jede Sonde auf normale Metaphasenchromosomen eines gesunden Spenders hybridisiert. Dabei wurde erwartet, dass für jede Sonde zwei Signale in den Interphasekernen gefunden werden. Um diesen Erwartungswert ergab sich eine Streuung, die z.B. durch Fehlhybridisierungen oder somatische Chromosomenpaarungen zurückzuführen ist. Es ist anzunehmen, dass diese methodischen Gründe auch bei den Metaphasepräparaten der Zellkerne eine Streuung der gleichen Größenordnungen um den tatsächlichen Wert der Zählergebnisse liefern.

Es wurde festgelegt, dass man von einem Chromosomengewinn sprechen kann, sobald mehr als 20% (bzw. 10 %) der Zellkerne 3 oder mehr Signale einer spezifischen Sonde aufweisen und einen Chromosomenverlust sobald sich in mehr als 30% (bzw. 20%) nur ein oder kein Signal der spezifischen Sonde zeigte.

### 3 ERGEBNISSE

#### 3.1 Untersuchtes Material

Das Gewebematerial für die Zellkultur stammte aus Cystektomien von 23 Patienten. Im Schnitt waren die Patienten 72 Jahre alt, die Geschlechtsverteilung sah wie folgt aus: 6 Frauen und 17 Männer. Jeder Patient bzw. jede Harnblase erhielt eine Fallnummer (z.B. BN 38: normale Mukosa des Fall 38). Das Tumorgewebe der Harnblasen wurde im Institut für Pathologie der Universität Homburg histologisch untersucht.

Anhand der TNM-Klassifikation wurden die Tumore von pT1, pN0, GIII bis pT4a, GIII, M1 eingestuft bei ausschließlich vorliegenden Urothelkarzinomen (TCC, transitional cell carcinoma).

Initialen	Geschlecht/Alter	OP-Datum	Fall	Histologischer Befund
K. H.	m/64	14.01.02	31	pT2a, pN0, GII
B. M.	w/79	15.05.02	35	pT3b, pN0, GIII
R. S.	m/75	27.05.02	36	pT3b, pN0, GIII
W.E.	m/77	03.06.02	37	pT3a, pN0, GII
W.H.	m/76	03.06.02	38	pT3a, pN1, GIII
K. R.	m/65	04.06.02	39	pT3b, pN2, pL1, pV1, GIII
K. M.	w/75	05.06.02	40	pT3a, pN2, GII-III
F. G.	m/68	10.06.02	41	pT4a, GIII, M1
H. R.	m/79	10.06.02	42	pT3a, pN2, GIII
L. H.	w/66	09.09.02	43	pT1, pN0, GIII, M0
K. J.	m/78	01.10.02	44	pT4a,pN2,Mx, GIII
Q. H.	m/58	29.10.02	45	PT3b, pN2, Mx, GIII, R0
J. M.M.	m/72	25.11.02	46	pT2b, pN0, GII
S. M.	w/76	25.11.02	47	pT3a, pN0, GIII, M0
S. L.	m/73	12.12.02	48	pT1, pN0, GIII, M0
B. E.	w/65	06.01.03	49	pT1, pN0, GIII
H. I.	w/77	27.01.03	50	pT3a, pN0, GIII, M0
K. R.	m/75	17.03.03	51	pT1, pN0, GIII
S. E.	m/75	17.03.03	52	pT1, pN0, GIII
P. H.	m/74	02.06.03	53	PT3a, pN0, Mx, GIII, R0
S. H.	m/74	07.07.03	54	pT2a, pN0, GIII, M0
S. J.	m/73	07.07.03	55	pT2a, pN0, GIII, M0
M. W.	m/64	08.07.03	56	pT4a, pN1, GII-III

**Tabelle 6: Übersicht des Untersuchungsmaterials mit histologischem Befund des Tumors**

### 3.2 Zellkultur

Von den 23 Fällen konnten 17 verwertet werden. Bei Fall 35, 37 und 44 kam es entweder bei den Tumorstückchen oder den Mukosastückchen, oder in beiden Fällen zu keinem Wachstum unter in vitro Bedingungen. Beim Fall 47 kam es zu einer bakteriellen Kontamination. Bei den Fällen 46 und 56 konnte kein Wachstum epitheloider Zellen festgestellt werden, anders gesagt, es kam zu einer Selektion der Fibroblasten bzw. der fibroblastoiden Zellen.

Die mittlere Zeitspanne ab dem Moment der Primärkultivierung bis zum Erhalt eines dichten (konfluenten) Zellrasens in den 25 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen betrug 14 Tage. Beim Tumorgewebe konnte kein wesentlicher Unterschied in der Proliferationsgeschwindigkeit beobachtet werden. Prostatakarzinomzellen haben im Vergleich in der Primärkultur ein deutlich erhöhtes Proliferationsverhalten mit früher einsetzendem Wachstum (Zwergel et al., 1998), zudem konnten die Stückchen länger kultiviert werden, bis zu drei Monaten. Nach dem zweiten Transfer der Stückchen zeigte sich in dieser Arbeit ein Rückgang bzw. ein Sistieren des Auswachsens. Darüber hinaus konnte beim Versuch des Kultivierens von aufgetauten Harnblasentumorstückchen (in flüssigem Stickstoff gelagert) zu weiteren Versuchansätzen in den meisten Fällen kein Zellwachstum mehr festgestellt werden oder das verzögerte Auswachsen von Zellen mit einer fibroblastoiden Morphologie, die für Tumorzellen und deren genetischen Material nicht repräsentativ gewesen wären.

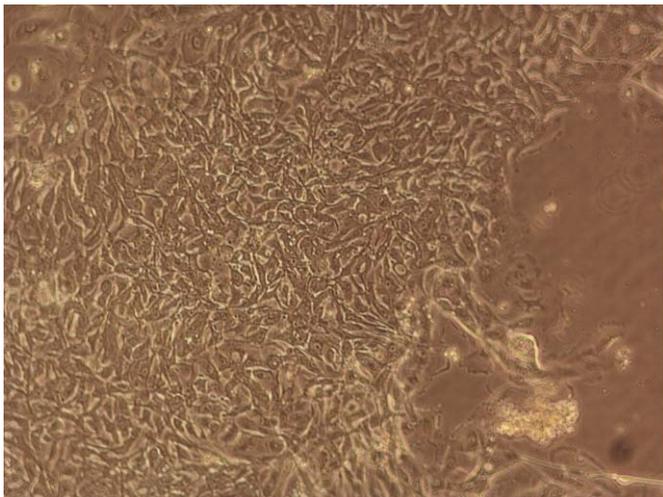


Abb. 2: Zellrasen aus Tumorgewebe Fall BT 53 ( p0st0 )

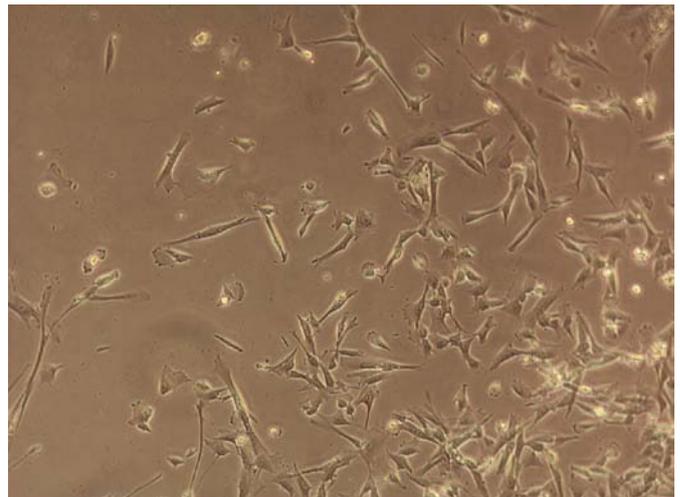
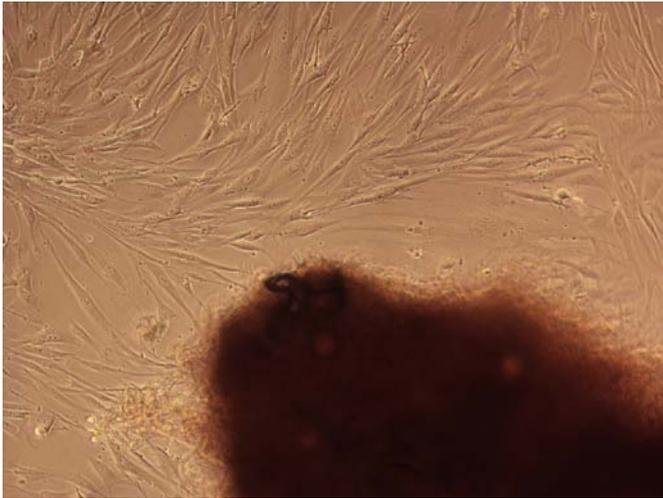
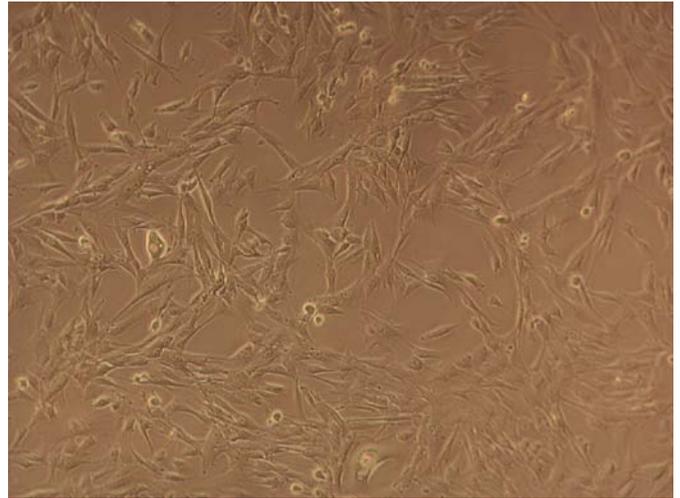


Abb. 3: Tumorzellen Fall BT54 ( p0st0 )



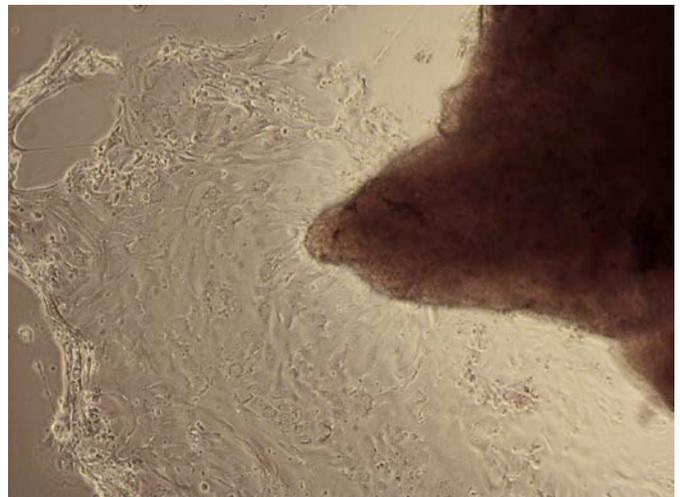
**Abb. 4: Fibroblasten/ Tumorstückchen Fall BF 56 (p0St0) x100**



**Abb. 5: Normale Urothelzellen Fall BN54 (p2st0) x100**



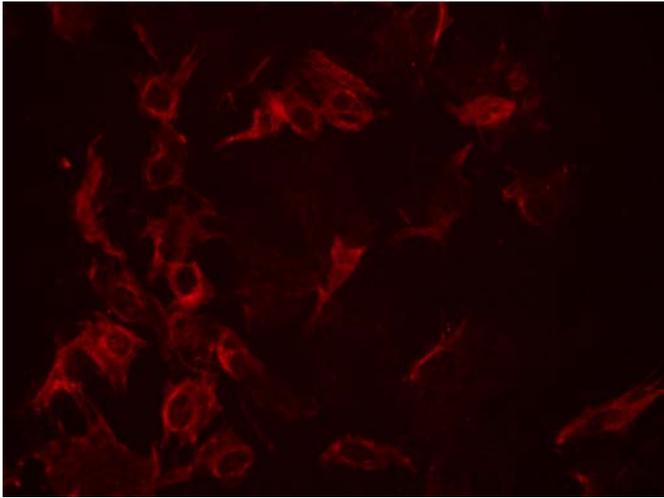
**Abb. 6: Normale Urothelzellen Fall BN48 (p0st0) x40**



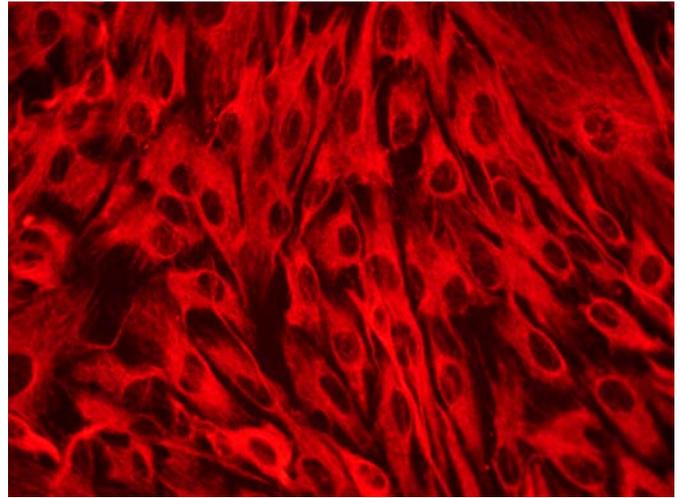
**Abb. 7: Zellrasen an gesundem Urothelgewebe Fall BN43 (p0st0) x100**

### 3.3 Immunzytochemie

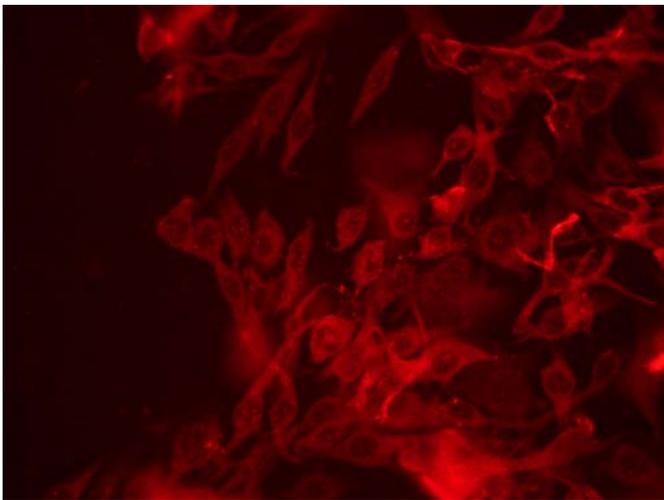
Zur primären Charakterisierung der kultivierten Zellen wurden die Intermediate-Filament-Proteine (IFP) immunhistochemisch dargestellt. Zur Differentialdiagnose und zum Ausschluss von mesenchymalen Zellen (Fibroblasten) wurden Färbungen zum Nachweis von Vimentin und Cytokeratin 18 durchgeführt.



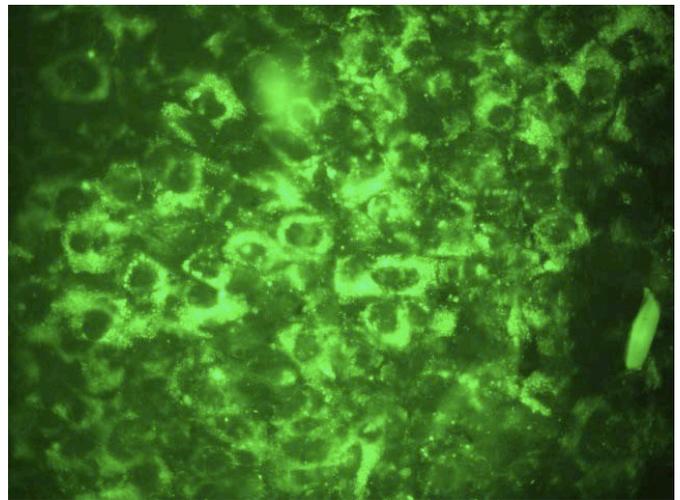
**Abb. 8: Vimentin negative Tumorzellenfärbung Fall BT 56 ( p2st0 ) (x100)**



**Abb. 9: Vimentin positive Fibroblastenfärbung Fall BF56 (p2st0) (x100)**



**Abb. 10: Cytokeratin 18 positive Färbung der Tumorzellen Fall BT49 ( p2st0 ) (x100)**



**Abb. 11: Cytokeratin 18 positive Färbung BT 43 (p2 st 0 ) (x100 )**

<b>Fall- Nr.</b>	<b>BN</b>	<b>BT</b>	<b>BF</b>
31	Cy18+/Vim -	Cy18+/Vim -	Cy18- / Vim +
35	0	0	Cy18- / Vim +
36	Cy18+/Vim -	Cy18+/Vim -	Cy18- / Vim +
37	0	0	Cy18- / Vim +
38	Cy18+/Vim -	Cy18+/Vim -	Cy18- / Vim +
39	Cy18+/Vim -	Cy18+/Vim -	Cy18- / Vim +
40	Cy18+/Vim -	Cy18+/Vim -	Cy18- / Vim +
41	Cy18+/Vim -	Cy18+/Vim -	Cy18- / Vim +
42	Cy18+/Vim -	Cy18+/Vim -	Cy18- / Vim +
43	Cy18+/Vim -	Cy18+/Vim -	Cy18- / Vim +
44	0	0	0
45	Cy18+/Vim -	Cy18+/Vim -	Cy18- / Vim +
46	Cy18-/Vim +	Cy18-/Vim +	Cy18- / Vim +
47	0	0	0
48	Cy18+/Vim -	Cy18+/Vim -	Cy18- / Vim +
49	Cy18+/Vim -	Cy18+/Vim -	Cy18- / Vim +
50	Cy18+/Vim -	Cy18+/Vim -	Cy18- / Vim +
51	Cy18+/Vim -	Cy18+/Vim -	Cy18- / Vim +
52	Cy18+/Vim -	Cy18+/Vim -	Cy18- / Vim +
53	Cy18+/Vim -	Cy1+/Vim -	Cy18- / Vim +
54	Cy18+/Vim -	Cy18+/Vim -	Cy18-/Vim +
55	Cy18+/Vim -	Cy18+/Vim -	Cy18-/Vim +
56	Cy18-/Vim +	Cy18-/Vim +	Cy18-/Vim +

**Tabelle 7: Zusammenfassende Darstellung der Fälle zur Charakterisierung der Primärkulturen hinsichtlich der Differenzierung epitheliales (Cy 18= Cytokeratin) oder mesenchymales (Vim= Vimentin) Phänotyp an Tumorzellen (BT), normales Urothelgewebe (BN) und den Fibroblasten (BF)**

### 3.4 Fluoreszenz in situ Hybridisierung

Die Charakterisierung hinsichtlich genetischer Veränderungen der kultivierten Zellen aus der Primärkultur erfolgte durch FISH mittels zentromer-spezifischen DNA-Sonden der Chromosome 7, 8, 9, 17 und Y. Hierzu wurden die Primärkulturen aus gesund wirkender Mukosa (normal) und Tumorgewebe der Passage 2 bis 3 untersucht.

#### 3.4.1 Ergebnisse der FISH-Untersuchung aller Fälle (Objektkulturkammern)

Fall Nr.	Tumorgewebe Zellkultur	Normale Mukosa Zellkultur
31	+7(10) +8(9) +9(6) -17(8)	+7(4) -8(4) +9(5) +17(0)
36	-7(6) +8(5) -9(7) -17(6)	+7(4) +8(5) +9(4) -17(4)
38	+7(27) +8(11) +9(14) +17(27) -Y(8)	+7(3) -8(5) +9(5) +17(5) -Y(6)
39	-7(12) -8(9) +9(11) +17(13) -Y(44)	-7(3) -8(4) +9(1) +17(4) -Y(5)
40	+7(9) +8(11) +9(9) +17(11)	+7(3) +8(1) +9(5) +17(3)
41	-7(11) -8(8) +9(15) +17(12) +Y(64)	-7(3) -8(3) +9(2) +17(2) +Y(0)
42	-7(10) -8(6) +9(11) +17(11) -Y(23)	-7(3) -8(14) +9(5) +17(5) -Y(11)
43	-7(2) -8(3) -9(5) +17(2)	-7(3) -8(2) +9(2) +17(3)
45	+7(11) +8(11) -9(7) +17(23)	+7(9) -8(8) +9(9) +17(14)
48	+7(5) -8(2) +9(6) +17(8) -Y(23)	+7(2) -8(4) +9(6) -17(2) -Y(24)
49	-7(19) -8(6) +9(4) +17(2)	-7(3) -8(4) +9(2) +17(0)
50	+7(8) -8(6) +9(11) +17(9)	+7(6) -8(5) +9(3) +17(6)
51	+7(0) +8(5) +9(11) +17(9) -Y(5)	+7(2) -8(4) +9(4) +17(2) +Y(1)
52	-7(8) -8(8) +9(10) +17(10) -Y(8)	+7(4) -8(6) +9(5) +17(4) -Y(3)
53	-7(3) -8(13) +9(13) +17(11) +Y(14)	+7(1) -8(2) +9(2) +17(5) -Y(2)
54	-7(11) -8(6) -9(26) +17(17) -Y(8)	-7(4) +8(7) +9(2) +17(5) -Y(2)
55	+7(28) -8(16) +9(14) +17(11) -Y(21)	+7(24) +8(2) +9(10) +17(6) -Y(14)

**Tabelle 8: Verlust - und Gewinn + von Chromosomen: Gegenüberstellung pro Fall Tumorgewebe/ Normale Mukosa in 17 Fällen. Die Zahl in Klammer steht für die Prozentzahl an Gewinn oder Verlust**

Dabei wurden pro Sonde bei jeder Hybrisierung mindestens 200 Interphasekerne ausgewertet (nach den Kriterien von Hopman et al, 1991 und Devilee et al., 1990).

Die Ergebnisse der Primärkultur des Tumorgewebes sind zu besserer Übersicht in nachfolgender Tabelle zusammenfassend aufgeführt.

Fall Nr.	Chromosom 7	Chromosom 8	Chromosom 9	Chromosom 17	Chromosom Y
31	+	+/-	+/-	+/-	
36	+/-	+/-	+/-	+/-	
38	+	+	+	+	+/-
39	-	+/-	+	+	-
40	-	+	+/-	+	
41	+/-	+/-	+	+	+
42	-	+/-	+	+/-	-
43	-	+/-	+/-	+/-	
45	+	+	+/-	+	
48	+/-	+/-	+/-	+/-	-
49	+/-	+/-	+/-	+/-	
50	-	+/-	+	+/-	
51	+/-	+/-	+	+/-	+/-
52	+/-	+/-	+	+	+/-
53	+/-	-	+	+	+
54	-	+/-	-	+	+/-
55	+	-	+	+	-

**Tabelle 9: FISH-Ergebnisse Tumorkultur nach Chromosom: +: Gewinn ( 10 bis 20%), +/-:Euploidie, -: Verlust (10 bis 20%), rot: Gewinn oder Verlust über 20%**

Bei der Bestimmung von Gewinn oder Verlust von Chromosomen setzten wir eine Grenze von 10% an. Die roten Felder zeigen Gewinne bzw. Verluste über 20% ( nach den Kriterien von Hopman und Devilee ).

Zur Veranschaulichung des Unterschiedes in der Aneusomieanzahl in Tumor-/Normalgewebe wurden die 4 Fälle (23,5% der Fälle) hervorgehoben, in welchen auch im Normalgewebe Auffälligkeiten vorkamen. In den restlichen 13 Fällen der normalen Mukosa (76,5%) lag eine Euploidie vor.

	Fall 42		Fall 45		Fall 48		Fall 55	
	BT	BN	BT	BN	BT	BN	BT	BN
<b>Chr. 7</b>	-	2n	+	2n	2n	2n	+	+
<b>Chr. 8</b>	2n	-	+	2n	2n	2n	-	2n
<b>Chr. 9</b>	+	2n	2n	2n	2n	2n	+	+
<b>Chr.17</b>	+	2n	+	+	2n	2n	+	2n
<b>Chr. Y</b>	-	-	0	0	-	-	-	-

**Tabelle 10: Aneuploidievergleich Tumorkultur ( BT) und gesunde Mukosakultur (BN) in 4 Fällen. 2n: Euploidie, - : Verlust, +: Gewinn**

	Chr. 7	Chr. 8	Chr. 9	Chr. 17	Chr. Y
<b>Verlust</b>	6/17	2/17	1/17	0/17	4/10
<b>Gewinn</b>	4/17	3/17	9/17	9/17	2/10
<b>Euploidie</b>	7/17	12/17	7/17	8/17	4/10

**Tabelle 11: Übersicht über Verlust/Gewinn/Euploidie nach Chromosom in den 17 untersuchten Fällen**

Bei Chromosom 7 kam es in 6 von 17 Fällen (35%) zum Nachweis einer Monosomie, in 4 von 17 Fällen (24%) stellte sich eine Polysomie heraus. Der Gewinn von Chromosom 7 war allerdings in 3 der 4 Fälle mit über 20% signifikant erhöht ( siehe Tabelle 8 und 9 ).

Bei Chromosome 8 überwog eindeutig die Euploidie mit 12 von 17 Fällen (71%), es wurden in 2 Fällen eine Monosomie (12%) und in 3 Fällen eine Polysomie (17 %) nachgewiesen.

In 41% der Fälle lag eine Euploidie von Chromosom 9 vor, demgegenüber zeigte sich in 9 von 17 Fällen (53%) eine Polysomie und in einem Fall eine Monosomie.

Bei Chromosom 17 wurde keine einzige Monosomie festgestellt, dafür eine Polysomie in 9 von 17 Fällen, mit sogar über 20%-Gewinn in 3 Fällen (siehe Tabelle 8 und 9). Die restlichen 8 von 17 Fällen waren für Chr. 17 euploid.

Veränderungen von Chromosom Y wurden in 10 Fällen untersucht. In 4 Fällen wurde ein eindeutiger Verlust und in 2 Fällen ein eindeutiger Gewinn festgestellt (z.B. Gewinn von +64% bei Fall BT41)

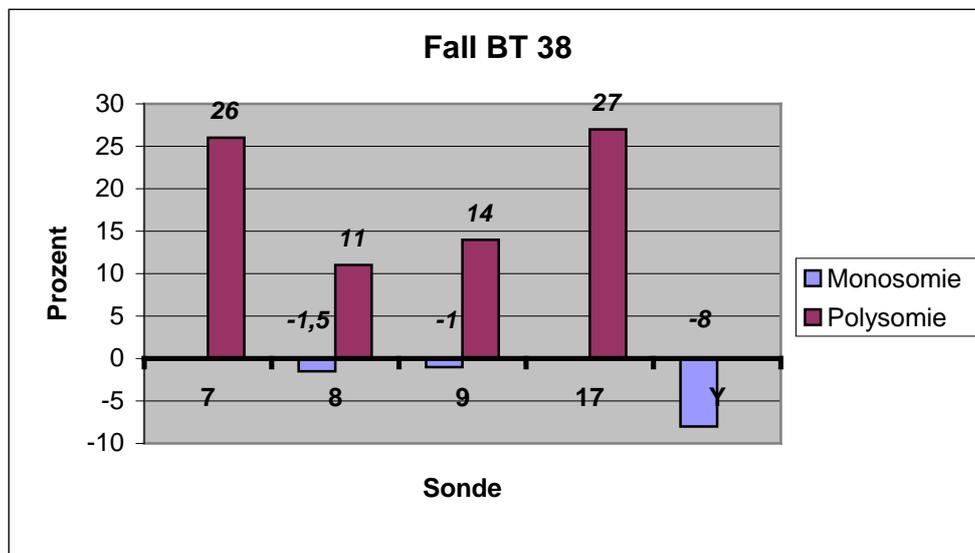
Fälle	31	36	38	39	40	41	42	43	45	48	49	50	51	52	53	54	55
Verlust	0	0	0	2	1	0	2	1	0	1	0	1	0	0	1	2	2
Gewinn	1	0	4	2	2	3	1	0	3	0	0	1	1	2	3	1	3

**Tabelle 12: allgemeine Übersicht über Anzahl von Verlust und/oder Gewinn der untersuchten Chromosome (max. 5) in den Tumorfällen**

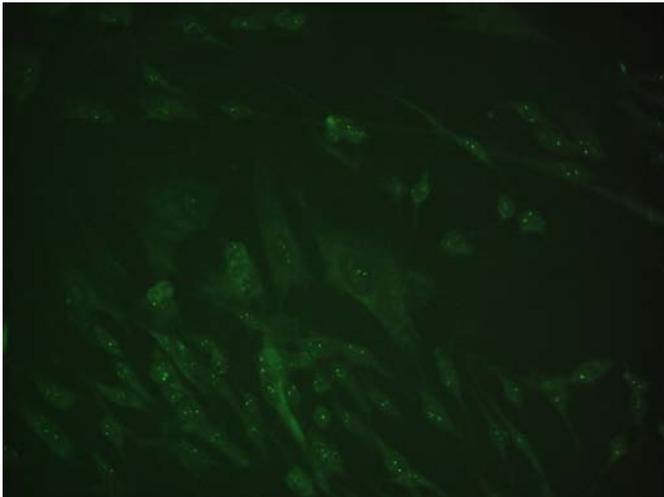
Die Unterschiede in der Signalverteilung zwischen Tumorzellen und Mukosazellen kommen in der oben angeführten Präsentation zur Geltung, aber die signifikanten Einzelwerte gehen in dieser gemittelten Erfassung unter. Daher empfiehlt sich bei einigen Fällen die Einzelfallbetrachtung.

**Fall 38 – TNM Klassifikation: pT3a, pN1, GIII**

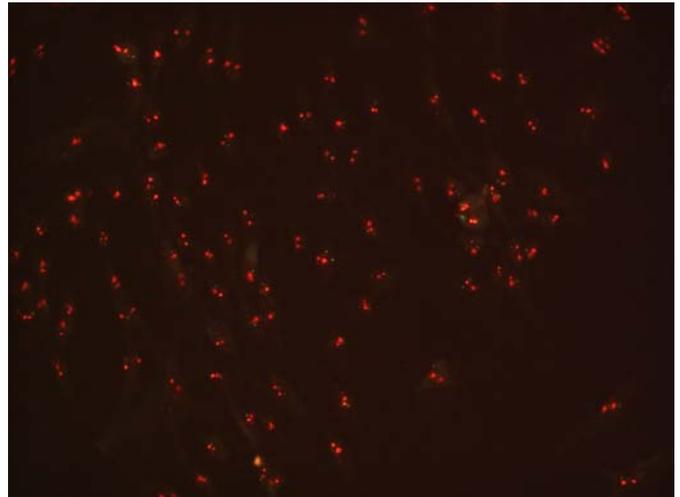
In diesem Fall konnte in den Tumorzellen eine signifikante Polysomie der Chromosomen 7 (+26%) und 17 (+27%) dokumentiert werden. Bei den Chromosomen 8 und 9 ebenfalls war ebenfalls ein Gewinn zu verzeichnen, aber nicht im signifikanten Bereich. Keine Auffälligkeiten bei Chromosom Y. An den normalen Mukosazellen Nachweis einer Diploidie für alle untersuchten Chromosome.



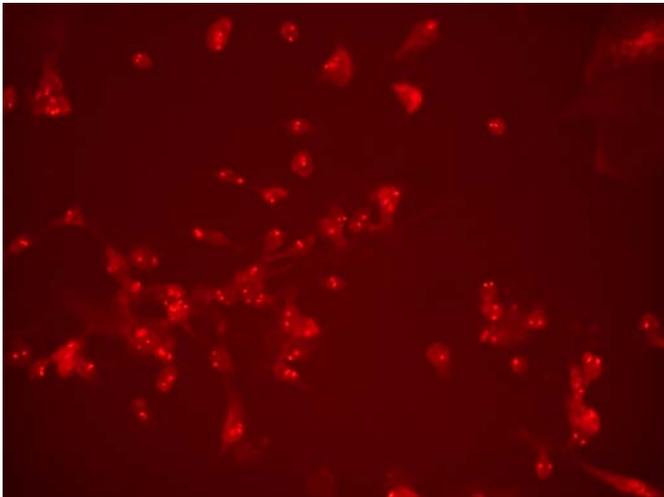
**Abbildung 12: Histogramm Aneuploidie-Übersicht BT38**



**Abb. 13: BT38 #7 grün, Zellen mit 3 Signalen (x40)**

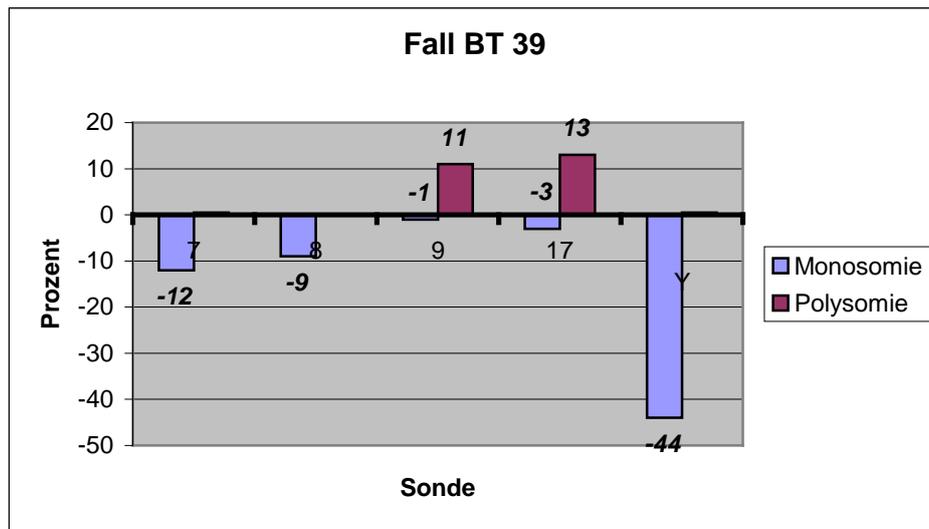


**Abb. 13: BT38 #7 (grün) und #17 (rot) (x 40)**



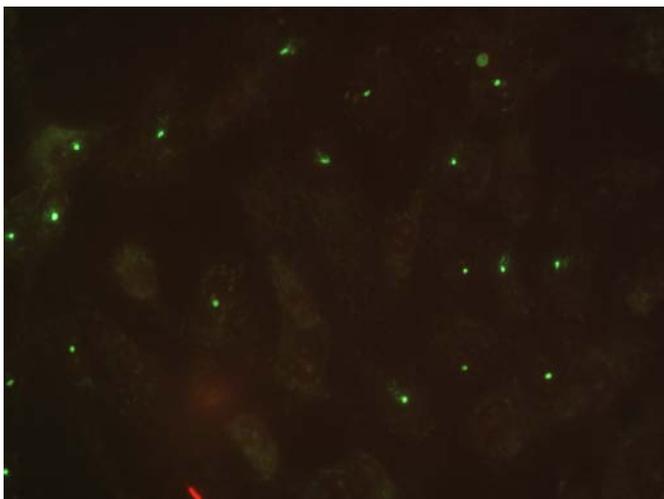
**Abb. 14: BT 38 #17 rot, Zellen mit 3 bis 4 Signalen ( x 40 )**

**Fall 39** – TNM- Klassifikation: pT3b, pN2, L1, pV1, GIII

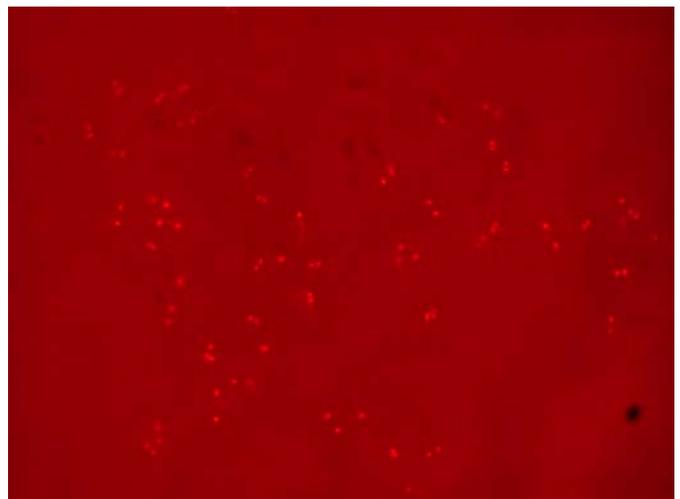


**Abbildung 15: Histogramm Aneuploidie-Übersicht BT 39**

In diesem Fall zeigte sich beim Tumorgewebe ein signifikanter Verlust von - 44% bei Chromosom Y (siehe Tabelle 8). Bei den Chromosomen 9 und 17 konnte ein Gewinn (+11% und +13%) und bei Chromosom 7 ein Verlust (-12%) ermittelt werden. Für das Chromosom 8 und die gesamten Chromosome des gesunden Mukosagewebes konnte eine Diploidie nachgewiesen werden.



**Abb. 16: BT39 # Y grün ( x100 )**



**Abb. 17: BT39 #17 rot ( x40 )**

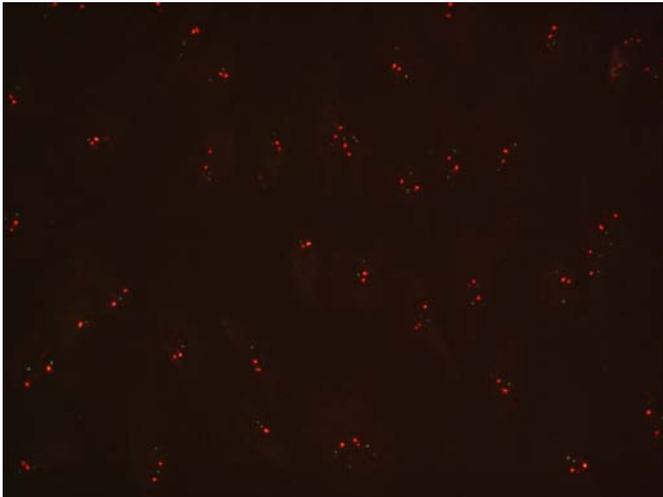


Abb. 18: BN 39 # 7 grün und 17 rot ( x40)

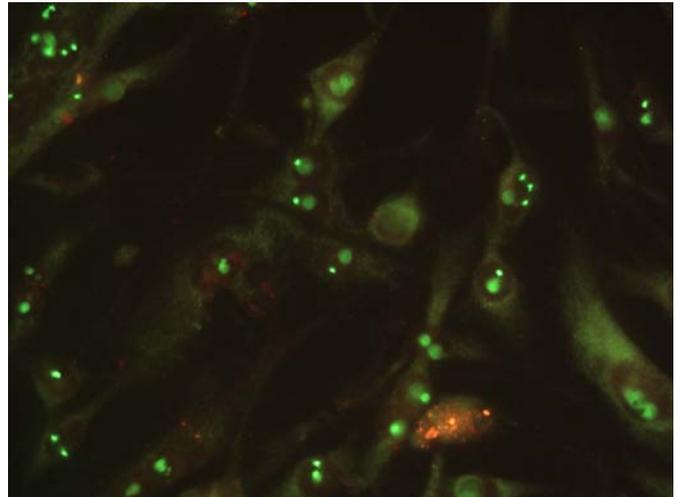


Abb. 19: BT41, # Y grün ( x100 )

**Fall 41** – TNM-Klassifikation:pT4a,M1,GIII

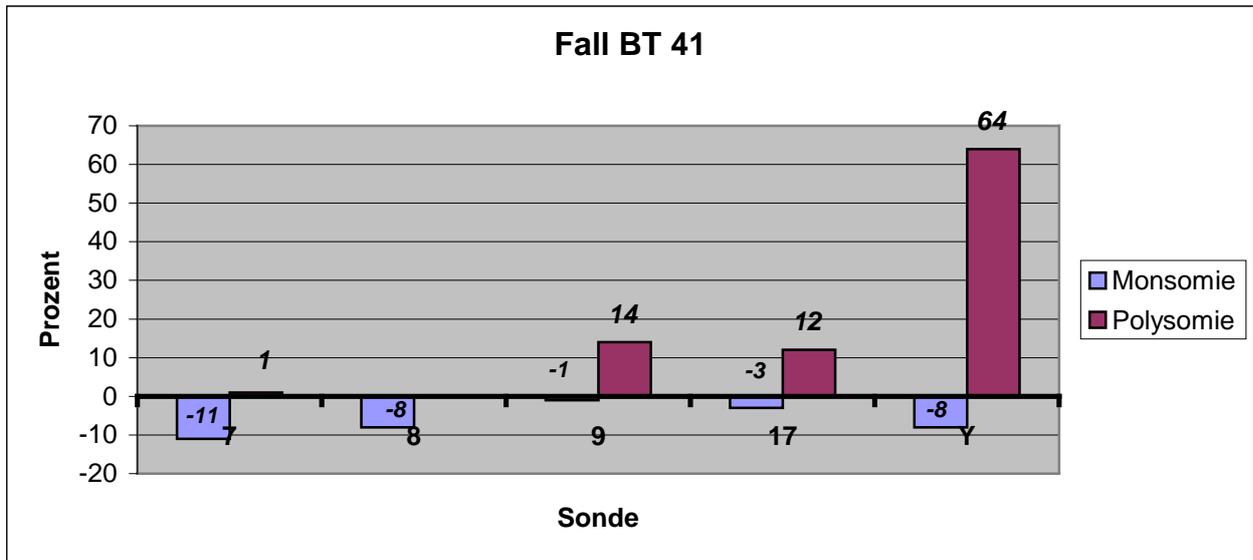


Abbildung 20: Histogramm Aneuploidie-Übersicht Fall BT41

In diesem Fall wurde bei den Tumorzellen ein deutlicher Gewinn des Chromosoms Y dokumentiert (+ 64%, im Vergleich zu 0% bei den normalen Mukosazellen). Wie auch im Fall 39 konnten ebenfalls Gewinne bei den Chromosomen 9 und 17 nachgewiesen werden. Bei den untersuchten Mukosazellen zeigten sich keine Auffälligkeiten.

**Fall 42**– TNM-Klassifikation: pT3a, pN2, GIII

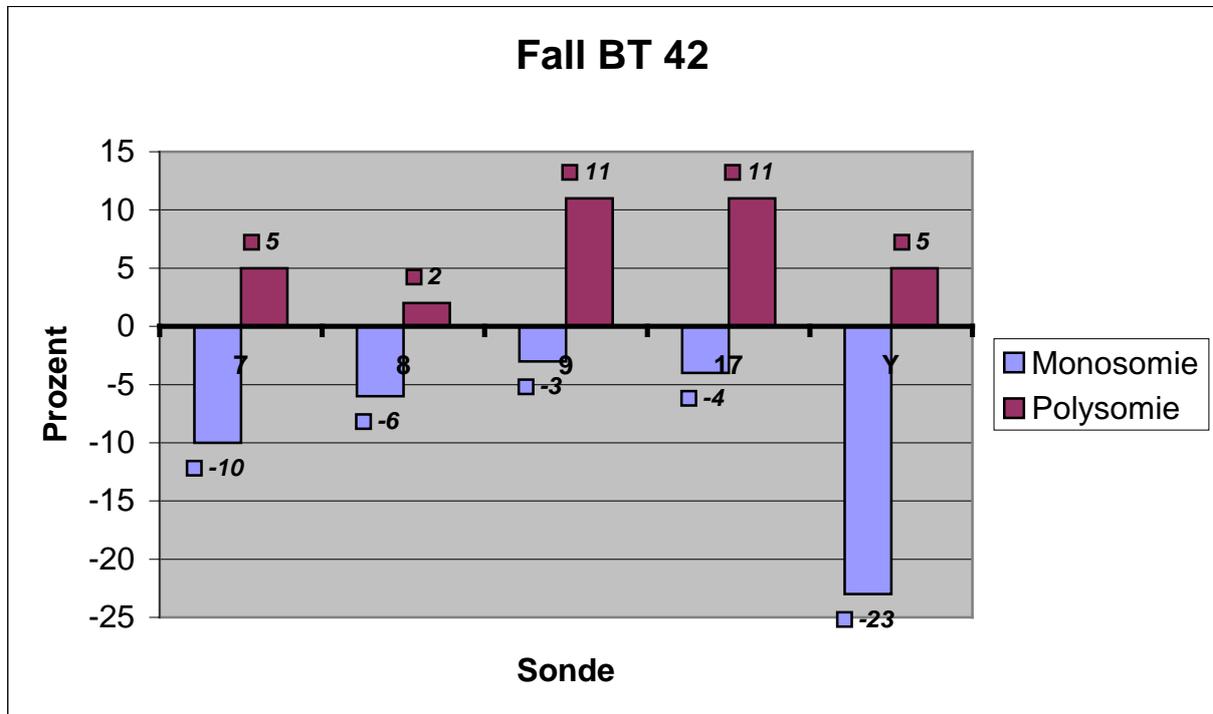


Abbildung 21: Histogramm Aneuploidie-Übersicht Fall BT 42

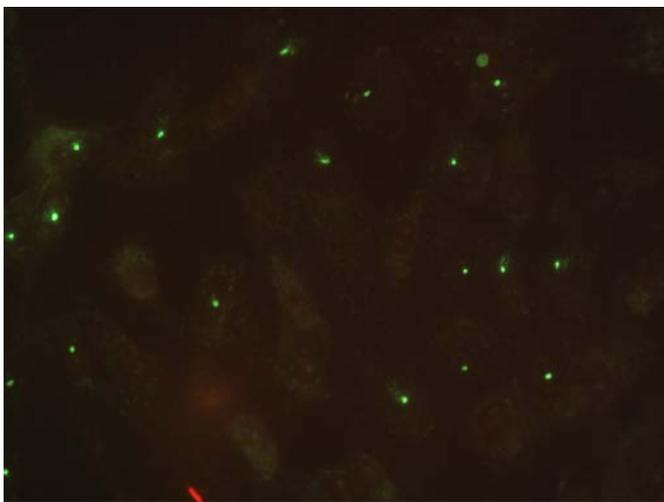


Abb. 22: BT42, #Y grün ( x100 )

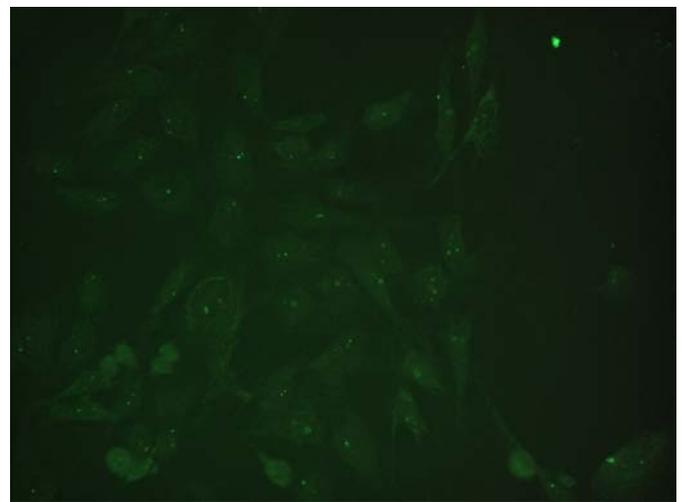


Abb. 23: BT42, #7 grün ( x 40 )

Ein Verlust des Chromosom Y (-23%) konnte hier bei den Tumorzellen dokumentiert werden. Die Chromosomen 9 und 17 wiesen einen Gewinn (jeweils + 11%) und das Chromosom 7 einen Verlust mit – 10% auf. Auch hier konnte bei den gesunden Mukosazellen keine Aneuploidie festgestellt werden.

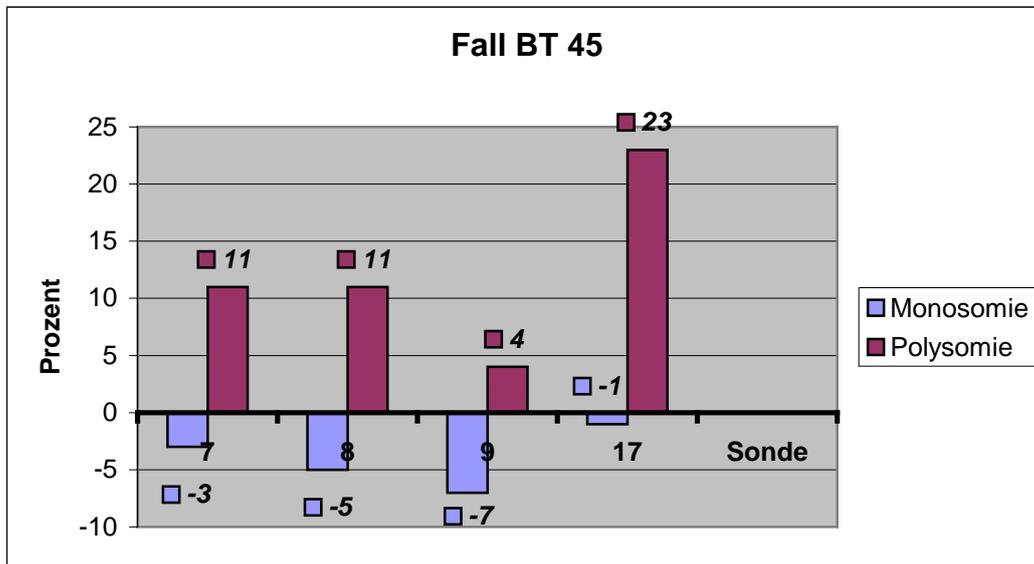
**Fall 45** - TNM-Klassifikation: pT3b, pN2, Mx, GIII

Abbildung 24: Histogramm Aneuploidie-Übersicht BT 45

Wie im Fall 38 konnte hier Polysomie des Chromosoms 17 signifikant (+ 23%) festgestellt werden. Interessanterweise zeigte sich bei diesem Chromosom im normalen Mukosagewebe auch ein Gewinn mit + 14%.

Bei den Chromosomen 7 und 8 zeigte sich im Tumorfall ein Gewinn (jeweils mit 11 %), bei Chromosom 9 zeigte sich ein grenzwertig signifikanter Verlust mit - 9%.

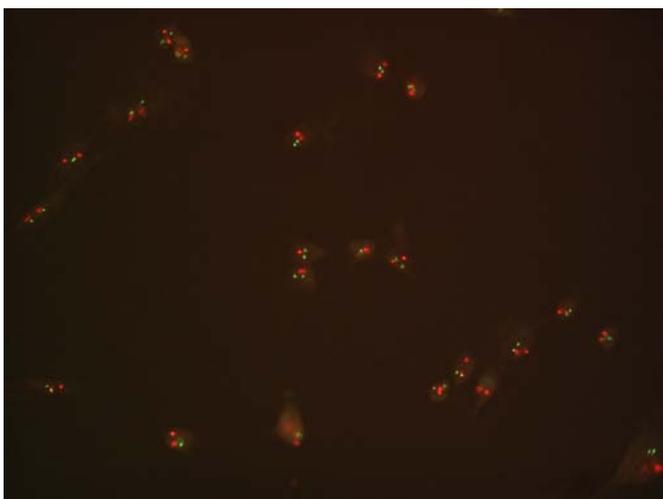


Abb. 25: BN45 # 9 rot und 8 grün (x 40)

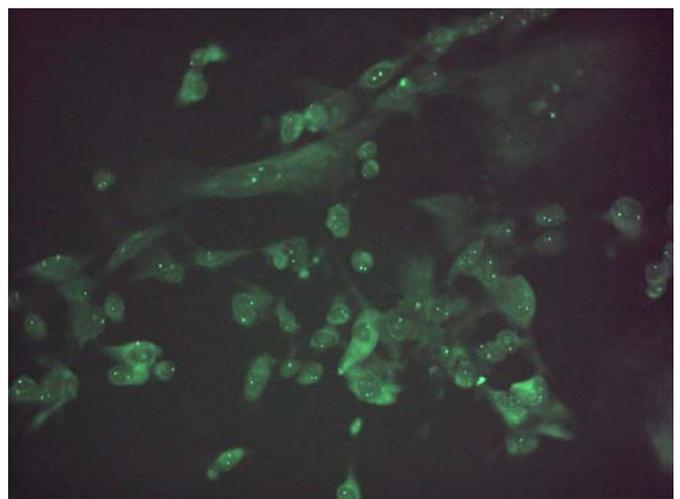


Abb. 26: BT45 # 7 grün ( x 40 )

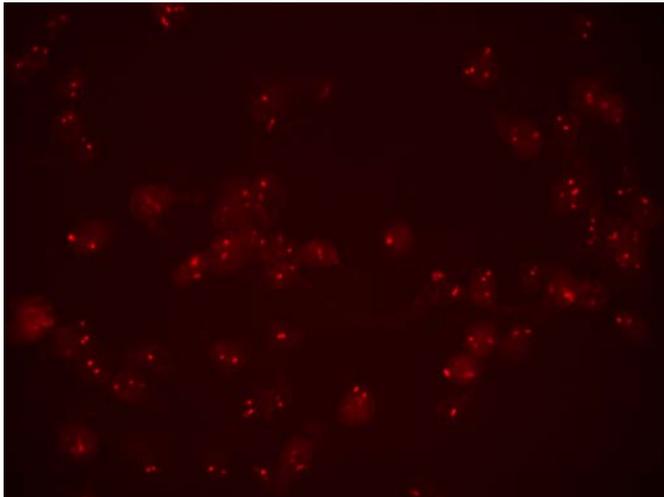


Abb. 27: BT 45 # 17 rot ( x 40 )

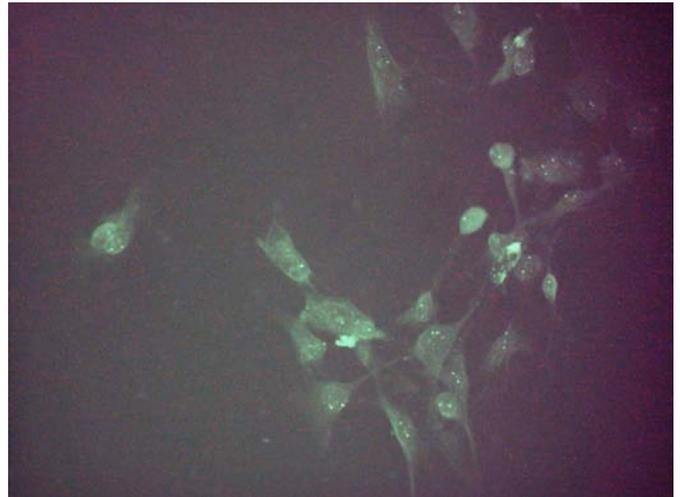


Abb. 28: BT45 #7 grün ( x 40 )

**Fall 48** - TNM-Klassifikation: pT1, pN0, GIII, M0

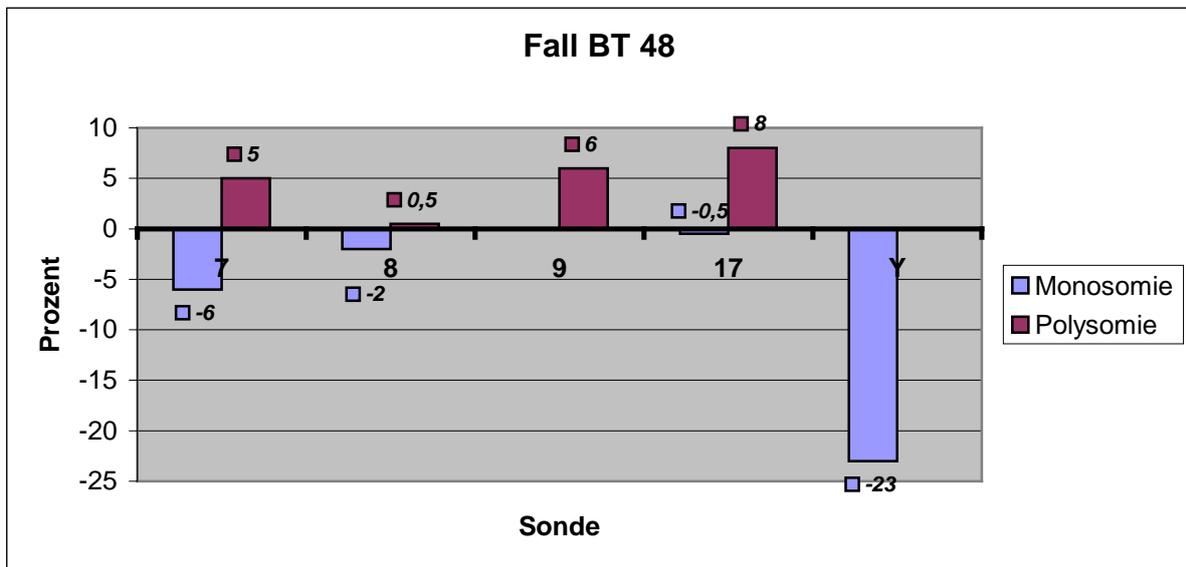
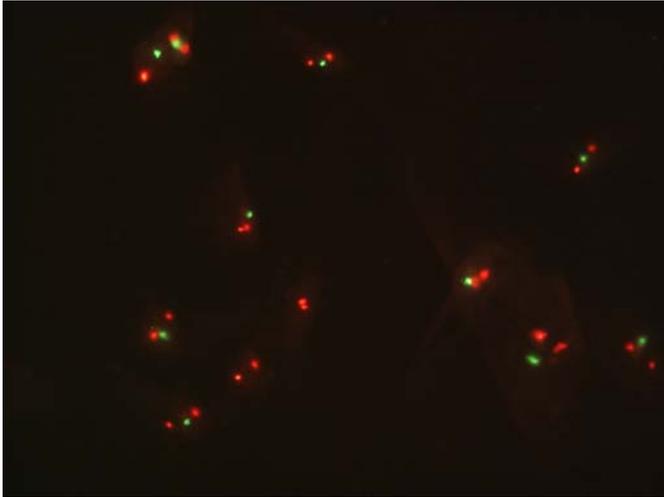
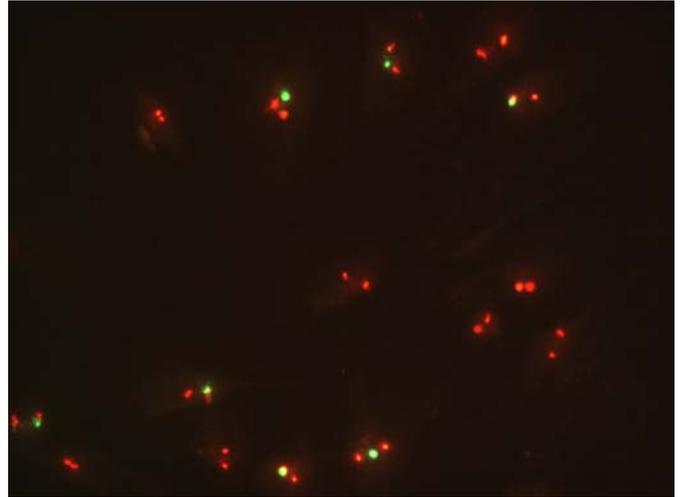


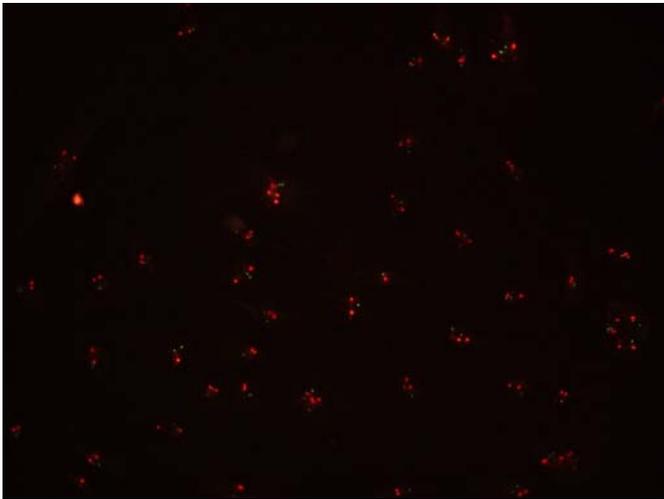
Abbildung 29: Histogramm Aneuploidie-Übersicht BT 48



**Abb. 30: BT48 # Y grün und # 9 rot ( x 100 )**



**Abb. 31: BN48 # Y grün und 9 rot ( x 100 )**



**Abb. 32: BN48 # 7 grün und 17 rot ( x 40 )**

Sowohl bei den Zellen aus dem Tumorgewebe als auch bei denen aus der gesund wirkenden Mukosa zeigte sich ein signifikanter Verlust des Chromosoms Y (jeweils – 23% und – 24%). Bei den anderen untersuchten Chromosomen konnten weder bei Tumor noch Mukosa Auffälligkeiten festgestellt werden.

**Fall 54** - TNM-Klassifikation: pT2a, pN0, GIII, M0

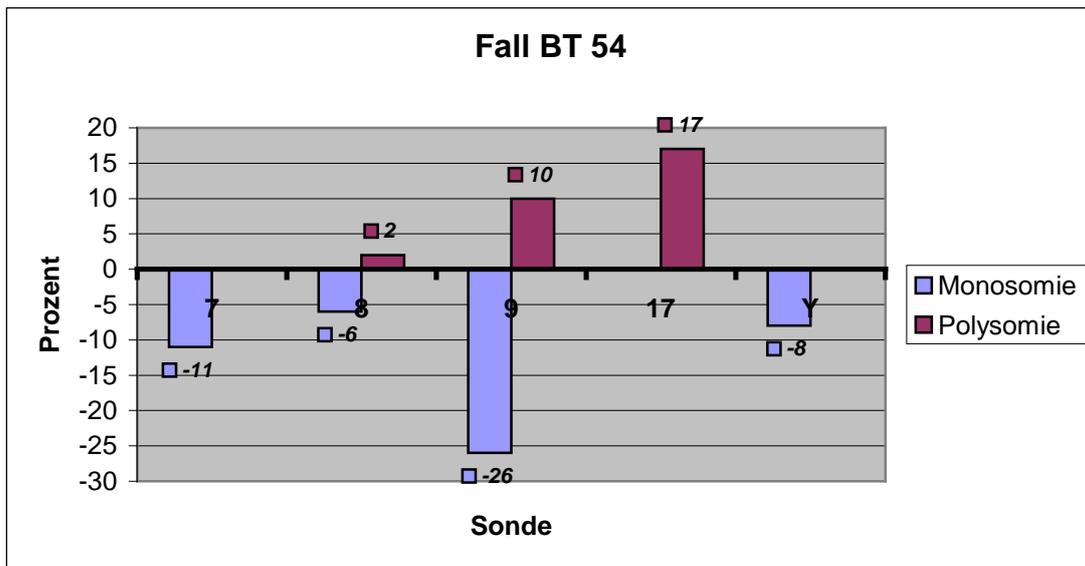


Abbildung 33: Histogramm Aneuploidie-Übersicht BT 54

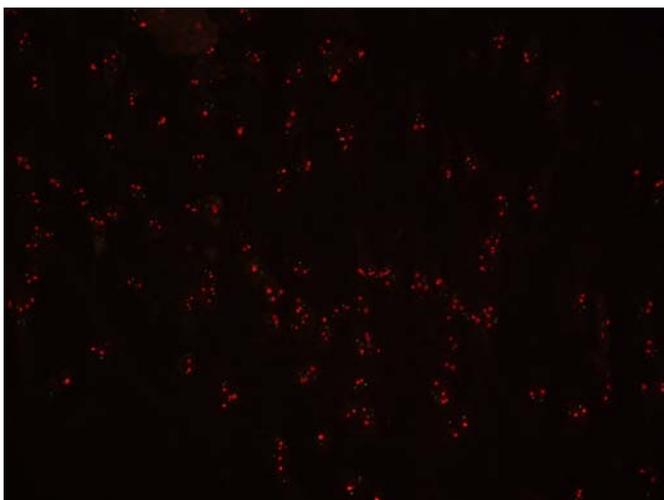


Abb. 34: BT 54 # 7 grün , # 17 rot ( x 40 )

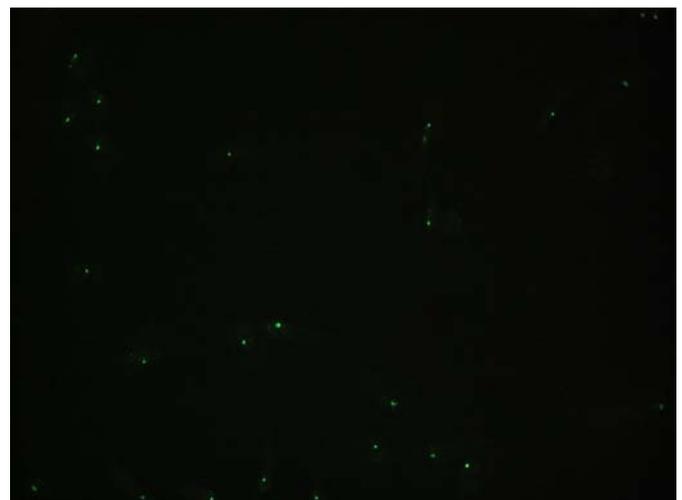


Abb. 35: BT54 # 7 grün ( x 40 )

In diesem Fall konnte ein Gewinn von Chromosom 17 (+17%) in Tumorzellen festgestellt werden. Darüber hinaus zeigte sich in diesem Fall interessanterweise ein mäßiger Verlust bei den Chromosomen 7 (-11%) und 9 (-16%). In der FISH-Untersuchung an den gesunden Mukosazellen lagen regelrechte Chromosomensätze vor.

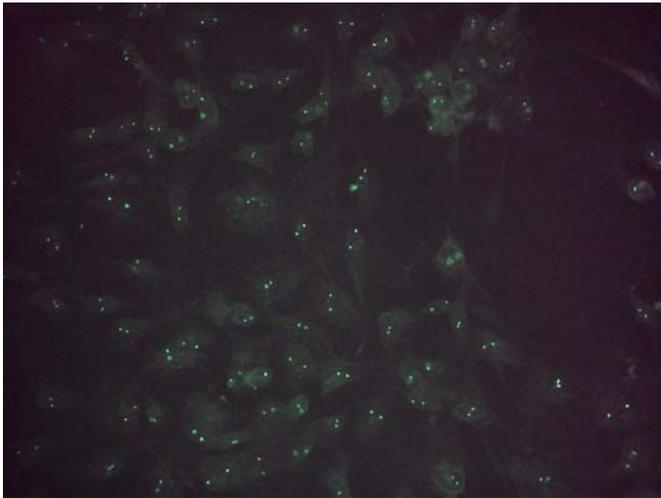


Abb. 36: BT 54 # 8 grün ( x 40 )

**Fall 55** - TNM-Klassifikation: pT4a, pN1, GII-III

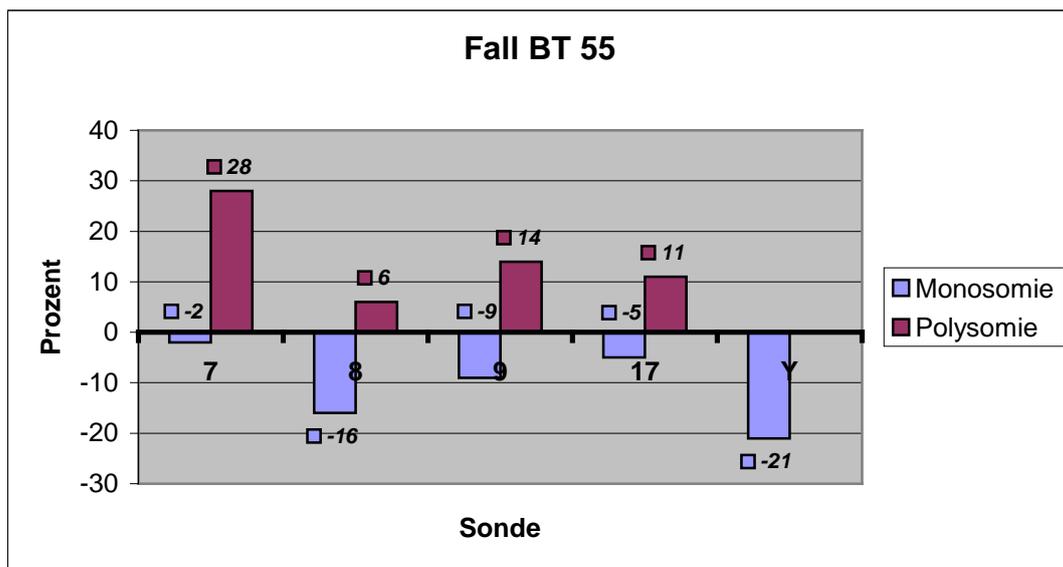


Abbildung 37: Histogramm Aneuploidie-Übersicht BT 55

In diesem Fall konnte für das Chromosom 7 ein signifikanter Gewinn (+ 28%) sowie ein signifikanter Verlust für das Chromosom Y (-21%) nachgewiesen werden.

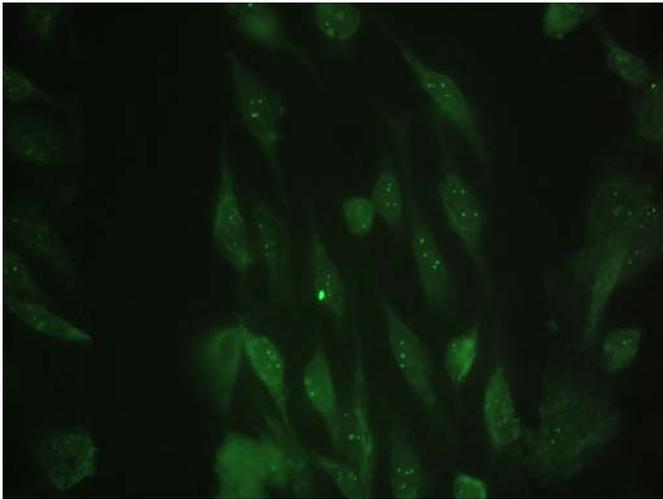


Abb. 38: BT55 # 7 grün ( x 100 )

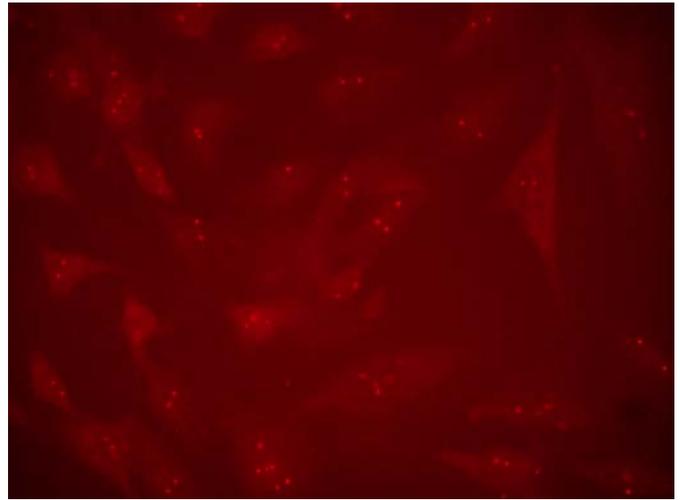


Abb. 39: BT55 # 9 rot ( x 100 )

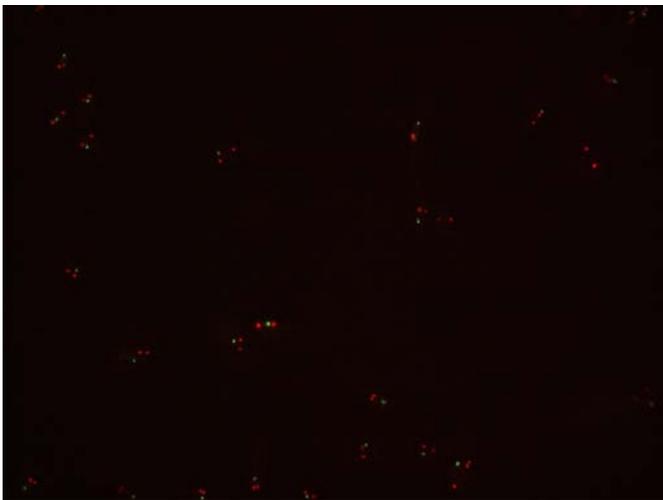


Abb. 40: BT55 # 17 rot , # Y grün ( x 40 )

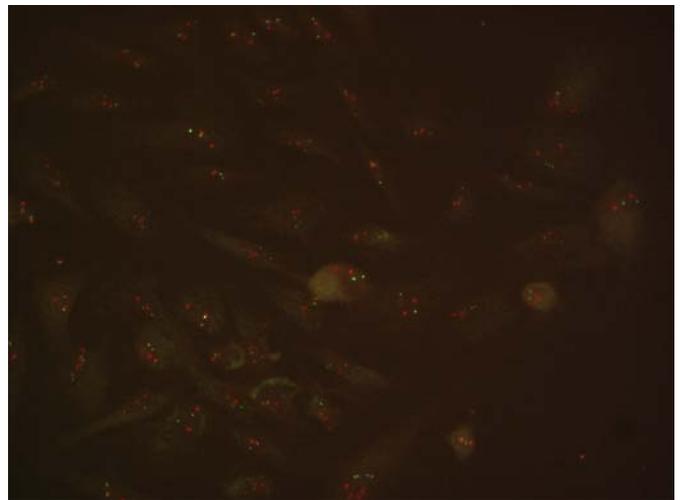


Abb. 41: BN55 # 8 grün und # 9 rot ( x 40 )

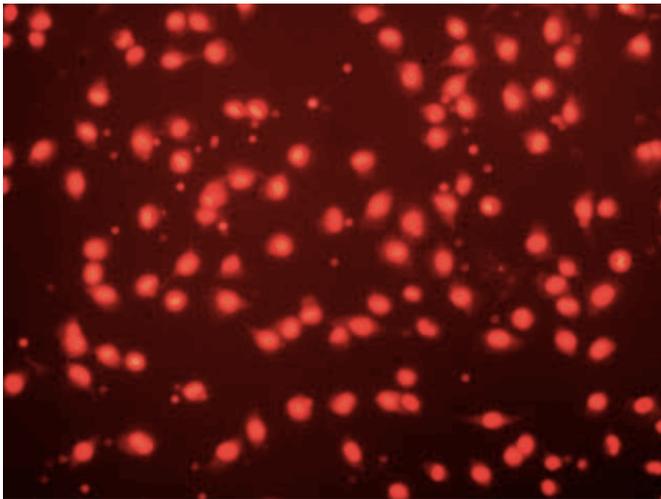
Zusammenfassend konnten unabhängig von Stadium und Grad der Tumore Aneuploidien festgestellt werden. Die fortgeschrittenen Tumore zeigten multiple Aneuploidien (siehe Tabelle 11, Seite 43) wie die Fälle 39 und 41 mit Tumorgrad IV und histopathologischem Nachweis von Veneneinbruch, lymphangitischer Karzinose sowie Metastasierung. Aber auch pT1 GIII und pT2 GIII wiesen signifikante Aneuploidien auf. Somit wiesen Tumore, die noch keine Lymphknotenmetastasen oder Organüberschreitungen histologisch zeigten, chromosomale Veränderungen wie fortgeschrittene Tumore pT3-pT4 auf.

In der Primärkultur der normalen Mukosa wurden deutlich weniger Aneuploidien nachgewiesen, und wenn, spiegelten sie die Veränderungen des dazugehörigen Tumors wieder.

### 3.4.2 Invasionsmodell Fluoroblock/ Matrigel.

Die genetische Charakterisierung invasiv wachsender Karzinomzellen aus der Primärkultur wurde exemplarisch an folgenden 4 Tumorfällen durchgeführt: Fall BT38, BT43, BT45, BT49. Die Passage der Zelllinien betrug p5 bis p6 (im Vergleich zu p2 bei den in 3.4.1 untersuchten Fällen).

Nach einer Inkubationszeit von 2 bis 3 Tagen der ausgezählten Zellmenge und nach Kontrolle der Migration durch die Matrigelschicht und die Poren mittels Propidiumiodid-Färbung (2.2.9) erfolgte die Fluoreszenz in situ Hybridisierung (nach dem Protokoll in 2.3.15). Parallel zu diesem Ansatz erfolgte die Anzucht derselben Primärkultur und Passage auf Objektkulturkammern, die ebenfalls auf das Chromosom 8 mit derselben Sonde zum Vergleich untersucht wurden. Mit Collagen-I-Beschichtung kam es auch nach 72 h zu keiner Durchwanderung der Zellen.



**Abb. 42: Kontrolle der Invasion durch Matrigel von Zellen der Zelllinie T24 nach ca. 24 Stunden, Propidiumjodid-Färbung an Fluoroblok-Membran ( x 40 )**

Der Versuch eingefrorene Tumorpartikel in dieser Versuchsaufstellung zu kultivieren scheiterte. Die aufgetauten und wieder in Kultur gebrachten Tumorstückchen zeigten entweder kein Zellwachstum oder eine Proliferation von langsam wachsenden fibroblastoiden Zellen.

Die Auszählung der Signale erfolgte nach denselben Kriterien wie in 2.3.17.

**Fall BT38** - TNM Klassifikation: pT3a, pN1, GIII

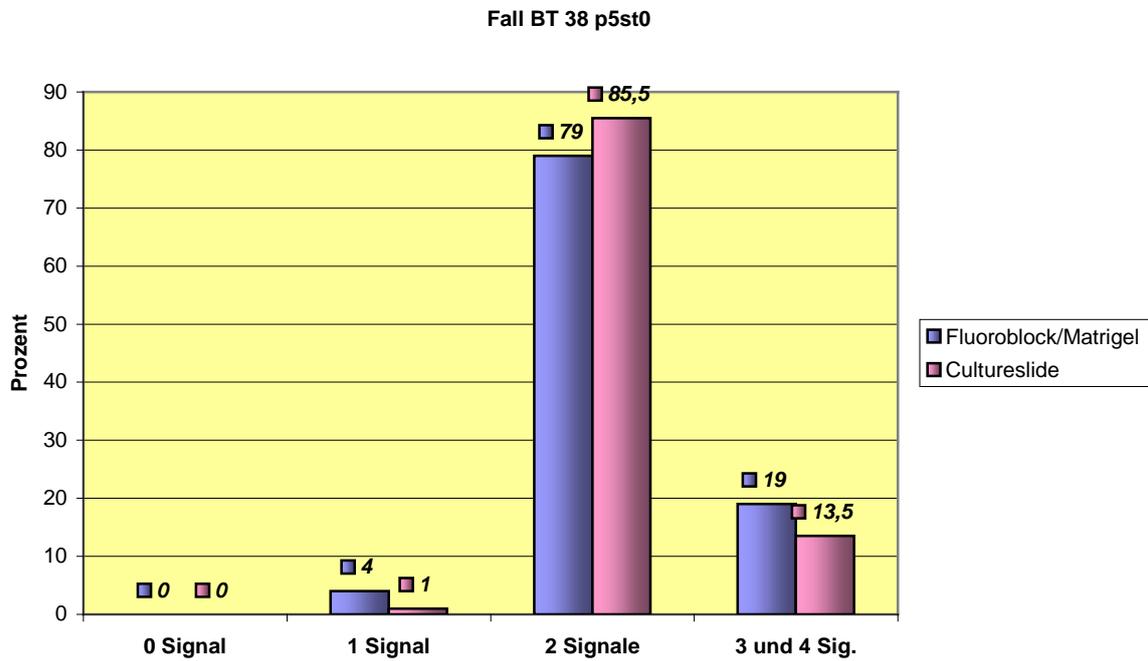


Abbildung 43: Histogramm Sonde 8 Fall BT 38



Abb. 44: BT38 p5st0 8-myc Fluoroblok (x100)

In diesem Fall konnte nachgewiesen werden, dass die charakterisierten Zellen im Invasionsmodell mehr Polysomien für Chr. 8 boten als die Zellen in der klassischen Zellkultur.

**Fall BT43** - TNM-Klassifikation: pT1, pN0, M0, GIII

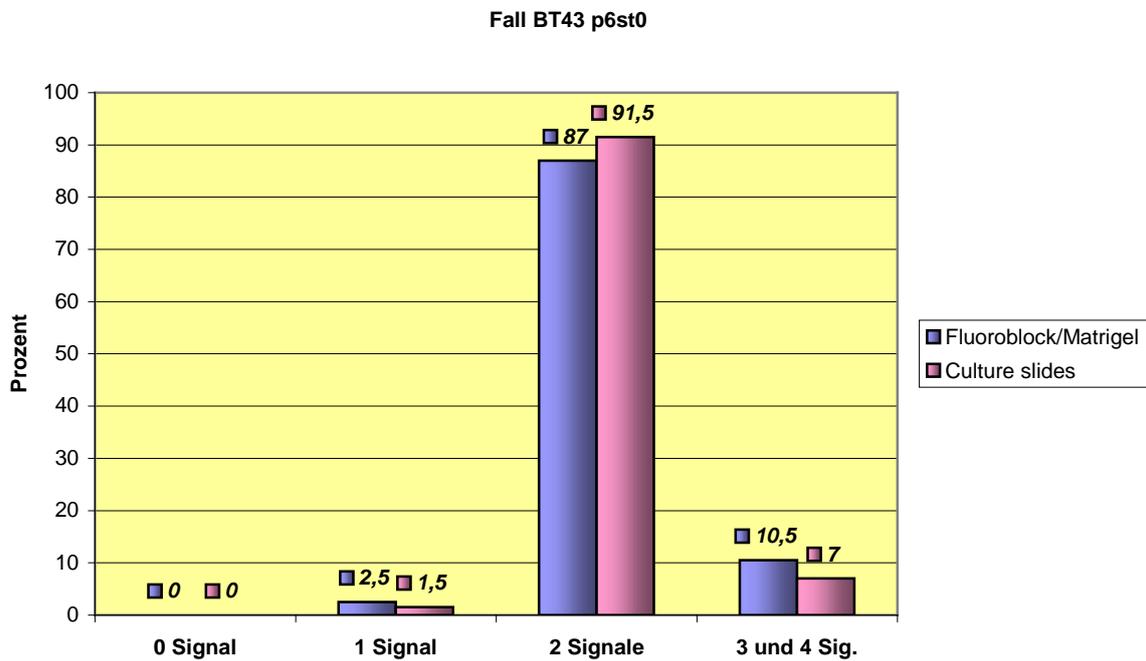


Abbildung 45: Histogramm Sonde 8 Fall BT 43

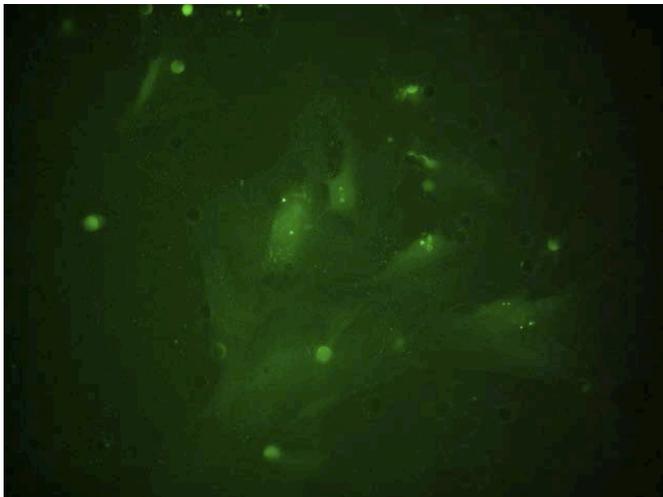


Abbildung 46: BT43p6st0 8-cmyc Fluoroblock (x100 )

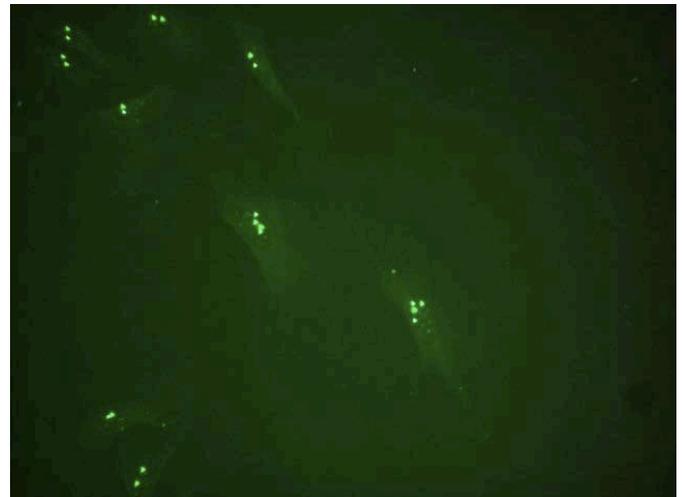


Abbildung 47: BT43p6st0 8-cmyc Objektträger ( x 100 )

In diesem Fall konnten keine wesentlichen Unterschiede festgestellt werden.

**Fall BT45** - TNM-Klassifikation: pT3b, pN2, Mx, GIII

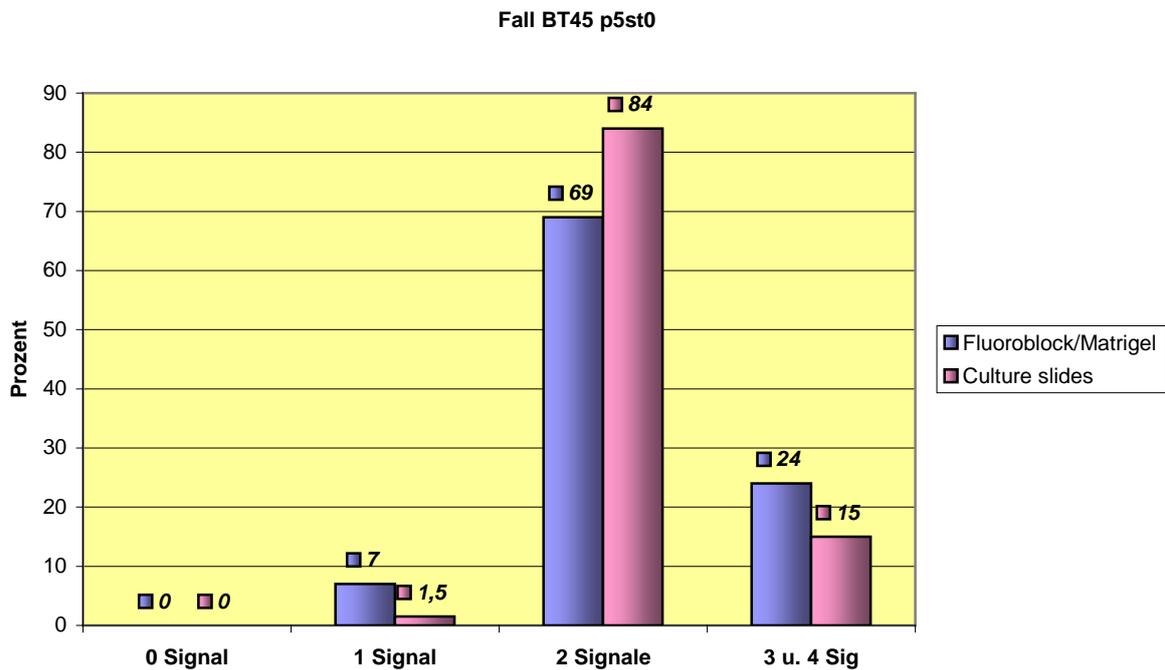


Abbildung 48: Histogramm Sonde 8 Fall BT 45

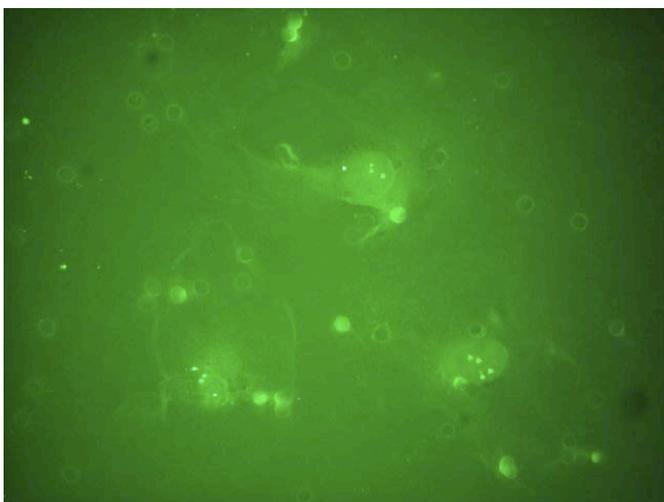


Abb. 49: BT45p5st0 8-cmyc Fluoroblock ( x100)

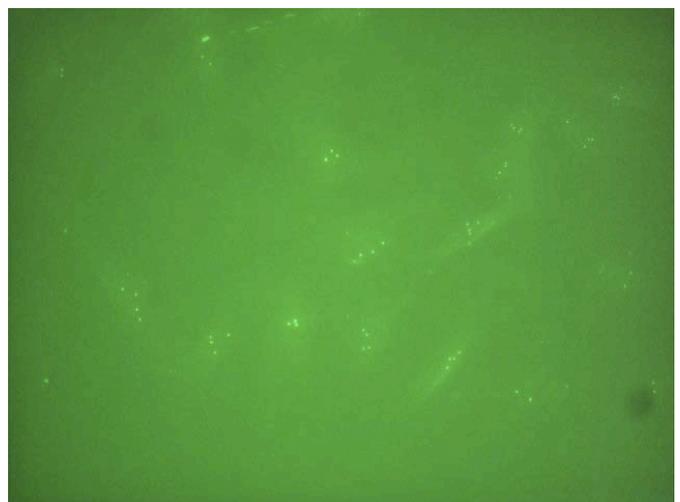
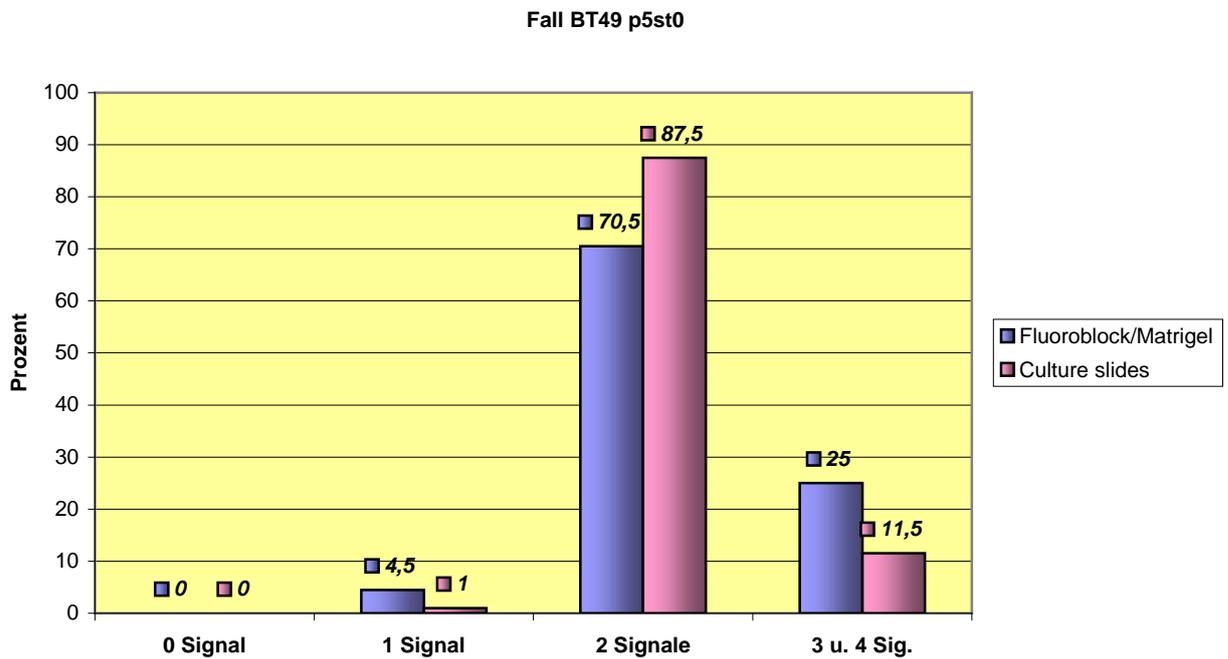


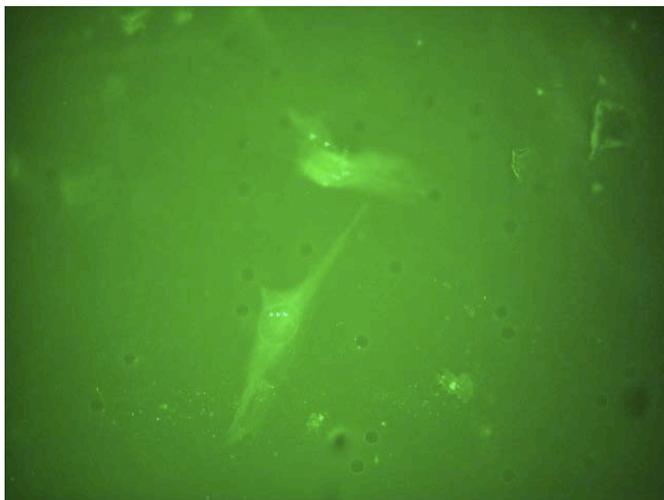
Abb. 50: BT45p5st0 8 c-myc Objektträger (x100)

Hier zeigte sich wie bei Fall 38 ein Unterschied in der Erfassung der Signale zwischen den zwei Kulturmethoden (mit und ohne Invasionsmöglichkeit)

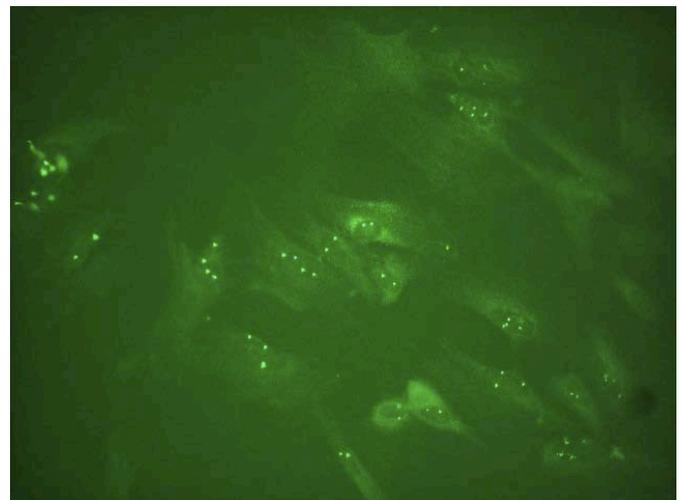
**Fall BT49** - TNM-Klassifikation: pT1, pN0, GIII



**Abbildung 51: Histogramm Sonde 8 Fall BT 49**



**Abb. 52: BT49 p5st0 8 c-myc Fluoroblock (x100)**



**Abb. 53: BT49 p5st0 8 c-myc Objektträger (x 100)**

Im Fall 49 war der Unterschied der Polysomie für Chromosom 8 zwischen Zellen im Invasionsmodell und Zellen in den Objektträgern am deutlichsten, über 13% Unterschied.

	OT Passage 2	OT Passage 5-6	Invasionsmodell
BT38	+11%	+14%	+19%
BT43	-3%	+8%	+11%
BT45	+11%	+16%	+24%
BT49	-6%	+12%	+25%

**Tabelle 13: Gegenüberstellung Aneuploidie in % von Chromosom 8 nach Passage und Versuchsaufbau ( klassische Zellkultur vs. Invasionsmodell )**

Beim diesem Versuchsansatz war zu erkennen, dass die Zellen einer Zellkultur die in der Lage waren, die Matrigelschicht zu degradieren und zu durchwandern, also ein invasives Verhalten zeigten, eindeutig mehr numerische Aberrationen im Sinne einer Polysomie des Chromosoms 8 aufwiesen, als die Zellen die auf den Objektträgern kultiviert wurden (siehe Tabelle 13). Insbesondere in den Fällen BT 38, 45 und 49 (jeweils +19%, +24% und +25%). Im Vergleich zu der FISH-Untersuchung dieser Fälle an Objektträgern mit Zellen einer niedrigeren Passage (siehe Tabelle 8, Seite 40) konnte die Polysomie 8 in den Fällen 38 und 45 (jeweils mit + 11% im unteren Bereich der Signifikanz) ebenfalls gezeigt werden, allerdings weniger signifikant als im Invasionsmodell (BT 38:+ 19%, BT 45:+24%). Im Fall BT49 zeigte sich eine signifikante Polysomie (+ 25 %), die in der parallelen Untersuchung an den Objektträgern gerade noch nachvollziehbar war (+11%) und in der niedrigen Passage (siehe Tabelle 8, Seite 40) nicht nachgewiesen wurde.

Im Fall BT43 konnten in der FISH-Untersuchung keine signifikanten Unterschiede zwischen Fluoroblock und Objektträgerkulturkammern verzeichnet werden, auch im Vergleich zur Voruntersuchung in der niedrigen Passage.

### 3.4.3 Vergleiche in 5 Fällen mittels FISH an formalin-fixiertes Material

Im Institut für Humangenetik der Universität des Saarlandes untersuchte Frau Silke Riedinger, Doktorandin in Institut für Humangenetik der Universität des Saarlandes-Betreuer: Prof. Dr. med. Wullich, in 5 gemeinsamen Fällen (BT 38, 39, 40, 41 und 42) mittels FISH das formalin-fixierte Primärtumor (also nie in Kultur gebracht, nach Operation von den Pathologen direkt in Formalin fixiert) mit denselben zentromerspezifischen DNA-Sonden.

	Primärtumor, formalin-fixiert					Zellkultur, Tumor				
	7	8	9	17	Y	7	8	9	17	Y
<b>38</b>	+28	+22	+26	-	-	+26	+11	+14	+27	-8
<b>39</b>	+22	-	-	+23	+38	-12	-9	+11	+13	-44
<b>40</b>	+56	+27	-	+27	n.g.	+9	+11	+9	+11	n.g
<b>41</b>	+50	+24	+29	+35	-39	-10	-8	+14	+10	+64
<b>42</b>	-	-	-	-	-50	-10	-6	+11	+11	-23

**Tabelle 14: Gegenüberstellung FISH an formalin-fixiertes Tumorgewebe / FISH an Zellkultur in % Kerne ( n.g.: nicht gemacht, da weibliche Probanden, -:Euploidie )**

Im Primärmaterial konnten mehr und signifikantere Aneusomien als in der Primärkultur nachgewiesen werden.

Im untersuchten Primärtumor (formalin-fixiert) mittels FISH (anderes Protokoll als für die Zellkultur) konnten die verschiedenen numerischen Abberationen mit eindeutiger Signifikanz erfasst werden (jeweils mehr als 20% Verlust oder 10% Gewinne).

---

Abgesehen von Chromosom Y, waren bei allen untersuchten Chromosomen, insbesondere Chromosom 9, nur Gewinne (also Polysomien) nachweisbar (siehe Tabelle 14). Es lagen einige Konkordanz vor. In den Fällen Fall 40 und 41 konnten Übereinstimmungen beim Gewinn von Chromosom 7, 8, 9 und 17 festgestellt werden. Im Fall 42 wurde in beiden Fällen ein signifikanter Verlust von Chromosom Y dokumentiert. Während beim Primärtumor für Chromosom 17 im Fall 38 eine Euploidie nachgewiesen wurde, konnte in der Zellkultur ein Gewinn verzeichnet werden (+27).

Gegensätzliche Ergebnisse konnten bei Chromosom Y ermittelt werden. Im Fall 39 konnte ein signifikanter Gewinn beim Primärtumor nachgewiesen werden während in der FISH der Zellkultur ein signifikanter Verlust zu verzeichnen war. Und umgekehrt verhielt es sich im Fall 41, da wurden ein signifikanter Verlust beim Primärtumor und ein Gewinn in der Zellkultur festgestellt.

**3.4.4 Follow up der Patienten**

Fall	Geschlecht /Alter	Histologischer Befund	FISH	C	Gy	R	Prostata-Ca begleitend	Tod
31	m/64	pT2a, pN0, GII	+7	+	-	-	-	-
35	w/79	pT3b, pN0, GIII	Eu	+	+	+		-
36	m/75	pT3b, pN0, GIII	Eu	+	-	-	pT3a, pNO, Gleason 7	
37	m/77	pT3a, pN0, GII	-	+	-	-	PT3a, pNO, GII	-
38	m/76	pT3a, pN1, GIII	<b>+7 +8 +9 +17</b>	+	-	-	-	-
39	m/65	pT3b, pN2, pL1, pV1, GIII	-7 +9 +17 <b>-Y</b>	-	-	+	Z.n.	+
40	w/75	pT3b, pN2, GII-III	+ 8 +17	-	-	-		-
41	m/68	pT4a, GIII, M1	-7 +9 +17 <b>+Y</b>	-	-	-		+
42	m/79	pT3a, pN2, GIII	-7 +9 +17 <b>-Y</b>	+	-		-	
43	w/66	pT1, pN0, GIII, M0	Eu	-	-	-		-
44	m/78	pT4a,pN2,MX, GIII	-	+	-	-	Gleason 2+3=5	-
45	m/58	PT3b, pN2, MX, GIII, R0	<b>+7 +8 +17</b>	+	-	-	-	-
46	m/72	pT2b, pN0, GII	-	-	-	-	pT2c, Gleason 6	-
47	w/76	pT3a, pN0, GIII, M0	-	+	-	+		+
48	m/73	pT1, pN0, GIII, M0	<b>-Y</b>					
49	w/65	pT1, pN0, GIII	-7	-	-	-		-
50	w/77	pT3a, pN0, GIII, M0	Eu	+	-	-		-
51	m/75	pT1, pN0, GIII	+9					
52	m/75	pT1, pN0, GIII	+9 +17	-	-	-	PT2c, Gleason 3+4=7	-
53	m/74	PT3a, pN0, Mx, GIII, R0	-8 +9 +17 <b>+Y</b>	+	-	-	-	-
54	m/74	pT2a, pN0, GIII, M0	-7 <b>-9</b> +17					
55	m/73	pT2a, pN0, GIII, M0	<b>+ 7 -8 +9 +17 - Y</b>	+	-	-	PT1b, pN0, R0, Gleason 4+3=7	-
56	m/64	pT4a, pN1, GII-III	-	+	-	-	-	-

**Tabelle 15. Übersicht Follow-up. C: Chemotherapie, Gy: Radiotherapie, R: Rezidiv, fett gedruckt: Gewinn über 10%, Verlust über 20% , Tod durch Ca oder andere Ursache**

---

## 4 DISKUSSION

### 4.1 Ziel der vorliegenden Arbeit

Bis zu 15 bis 35% der soliden TCCs gehen in ein infiltratives ggf. metastasierendes Karzinom mit multizentrischem Wachstumsmuster über. Die radikale Cystektomie ist die Therapie der Wahl beim muskelinvasiven Harnblasenkarzinom, dennoch zeigen 50% der operierten Patienten ein Rezidiv und versterben an dem Tumorleiden. Für die primäre Behandlung des TCCs, insbesondere der oberflächlich wachsenden TCC-Form, wären Informationen über die Eigenschaften des Tumors wie Rezidiv-, Progressions-, Metastasierungsneigung wegweisend für das Therapiekonzept des einzelnen Patienten. Auch im post-operativen Management würden diese Informationen sowohl auf die adjuvante Therapie als auch auf die Gestaltung des follow-up des Patienten Einfluß nehmen.

Klinische Proben (Frischgewebe oder in Paraffin eingebettetes Material) haben den Vorteil der absoluten Patientennähe. Diese eignen sich aber nicht für funktionelle Studien, da es sich um ein statisches System handelt. Eine konventionelle histopathologische Untersuchung von Harnblasenkarzinomen mit Bestimmung von Tumorgrad und -stadium ist unzureichend, um das biologische Verhalten des Tumors zuverlässig vorherzusagen. Deskriptive Untersuchungen von Tumormaterial mittels FISH an histologischen Präparaten, Karyotypisierung an Direktpräparaten sowie die Durchflusszytometrie geben zwar Auskünfte über chromosomale Veränderungen, aber eine Korrelation zwischen einer bestimmten Aneusomie und Invasivitätspotential des Tumors bzw. eines Zellklons ist nicht möglich.

Ein enger Zusammenhang zwischen histopathologischem Befund und Vorkommen genetischer Veränderungen ist bereits bekannt. In einer FISH-Studie von Placer et al. wurden die chromosomalen Veränderungen an Primärtumoren aus Zystektomien und TUR (transurethrale Resektion) für die Chromosomen 7, 8, 9 und 17 dem histopathologischen Befund gegenübergestellt. Dabei zeigte sich statistisch ein signifikant höheres Maß an Polysomie in der Gruppe der Grad III-Tumore sowie in der Gruppe pT1-T4 TCCs im Vergleich zu Grad I-II-Tumoren und pTa (Placer et al., 2005). An der Entstehung des TCCs sind neben zytogenetischen Veränderungen auch der Verlust der Zellzyklusregulation sowie die Metastasierung mit Neoangiogenese beteiligt (Williams et al, 2004). Doch die meisten FISH-Daten können nicht einer bestimmten Subpopulation von invasiv wachsenden Tumorzellen zugeordnet werden. Die bisherigen Befunde beim Harnblasenkarzinom wurden überwiegend am histologischen Präparat bzw. aus DNA-Präparaten von frisch asservierten Proben oder an

permanenten Zelllinien gewonnen. Ziel der Arbeit war einerseits die Quantifizierung der numerischen Aberrationen von Zellen aus der Primärzellkultur fortgeschrittener TCCs und in einem weiteren Schritt die FISH-Untersuchung an invasiv wachsenden Zellen in einem in vitro-Invasionsmodell. Rebel et al. untersuchte die intraepitheliale Expansion von der permanenten TCC-Zelllinie T24 auf primäre Mausharnblasen-Explantate in einem Ko-Kultivierungsmodell, dabei sollten insbesondere der Einfluss von Wachstumsfaktoren (aFGF, EGF) und Komponenten extrazellulärer Matrix (Laminin, Kollagen Typ I und IV) auf das Zellwachstum beobachtet werden (Rebel et al., 1995). In dieser Studie konnte festgestellt werden, dass das Invasionsverhalten von veränderten Urothelzellen nicht nur von genetischen Faktoren abhängt, sondern auch in einem hohen Maße von exogenen Komponenten beeinflusst wurde. Somit wurde der Einfluss des „microenvironment“ hervorgehoben. In einer weiteren Studie wurden permanente Zelllinien von Harnblasenkarzinomen (RT4, RT112 und EJ) in einem humanen in vitro Harnblasenkrebsmodell auf deepithelialisiertes Harnblasenstromagewebe kultiviert und nach 2, 4 und 6 Wochen histologisch und immunhistochemisch untersucht (Booth et al., 1997). Dabei konnte beobachtet werden, dass die Anwesenheit von urotheliale Stroma Einfluss auf die Architektur, die Zytodifferentiation, Phänotyp und Wachstum der permanenten Zelllinien bedeutet. Immunhistochemisch wurde der transiente Verlust der E-Cadherin-Expression im Zusammenhang mit Invasion hervorgehoben. Auch Bindels et al. konnte den Einfluss des „microenvironment“ (extracelluläre Matrixkomponente, Stroma) sowohl in vitro als in vivo (Mausmodell) auf das invasive Verhalten von 6 permanenten Zelllinien von TCC (SD, JON,1207, T24, J82 und RT112) nachweisen. In diesem Mausmodell (orthotopische und heterotopische Inoculation auf SCID-Mäuse, severe combined immunodeficiency syndrome) waren die Zelllinien SD und RT112 in der Lage, im Vergleich zum in vitro Modell, invasiv zu wachsen (Bindels et al., 2000). Verantwortlich hierfür wurde die Änderung der E-Cadherin-Protein-Expression gemacht. In den Tumorarealen wurde nämlich immunhistochemisch ein Verlust bzw. eine reduzierte Expression von E-Cadherin nachgewiesen. In vitro, und nicht im Mausmodell, waren diese Zelllinien aber eindeutig E-Cadherin positiv. Somit beeinflussen Faktoren im Stromagewebe (Zell-Zell-Kontakt, über Blut- und Lymphwege) das biologische Verhalten von Epithelzellen über Modulationen der Expression verschiedener Proteine, die invasives Wachstum regulieren.

Um ein repräsentatives invasives Wachstum der Zellen aus der Primärkultur zu ermöglichen, enthielt das Invasionssystem Matrigel als Barriere und Fibroblasten als Attractant (Abbildung 4, Seite 23).

Permanente Zelllinien sind nach wie vor ein wichtiger Bestandteil der onkologischen Forschung. Sie sind leicht verfügbar, einfacher in der Kultivierung als Primärkulturen und nahezu unbegrenzt teilbar. Allerdings geht diese Fähigkeit mit dem Verlust der Zelldifferenzierung oder des spezifischen ursprünglichen biologischen Verhaltens einher. Die eingesetzte Ösophaguskarzinomlinie TE7 für das Adenokarzinom des Ösophagus wurde von Boonstra et al. mittels Xenotransplantation, Multiplex PCR von STR-Profilen (short tandem repeat), Mutationsanalyse und CGH (comparative genetic hybridization) auf ihren zellulären Ursprung hin untersucht. Dabei zeigte sich, dass diese weltweit eingesetzte permanente Zelllinie in Wirklichkeit von einem Plattenepithelkarzinom stammte. So würde der Einsatz von permanenten Zelllinien von Harnblasenkarzinomen wie T24 oder 486P hinsichtlich ihrer biologischen und klinischen Wertigkeit für genetisch funktionelle Untersuchungen nicht alle Aspekte des Ursprungstumors darstellen. In einer Studie von Parson et al. konnte gezeigt werden, dass permanente Zelllinien im Zuge der Langzeitkultur Alterationen ihrer DNA aufweisen. Dabei wurden 4 Leukämie-Zelllinien mittels short-tandem-repeat (STR) profiling (DNA-fingerprints) mit dem Ausgangstumor verglichen. In den Zelllinien Jurkat und CCRF-CEM konnten wesentliche genetische Veränderungen verzeichnet werden (Parson et al., 2005). Wang et al. unterstrich in einer Studie, die 59 Tumorzelllinien und die entsprechenden Primärtumoren mit Expressionsarrays verglich, die mangelnde genetische Stabilität und die eingeschränkte Verwertbarkeit von permanenten Tumorzelllinien. Neben gravierenden Unterschieden zwischen Zelllinien und Primärtumor bei Lungen- und Mammakarzinomen wurden auch die beiden Prostatakarzinomzelllinien PC-3 und Du-145 als wenig repräsentativ für das Prostatakarzinom angesehen (Wang et al., 2006). Darüber hinaus entwickeln sich aus den permanenten Zelllinien eine Vielzahl von undefinierten Sublinien durch Verwechslungen und Querkontaminationen in den Laboren. Auch Wachstumsraten, Zellproliferationsverhalten, tumor-host Interaktionen sind im Vergleich zu den primären Tumoren deutlich verändert (Rockwell et al., 1980). In der oben bereits angeführten Studie (Booth et al., 1997) konnte gezeigt werden, dass die permanente Zelllinie RT4 (TCC) die Ursprungseigenschaften des Originaltumors in einem in-vitro Modell nicht mehr aufwies. Dabei wurde die Zelllinie auf humanes de-epithelialisiertes Stroma (Boyden chamber) kultiviert. Histologisch zeigte sich auch nach 6 Wochen Kultivierung keine Invasion durch

permanente Zellen der RT4-Linie, die von einem invasiv wachsenden TCC stammten, in das Stromagewebe hinein. Zusammenfassend weisen permanente Zelllinien eine mangelnde Qualitätskontrolle auf, dies ist allerdings kein zellbiologisches Problem. Wichtiger erscheint die Tatsache, dass permanente Zelllinien durch Verlust oder Veränderungen von Zellfunktionen nur fraglich repräsentativ für den Ursprungstumor sind. Permanente Zelllinien tragen das Risiko in sich, die Patientenschicksal bestimmenden Tumorzellpopulationen sowohl genetisch als auch phänotypisch nicht wiederzuspiegeln. Wir setzten daher in unserer Arbeit Primärzellkulturen von fortgeschrittenen Harnblasenkarzinomen ein, um möglichst repräsentative invasiv wachsende Zellklone bzw. Subpopulationen isolieren und charakterisieren zu können.

## 4.2 Zellkultur

In der vorliegenden Arbeit wurden eine Reihe Polysomien bzw. multiple Aneuploidien der untersuchten Chromosomen in den Zellen der Primärkultur mittels FISH nachgewiesen. Von den 17 untersuchten Tumoren meiner Arbeit boten insgesamt 8, also 47% der Fälle, eine oder mehrere signifikante Aneusomien von über/unter 20% Kernsignal (siehe Tabelle 9, Seite 41). Normale Befunde, also weder Gewinn noch Verlust der untersuchten Chromosomen, lagen bei 4 Fällen vor. Im Vergleich zu anderen FISH-Studien zeigten sich in unserer Arbeit prozentual weniger Aneuploidien im fortgeschrittenen Stadium des TCCs. Jiang et al. untersuchte Urothelzellen aus 45 Harnblasenwaschungen von betroffenen Patienten auf centrosomale Veränderungen sowie Aneuploidien der Chromosomen 4 und 9 mittels FISH. Dabei lag die Aneuploidie-Prozentzahl im Schnitt um 80% bei den höhergradigen Harnblasenkarzinomen (Jiang et al., 2003). Zum Beispiel zeigte Deliveliotis et al. mittels Flow Cytometry (FCM) eine Aneuploidie von über 63% bei den insgesamt 66 untersuchten TCCs aus radikalen Cystektomien. Das Untersuchungsmaterial war in Paraffin eingebettet (Deliveliotis et al., 2004). Die Ursache für diesen Unterschied in der Quantifizierung der Aneuploidien könnte ihren Ursprung in der Zellkultur der Tumorpartikel haben.

Zum einen könnte das entnommene Gewebe im makroskopischen Tumorareal genetisch nicht repräsentativ für das Karzinom gewesen sein. Harnblasenkarzinome wachsen multifokal (Bender and Jones, 1998). Gerade das multifokale Wachstum von T1GIII Harnblasenkarzinomen stellt einen bedeutsamen Risikofaktor für die Entwicklung von Malignität dar (Denzinger et al., 2008). Weiterhin ist der klonale Ursprung dieser Tumore umstritten. Eine Hypothese besagt, dass alle TCCs aus einer einzigen veränderten Zelle stammen und daher monoklonaler Herkunft sind (Sidransky et al., 1992). Diese würden über

intraepitheliale Migration oder intraluminales „seeding“ multifokal wachsen (Harris and Neal, 1992). Die zweite Hypothese geht von räumlich getrennten und voneinander unabhängigen malignen Zellen als Ursache des multifokalen Wachstums aus, dem sogenannten Feld-Effekt (Honey et al., 1978; Paiss et al., 1997; Hartmann et al., 2000). In einer 2001 publizierten Studie wurden 94 multifokal wachsende TCCs von insgesamt 19 Patienten auf ihren klonalen Ursprung mittels LOH ( loss of heterogeneity ) mit 8 Markern des Chromosoms 9 und den Marker 17p13 untersucht (Hafner et al., 2001). Das Tumorgewebe wurde per Mikrodissektion aus paraffin-fixiertem Tumorgewebe gewonnen. Es konnte gezeigt werden, dass 64% der Fälle monoklonaler und 36% oligoklonaler Herkunft waren. So wäre es in unserem Fall durchaus denkbar, dass im entnommenen Gewebe kein Klon von repräsentativen einerseits invasiv wachsenden, andererseits genetisch veränderten Zellen vorhanden war, oder dass es sich um ein Tumoreal ohne invasiv wachsende Zellklone handelte. Mit anderen Worten, scheint die sichere Gewinnung repräsentativer Gewebeproben für die Zellkultur durch die Heterogenität des Harnblasenkarzinoms sowie das Auftreten von multifokalen Arealen erschwert zu sein. Andererseits liegt die Vermutung nahe, dass es sich bei den von mir erfassten „aneusomen Zellklonen“ um genau die Zellen handelt, die in einer Population invasiv wachsen. Gerade diese Zellen sind Mittelpunkt meiner Arbeitshypothese, nämlich die Selektion invasiv wachsender Tumorzellen, die genetisch aberrant sind.

Beim Gewinn der Tumor-Partikel durch mechanische Disaggregation mittels Skalpell könnte ein ähnliches Problem bestehen, da man vor der Kultur nicht in Erfahrung bringen konnte, wie viele Tumorzellen und wie viele Aneuploidien oder Zellklone in dem Stückchen vorhanden waren. Zudem ist es vorstellbar, dass je nach Auflagefläche des Tumorstückchens auf dem Boden der Zellkulturflasche auch nur die Zellen wuchsen, die Kontakt zur Oberfläche hatten. Somit könnte zusätzlich eine künstliche und willkürliche Form der Selektion entstanden sein.

Die anschließende Gewinnung einer repräsentativen Zellkultur war ebenfalls von verschiedenen Faktoren abhängig.

Im Vergleich zu den Ergebnissen der Partikelkultur aus gesundem Urothelgewebe in der vorliegenden Arbeit konnten beim Tumorgewebe wie erwartet deutlich mehr Aneuploidien nachgewiesen werden (Tabelle 8, Seite 40). Dies spricht für eine zuverlässige Kultur von Tumorgewebe. In 5 Fällen konnten meine FISH-Ergebnisse in der Zellkultur mit den FISH-Ergebnissen in den entsprechenden Paraffinschnitten der Tumorstückchen (aus denen Zellkulturen bereits gewonnen und anschließend eingefroren wurden) gegenüber gestellt

werden (Tabelle 14, Seite 59). Dabei konnte gezeigt werden, dass die Aneuploidien häufiger und signifikanter (alle über /unter 20%) im Paraffinschnitt als in der Zellkultur der jeweiligen Fälle nachgewiesen wurden. Es stellte sich bei einer erfolgreichen Kultivierung von Tumorgewebe heraus, dass die in vitro auswachsenden Zellen häufiger diploid für die Chromosomen 7, 8, 9, 17 und Y waren als erwartet. Dies könnte für eine schnelle Selektionierung auf vermeintlich normale Epithelien sprechen. Man könnte sich durchaus vorstellen, dass diese Selektionierung durch die selektive Isolierung und dem präferentiellen Wachstum von diploiden Epithelzellen wie im Fall des Prostatakarzinoms zustande kam (König et al., 1993a, 1993b; Breitkreuz et al., 1993; Jones et al., 1994; Ketter et al., 1996). Hypothetisch wurde u.a. beim Prostatakarzinom eine Schädigung der aneuploiden mitotisch sensiblen Tumorzelle durch die Kollagenasebehandlung angenommen. So wurde in der vorliegenden Arbeit auf den enzymatischen Abbau mittels Kollagenase verzichtet. Des Weiteren wurde die Partikelkultur klassisch, also in Zellkulturflaschen, durchgeführt. In 2 Fällen erfolgte parallel eine Ko-Kultivierung auf ECM-beschichteten Inserts, leider konnte dabei kein verwertbares Untersuchungsmaterial im Sinne eines Epithelmonolayers zur FISH-Untersuchung gewonnen werden. Für die klassische Zellkultur sind Kulturflaschen mit Oberflächenmodifikationen entwickelt worden, welche das Aus- bzw. Anwachsen epitheloider Zellen erleichtern sollen, jedoch fehlen Attractants und eine Basalmembran, die ein invasives Wachstum zulassen würden. Im Invasionsmodell allerdings bot die Anwesenheit von extrazellulärer Matrix bzw. von ihren Bestandteilen andere Reize für die kultivierten Zellen, denn gerade die extrazelluläre Matrix beeinflusst Wachstum, Struktur und funktionelle Differenzierung von Zellen, insbesondere von Krebszellen (Rebel et al., 1995; Booth et al., 1997; Syrigos et al., 1999; Bindels et al., 2001; Smith et al., 2001). Man spricht auch von malignem Stroma. In einer 2006 von Dozmorov et al. publizierten Studie wurde der Einfluss extrazellulärer Matrix auf die Genexpression und Phänotypen von Harnblasenkrebszellen aus permanenten Zelllinien (u.a. RT4 und J82) untersucht. Dabei wurden diese Zellen auf 3 verschiedene ECM-Typen kultiviert: Matrigel (tumor-abgeleitete ECM), SISgel (small intestine submucosa, also gesunde Mukosa) sowie klassisch in Zellkulturflaschen (die einzige ECM stammte dann von den kultivierten Zellen selbst) kultiviert. Anschließend wurden die Zellen histologisch untersucht sowie mittels cDNA-array zur Ermittlung von krebs-assoziierten Genen auf ihre Invasivität verglichen (Dozmorov et al., 2006). Die Autoren konnten zeigen, dass die invasive Eigenschaft oder die Fähigkeit zum papillären Wachstum der Zellen vom ECM-Typ im Kultivierungsansatz abhängig war. Auch der Verlust der

Zellzyklus-Regulation wurde je nach ECM-Basis durch verschiedene Gene eingeleitet. Einige krebs-assoziierten Gene wurden auf Matrigel und SISgel unterschiedlich exprimiert als in den Zellkulturflaschen, wohingegen die Kultur auf der gesunden Mukosa (SISgel) die malignen Funktionen der Zellen zu unterdrücken schien. In meiner Arbeit lag ebenfalls die Vermutung nahe, dass die Ergebnisse der FISH-Untersuchungen in frühen Passagen auf Objektträgern abhängig von der Zellkulturmethode bzw. Beschichtung waren. So dass in unserer Versuchsanordnung in der Zellkulturflasche ohne Anwesenheit einer Membran, einer Barriere, die mögliche Selektion eines aneuploiden Zellklons nicht unterstützt wurde und somit diploide Zellen einen Selektionsvorteil im Zuge der Kultivierung hatten. Auch an vorangegangenen Studien an Tumorzelllinien konnte gezeigt werden, dass eine Suppression des malignen Phänotypen unter Kultivierung mit klassischer ECM stattfand (Hurst et al., 2003; Kyker et al., 2003). In meiner Arbeit gelang es den Tumorzellen im Invasionsmodell mit Matrigel-Beschichtung der Inserts auf die Unterseite zu wandern, also erlaubte die Anwesenheit von Matrigel, als Basalmembran, das invasive Wachstum der Zellen. Das Invasionsmodell wurde in Anlehnung an das Modell von Zwergel et al. für das Prostatakarzinom aufgebaut (Zwergel et al., 1998a). Die Aufstellung des Kulturmodells ermöglichte bzw. unterstützte das invasive Wachstum von Tumorzellen: Einsatz von PET (Polyethylenteraphthalate)-Membranen, Ko-Kultivierung mit Fibroblasten und Coating der Membranen mit Elementen der extrazellulären Matrix. In meiner Arbeit konnte festgestellt werden, dass die durchwanderten Tumorzellen im Invasionsmodell im Vergleich zur klassischen Zellkultur (Objekträgerkammer) eine signifikante Polysomie des Chromosoms 8 zeigten (siehe Tabelle 13, Seite 58). Es trat sogar in den Fällen BT 43 und BT 49 eine Polysomie auf, die in den niedrigen Passagen der klassischen Primärkultur nicht beobachtet wurde. Somit konnten Subpopulationen mit invasivem Verhalten aus der Primärkultur des Tumorgewebes erst im Invasionsmodell selektioniert werden.

Neben dem Auftreten einer Selektion gegen aneusome Zellen in der in vitro Kultivierung von soliden Tumoren, bereitet die Proliferation von Fibroblasten im Laufe der Kultivierung von Tumorepithelzellen Schwierigkeiten. Diese proliferieren meist schneller als die Tumorzellen. Auch eine lange Kultivierungszeit birgt die Gefahr, dass „normale Zellen“ oder Stromazellen die Karzinomzellen überwuchern (König et al., 1993b). Eine bestimmte Medienzusammensetzung kann jedoch diesen Effekt inhibieren (Peehl et al., 1986). Zusätze wie Insulin, Choleratoxin und EGF fördern das Wachstum von Epithelzellen, hingegen proliferieren die Fibroblasten ohne diese Wachstumsfaktoren bevorzugt (McKeehan et al.,

1984). Durch die Dialyse des Serums werden zusätzlich die Fibroblastenwachstumsfaktoren entfernt. Darüber hinaus konnte über Immunfärbungen die epitheliale Herkunft der Zellen bestätigt werden. In 2 Fällen (Fall 46 und 56) kam es im Verlauf der Kultivierung zum Übergang in das fibroblastoide Wachstum der Zellen und letztlich zur Überwucherung der Fibroblasten. Dies könnte auch durch eine epitheliale-mesenchymale Transition (EMT) verursacht sein. Diese Zellkulturen konnten folglich nicht untersucht werden.

Diese Ergebnisse decken sich mit den oben genannten Studien insofern, dass das microenvironment einen Einfluss auf das biologische Verhalten ausübt.

Tumorzellen, die phänotypisch und sehr wahrscheinlich auch genetisch, dem Ursprungstumor zuverlässig nahe kommen, können in der Primärzellkultur in Abhängigkeit von der Technik und der verwendeten Faktoren bevorzugt wachsen. Es besteht in der Zellkultur jedoch weiterhin das Risiko, dass trotz der Wahl einer adäquaten Methode, nur ausgewählte Subpopulationen der ursprünglichen Tumorzellen auswachsen. Diese Zellen sind nicht unbedingt in der Lage, im Laufe der Kultur durch den erwarteten Selektionsvorteil zu proliferieren und entgehen somit auch unserer zytogenetischen Erfassung.

Invasive Karzinome zeichnen sich dadurch aus, dass sie sowohl die Basalmembran und das darunterliegende Bindegewebe, als auch das mehrschichtige Muskelgewebe der Harnblase infiltrieren. Verantwortlich für diesen Prozess ist die Aktivierung sogenannter Matrix-Metalloproteinasen (MMPs), die in inaktiver Form vorliegen und über eine Spaltung am N-terminalen Ende aktiviert werden (Kieiner and Stetler-Stevenson, 1993). MMPs haben vielschichtige biologische Funktionen inne, u.a. die Freisetzung von Zytokinen und membrangebundenen Rezeptoren (Hojilla et al., 2003) sowie die Initiation von Tumordinvasion, Neoangiogenese und Metastasierung (Bjorklund et al., 2005). Die Matrixbestandteile binden und modulieren die Aktivität zahlreicher Wachstumsfaktoren wie vascular endothelial growth factor (VEGF), basic fibroblast growth factors (bFGF). Somit wird über die Degradation der Matrixbestandteile das Bindegewebe nicht nur mechanisch durchdrungen, es werden dabei auch lösliche Faktoren freigesetzt und aktiviert, welche bei der Angiogenese und der Proliferation der Tumorzellen eine Schlüsselrolle spielen (O'Brien et al., 1995). Daher war es nicht überraschend, erhöhte Raten an MMPs im Serum und Urin von verschiedenen Krebspatienten nachzuweisen, u.a. Harnblasen-, Brust- und Kolonkarzinom (Moses et al., 1998). Im Regelfall wird die Aktivität der MMPs über Gewebe-Inhibitoren der Matrix-Metalloproteinasen kontrolliert (tissue inhibitors of matrix

metalloproteinase, TIMPs). Verschiedene Studien haben ebenfalls gezeigt, dass MMP-1, MMP-2, MMP-3, and MMP-9 mit Harnblasenkarzinom assoziiert sind und somit Informationen über Stadium, Grad und klinisches Outcome erlauben (Gerhards et al., 2001; Sohji et al., 1997). Polymorphismen repräsentieren die natürlichen Variationen des genetischen Codes in der Population. Die häufigsten Polymorphismen sind die single-nucleotide Polymorphismen (SNPs). Polymorphismen in der Promoter-Region eines Gens können zu einer Steigerung der Genexpression führen. SNPs in der kodierenden Region können zu einer Veränderung einer Aminosäure führen und so zu einer Alteration der Proteinfunktion führen. Eine 2007 publizierte Studie zeigte, dass genetische Veränderungen der MMPs mit invasivem Verhalten des TCCs verbunden sind (Kader et al., 2007). Es wurde bei 243 Patienten mit muskelinvasivem Wachstum und 315 Patienten mit oberflächlichem Wachstum nach Veränderungen von 11 single-nucleotide Polymorphismen und einem Mikrosatellit in den MMP-Genen MMP1, MMP2, MMP3, MMP8, MMP9 und MMP12 gesucht. Die DNA wurde aus Lymphozyten des peripheren Blutes gewonnen und mittels PCR untersucht. Insbesondere wurden in dieser Studie SNPs ausgewählt, die mit anderen Krebsarten vergesellschaftet sind: MMP-1-1607 und MMP-3-1612 SNPs beim Kolonkarzinom (Zinzindohoue et al., 2005) sowie MMP-2-1306 und MMP-9-1562 beim Brustkrebs (Grieu et al., 2004). Kader et al. zeigte, dass genetische Veränderungen der MMP9 Mikrosatellit und MMP12-82 G Allele mit der Einwicklung von invasivem Wachstum korrelierten. Es ist anzunehmen, dass nicht-untersuchte Polymorphismen von weiteren MMP-Genen existieren und vielleicht eine wichtigere Rolle in der Tumorgenese spielen. Die validierten Ergebnisse von ähnlichen Studien würden auch das individuelle Risiko eines invasiven Harnblasenkarzinoms ermitteln. Interessant wäre eine PCR an den durchwanderten Zellen im Invasionsmodell durchzuführen, um die Aktivität der verschiedenen MMPs zu erfassen. Mit der Information über Aneuploidien und der MMP-Aktivität bzw. SNP-Nachweis wäre das Risiko eines invasiven Wachstums im Einzelfall und für betroffene Patientenpopulationen noch besser einzuschätzen. Die Schwierigkeit läge in der Materialgewinnung und im Mengenproblem bei den aufwändigen Untersuchungsverfahren. Die Bestätigung über die epitheliale Herkunft der Zelllinie erhielten wir, neben der morphologischen Begutachtung, über die Zytokeratin-Färbung (siehe 3.3). Darüber hinaus zeigten sich in der Gegenüberstellung FISH an Zelllinien aus gesunder Mukosa vs. FISH aus Tumorgewebe wesentliche Unterschiede hinsichtlich Aneuploidie. Auch in den FISH-Untersuchungen im Invasionsmodell von Zellkulturen höherer Passage blieben Zellen mit

Aneuploiden des Chromosoms 8 erhalten bzw. nahmen sogar an Signifikanz zu. Dabei behielten sie ihre epitheliale Natur bei. Dies spricht für eine „tumorgerechte“ Zellkulturmethode.

Eine andere Möglichkeit Tumorzellen und normale Epithelzellen zu unterscheiden, wäre die Wachstumsgeschwindigkeit. Im Falle des Prostatakarzinoms argumentieren Peehl et al., dass die beobachteten Wachstumsgeschwindigkeiten von „normalen“ Zellen niemals erreicht werden können (Peehl et al., 1988). Weiterhin wurde beim Prostatakarzinom in Frage gestellt, ob die in vitro schnell proliferierenden Zellen den in vivo eher langsam wachsenden Prostatakarzinomzellen biologisch entsprechen (Zwergel et al., 1998a). Im Rahmen der täglichen mikroskopischen Dokumentation konnte das Wachstum der Zellen aus normalem Urothelgewebe mit dem Wachstum der Zellen aus Tumorgewebe verglichen werden. Hier konnte formal kein Unterschied in der Proliferationsgeschwindigkeit beobachtet werden. Eine fundierte Messung der Proliferationsgeschwindigkeit wäre mittels einer Ki67-Färbung für zukünftige Untersuchungen durchzuführen.

### **4.3 Fluoreszenz in situ Hybridisierung**

Die FISH ist die ideale Technik, um spezifische Chromosomenveränderungen unabhängig der Zyklusphase zu erfassen, daher auch Interphase-Zytogenetik genannt. In der Literatur wurden mittels FISH an permanenten Zelllinien, Urothelzellen aus Urinproben, formalin fixiertem Material sowie Paraffinmaterial insbesondere bei den Chromosomen 7, 8, 9, 17 und Y Aneuploiden festgestellt (Sauter et al., 1995; Zhonghua-Zhong-Liu-Za-Chi et al., 2000; Strefford et al., 2002; Bollmann et al., 2005). Aneuploidien des Chromosoms 9 wurden als häufigste Veränderungen nachgewiesen (Cairns et al., 1993, Eleuteri et al., 2001). Dabei gilt die Monosomie 9 als frühe genetische Veränderung in der Pathogenese des Blasenkarzinoms. Im fortgeschrittenen Tumorstadium wurden vor allem Polysomien beobachtet. Neben der Polysomie des Chromosoms 8 wurden Polysomien der Chromosomen 7 und 17 beschrieben (Cianciulli et al., 2000, Pycha et al., 1998). Auch eine Polysomie des Chromosoms 9 wurde in fortgeschrittenen Tumorstadien festgestellt (Ribal et al., 2004). In mehreren Studien, u.a. Halling et al., konnte gezeigt werden, dass FISH im Vergleich zu der klassischen Urinzytologie deutlich sensitiver für die Detektion der Harnblasenkarzinome ist, insbesondere bei pTis, pT1-4 und Grad III (Halling et al., 2000,2004). Beim Prostatakarzinom wurden zum Beispiel mit Hilfe der FISH mehr zytogenetische Veränderungen erfasst als mit der

konventionellen Metaphyseanalyse von kultivierten Zellen (Brothman et al, 1992; Micale et al., 1993).

Berichte über FISH an primären Zellkulturen des Harnblasenkarzinoms sind spärlich. Überhaupt sind wenige Artikel über erfolgreiche Primärkulturen des TCCs in der Literatur zu finden. Nicht selten erfolgte dann keine zytogenetische Untersuchung, sondern bevorzugt Untersuchungen auf Genotoxizität und Chemosensitivität (Burgues et al., 2007; Flieger et al., 2008). Zwar existieren auch einige Daten über short-term Kulturen aus exfolierten Urothelzellen (Okuna H et al., 1999; Herz F et al., 1993), aber auch hier wurden keine FISH-Untersuchungen durchgeführt und darauf hingewiesen, dass die Zellen im Verlauf der Kultivierung einer Zytodifferentiation unterliegen (von epithelial zu mesenchymal). Primärkulturen von oberflächlich wachsenden TCCs scheinen schwieriger zu kultivieren als Primärkulturen von muskel-invasiven TCCs (Celis et al., 1999). Darüberhinaus sind gesunde Urothelzellen aus dem Ureter für die Primärkultur besser geeignet als gesunde Urothelzellen aus der Harnblasenmukosa, der Proliferationserfolg von Epithelzellen aus dem Ureter liegt bei 98% im Vergleich zu 71% bei Epithelzellen der Harnblase (Flieger et al., 2008). Die schwierige und aufwändige Primärkultur erlaubt nur eine eingeschränkte Verfügbarkeit des Untersuchungsmaterials, permanente Zelllinien oder histologische Präparate sind demgegenüber sofort einsetzbar. Somit stellte die vorliegende Arbeit in doppelter Hinsicht eine Herausforderung dar. Einerseits das langfristige Kultivieren einer Primärkultur aus Harnblasentumorgewebe und zum anderen FISH-Untersuchungen an diesem Material ohne spezifische Vorprotokolle beim TCC. Wir übernahmen die Kultivierungsmethode des Prostatakarzinoms der Forschungsgruppe Prof. Zwergel (Zwergel et al., 1998a; 1998b).

#### **4.3.1 Grenzen der FISH**

Ein Nachteil der Interphasezytogenetik im Vergleich zur klassischen Zytogenetik an Metaphasen besteht darin, dass man vor der Analyse wissen muss, welche chromosomalen Veränderungen zu untersuchen sind. Das Einsetzen von zentromerspezifischen Sonden erlaubt nur Aussagen über den Zentromerbereich dieses Chromosoms, nicht jedoch über das gesamte Chromosom. Es kann nur gezielt nach bestimmten Aberrationen gesucht werden und diese dann bestätigen oder nicht (Cremer et al., 1986). Es können nur numerische Aberrationen aufgedeckt werden, solange man zentromerspezifische DNA-Sonden einsetzt (van Dekken und Baumann, 1988; Nederlof et al., 1989; Baretton et al., 1994).

#### 4.3.2 Mögliche Ursache für die Fehlinterpretation der FISH-Signale

Die Genauigkeit, spezifische numerische Chromosomenaberrationen mittels FISH zu erfassen, hängt von der Hybridisierungseffizienz und der Spezifität der Probe ab, wobei die Empfindlichkeit, Chromosomenverluste zu erfassen, geringer ist als Zugewinne zu registrieren (van Dekken et al., 1990; Wolman et al., 1993). Die DNA-Zielsequenzen müssen für die DNA-Sonde und Detektionsmoleküle erreichbar sein (Pinkel et al., 1986b; Cremer et al., 1988). Die Zugänglichkeit für die Hybridisierungsreagentien hängt insbesondere von der Qualität der Präparate ab. Die FISH ist am präzisesten, wenn die Proben frisch sind. Allerdings sind die Signale nach der Hybridisierung dann nicht klar umgrenzt, sondern „fluffy“. Durch längere Lagerung bleibt die Morphologie des Präparates zwar intakt, die Hybridisierungsintensität nimmt jedoch ab (Pinkel et al., 1986b). Der Verlust von Ziel-DNA spielt ebenfalls eine wichtige Rolle (van Dekken et al., 1990). Selbst wenn die Homologen eines bestimmten Chromosoms im Kern ausreichend voneinander entfernt sind, ist die Unterscheidung zwischen einer tatsächlich monosomen Zelle und einer, in der sich die Signale alleine aufgrund einer ungünstigen Ausrichtung auf dem Objektträger überlappen, nicht gewährleistet. Für eine einheitliche Population, in der die Aberration regelmäßig auftritt, ist dies kein Problem. Seltene aneuploide Klone können dann aber in einer solchen Situation nicht sicher erfasst werden (Pinkel et al., 1986b). Besonders schwierig ist es, Chromosomenverluste zu interpretieren, wenn die Signale schwach sind oder mit unterschiedlicher Intensität ausfallen (Wolman et al., 1993). Ein weiteres Hindernis, ist die somatische Paarung der Chromosome (Arnoldus et al., 1989; 1991).

Die Anzahl der Signale kann überschätzt werden, wenn die Morphologie der Zellen schlecht und die Intensität der FISH-Signale ungleichmäßig ist, wenn die Kerne sich überlappen, „split spots“ (Signale in gepaarter Anordnung) oder „minor bindings sites“ (unspezifische Bindungsstellen) auftreten (van Dekken et al., 1990; Poddighe et al., 1992). Ein Problem bei der Hybridisierung stellen unerwünschte Fehlhybridisierungen mit ähnlichen Sequenzen anderer Chromosome dar, die durch ungenügend stringente Bedingungen zustande kommen. Aus diesem Grunde ist eine ideale Zusammensetzung der Hybridisierungslösung, in der sich die markierte Sonden-DNA befindet, besonders wichtig und muss für jede Probe einzeln ermittelt werden. Die optimalen Stringenzbedingungen sowie die Markierungsqualität der Sonden wurden im Vorfeld an Lymphozytenpräparaten ausgetestet (Institut für Humangenetik). Je mehr Homologie zwischen aliphoiden repetitiven DNA-Sequenzen auf den verschiedenen Zentromeren besteht, um so häufiger kommt es zu Kreuzhybridisierungen bei

Verwendung von zentromerspezifischen Proben (aufgrund von unspezifischen Bindungsstellen) auf den anderen Chromosomen (Willard, 1985; Cremer et al., 1986; Devilee et al., 1986a, 1986b; Jorgensen et al., 1986). Auch die Qualität der Präparate ist für die selektive Bindung an die Zielsequenz wichtig, ebenso kleine Variationen in der Denaturierung von chromosomaler DNA oder in den Hybridisierungsbedingungen (Devilee et al., 1986a, 1986b). Das wiederum hängt von den jeweiligen Hybridisierungsbedingungen (Zusammensetzung des Hybmix) und den Stringenzwaschungen (SSC-Konzentration) für die einzelnen Sonden ab. So wurden diese Schritte zur Verbesserung der Signalqualität im FISH-Protokoll angepasst. Dabei mussten die Sonden 9 und 17 nicht amplifiziert werden, dafür die Sonden 7 und 8 stringenter gemacht werden. Um eine gute Qualität der Präparate zu gewährleisten, erfolgten die FISH-Untersuchungen an den Zellen aus der Primärkultur am selben Tag der Fixierung bzw. zeitnah. Insgesamt konnten die Signale der verschiedenen Sonden zufriedenstellend ausgezählt und ausgewertet werden. Beim Versuch der Kultivierung von Tumorstückchen im Ko-Kultivierungsmodell mit ECM-Beschichtung konnten aufgrund überlappender Zellen die FISH-Signale keinem genauen Zellkern zugeordnet werden. Im Invasionsmodell konnten Zellen durch die Poren an die Membranrückseite wandern und einen Monolayer bilden, somit war eine Erfassung der FISH-Signale einfacher durchzuführen. In der vorliegenden Arbeit wurde zu jedem Tumorfall auch das dazugehörige makroskopisch normale Harnblasengewebe parallel in Kultur gebracht, und mittels FISH (in doppelkammerigen Objektträgern) mit den identischen zentromerspezifischen Sonden untersucht. Bei der Gegenüberstellung der Ergebnisse konnte ein signifikanter Unterschied hinsichtlich Aneuploidien festgestellt werden. Dies sprach für eine zuverlässige Hybridisierung und somit für eine gute Qualität der Präparate.

### **4.3.3 Chromosomenveränderungen bei der Zellkultur des Harnblasenkarzinoms**

Während nicht invasive Grad I und II TCCs primär diploid sind und abgesehen von einer Monosomie des Chromosoms 9 (Cairns et al., 1993; Eleuteri et al., 2001; Placer et al., 2005) nur wenige chromosomale Veränderungen aufweisen, scheinen DNA-Aneuploidien oder zytogenetische Veränderungen mit einem fortgeschrittenen Stadium der Erkrankung und einer schlechten Prognose assoziiert zu sein (Fadl-Elmula et al., 2000; Jiang et al., 2003, Leonardo et al., 2005). Besonders fortgeschrittene Karzinome wurden in meiner Arbeit untersucht: FISH an Primärkulturen von fortgeschrittenen TCCs (von pT1 GIII bis pT4a, pN2, GIII) der Chromosomen 7, 8, 9, 17 und Y, sowie in höherer Passage im Invasionsmodell an

Chromosom 8. Auch wenn die Signifikanz und die Frequenz der ermittelten Aneuploidien den Erwartungen nicht ganz entsprachen, konnten jedoch in einigen Fällen deutliche Befunde erfasst werden. Bei T1 Tumoren wurde lange nur der histologische Grad als prognostischer Faktor für Progression angesehen. Ribal et al. zeigte 2004, dass chromosomale High-Polysomien ebenfalls als Prädiktor von Tumorprogression in T1 TCCs galten. Dabei wurden numerische Veränderungen der Chromosomen 7, 8, 9 und 17 mittels FISH mit zentromerspezifischen Sonden an 31 Proben aus Primärmaterial von Patienten mit T1 TCC ermittelt. Die Patienten wurden über einen längeren Zeitraum nach Diagnosestellung beobachtet und es konnte gezeigt werden, dass neben dem histologischen Grading eine vorliegende High-Polysomie für die Chromosomen 8, 9 und 17 ein erhöhtes Risiko für muskelinvasives Wachstum darstellte. In meiner Arbeit konnten Polysomien dieser Chromosome mittels FISH bei den fortgeschrittenen muskel-invasiven Tumoren auch nachgewiesen werden.

Weiterhin wurde in einer Studie von Fadl-Elmula et al. Biospien aus 34 primären TCCs kurzzeitig in Kultur (short-term-culture: 24 bis 48 Stunden) gebracht und anschließend zytogenetisch nach G-banding analysiert. Dabei konnte gezeigt werden, dass Verlust genetischen Materials häufiger vorkam als Gewinn (Fadl-Elmula et al., 2000). Es wurden sowohl numerische Verluste als auch strukturelle rearrangements von Chromosomen berücksichtigt. Zu bemerken ist, dass die untersuchten Tumore sowohl niedrig als auch hoch maligne waren, also handelte es sich nicht ausschließlich um fortgeschrittene Stadien wie in meiner Arbeit. Ribal et al. konnte in diesem Zusammenhang auch eine enge Korrelation zwischen karyotypische Komplexität und Tumorgrad/-stadium beobachten, welche möglicherweise die progressive Ansammlung erworbener genetischer Alterationen als treibende Kraft der Karzinogenese des TCCs darstellt (Ribal et al., 2004). Aus den Tabellen 8, 9 und 10 (Seite 40/41/42) ist zu ersehen, dass in den mittels FISH untersuchten Zellen der Primärzellkultur sowohl Monosomien als auch Polysomien der Chromosomen 7, 8, 9, 17 und Y vorkamen, wobei deutlich mehr Polysomien ermittelt wurden. Die nachgewiesenen Aneuploidien lagen unabhängig vom Tumorenstadium vor, wobei bei den pT3 und pT4-Tumoren mehr Chromosomen pro Tumorfall betroffen waren, anders ausgedrückt multiple Polysomien vorlagen. Gerade bei dieser Gruppe kam es innerhalb der Beobachtungszeit zu 3 Todesfällen: Fall 47 pT3a GIII, Fall 39 pT3b GIII und Fall 41 pT4. Im Fall 39 lagen histopathologisch die einzige lymphangitische Karzinose pL1 und der einzige Veneneinbruch pV1 der Patientengruppe vor. Metastasierung wurde bei Fall 41 festgestellt. Bei Fall 47 konnte

keine FISH-Untersuchung erfolgen, bei den zwei anderen Fällen zeigten sich jedoch multiple Aneuploidien, darunter ein hoch signifikanter Verlust und Gewinn von Chromosom Y. Eine Lymphknotenbeteiligung konnte insgesamt in 7 von 17 Fällen vom Pathologen nachgewiesen werden. Diese kam bei den sehr fortgeschrittenen Tumoren vor (ab pT3a), deren Primärkulturen auch multiple Polysomien aufwiesen.

In meinem Kontingent von 17 untersuchten Tumoren fiel auf, dass die 2 einzigen GII-Tumore, jeweils Stadium pT2, keine Aneuploidien aufwiesen. Dafür zeigte die Gruppe der pT1 GIII TCCs (5 Fälle) numerische Aberrationen. Gerade pT1 GIII-Tumore bereiten dem Kliniker bei der Auswahl einer Therapie Schwierigkeiten (Malavaud, 2005). Es wurde angenommen, dass zusätzliche Risikofaktoren, wie z.B. Multifokalität, das initial gute Ansprechen auf eine konservative Therapie von T1GIII Tumoren negativ beeinflussen. Andererseits könnte eine frühe radikale Cystektomie für einige Patienten eine exzessive Therapie, ein overtreatment bedeuten. Dieser operative Eingriff würde eine deutliche Einschränkung der Lebensqualität mit sich bringen. Malavaud empfahl eine radikale Cystektomie erst durchzuführen, wenn neben einem „tiefen“ T1 Tumor (> pT1a oder > 1,5 mm Tiefe) zusätzlich ein Faktor für eine schlechte Prognose vorliegen würde: Multifokalität, Assoziation mit carcinoma in situ, Prostatabeteiligung oder schwieriger Resektionslokalisation.

Die Tatsache, dass numerische Aberrationen von Subpopulationen im Frühstadium des Harnblasentumors mit aggressivem Verhalten korrelieren, hebt die Wichtigkeit der Zytogenetik, in unserem Fall die FISH an Primärkulturen, in der Therapiegestaltung des einzelnen Patienten hervor.

### **Chromosom 17**

Am Häufigsten zeigten sich in meiner Arbeit Polysomien des Chromosoms 17. Keine einzige Monosomie 17 wurde ermittelt. In 9 von den 17 untersuchten Fällen konnten Polysomien nachgewiesen werden. Mit steigender Malignität der Tumore (pT3 GIII und pT4) nahm der Anteil an Aneuploidien zu.

Inoue et al. untersuchte die klinische Signifikanz von HER-2 Gen-Alterationen sowie der Polysomie 17 mittels FISH an Urothelzellen aus Urinproben von 105 Patienten mit TCC unterschiedlicher Malignität (Cis, mit Rezidivneigung und im fortgeschrittenen Stadium) (Inoue et al., 2004). In 45 Fällen wurden diese Ergebnisse mit den FISH-Untersuchungen an

Paraffinmaterial des betroffenen Tumors verglichen. In 80% der Fälle konnte eine Korrelation zwischen high-grade-Polysomie von Chromosom 17 und die Malignität des Tumors festgestellt werden (insbesondere bei fortgeschrittenen Tumoren und Cis). Auch Placer et al. zeigte in einer FISH-Studie der Chromosomen 7, 8, 9 und 17 an Paraffinmaterial aus histologischem Material von 37 TCC, dass gerade die Polysomie der untersuchten Chromosomen mit fortgeschrittenen Tumoren korrelierte (Placer et al., 2005). Leonardo et al. untersuchte in einer weiteren FISH-Studie des Harnblasenkarzinoms 30 TCCs (histologische Präparate, paraffin-fixiert) unterschiedlicher Malignität auf die Frequenz von c-erb-2 Genamplifikation sowie Aneusomien der Chromosomen 7, 9 und 17. Es wurde letztlich nur die Aneusomie des Chromosoms 17 als Marker für fortgeschrittene und aggressive Harnblasenkarzinome bestätigt (Leonardo et al., 2005).

Für den Übergang in die Metastasierung werden Mutationen auf Chromosom 17p13 (p53) verantwortlich gemacht, denn diese chromosomalen Veränderungen wurden sowohl im Primärtumor als auch in der Metastase (Lymphknoten) nachgewiesen (Cheng et al. 2001). Eines der Steuerungselemente, welches beim Harnblasenkarzinom in über 50% der Fälle mutiert ist, ist das Tumorsuppressorgen p53 (Wolf et al., 2001; Kielb et al., 2001). Als Kontrollelement bewirkt p53 einen Wachstumsarrest und eine Induktion des programmierten Zelltodes, insbesondere nach DNA-Schädigung. In nahezu 60 % aller menschlichen Tumore ist der zelluläre Wächter p53 ausgefallen. Solche Veränderungen im p53 Gen stellen damit die häufigste gemeinsame genetische Veränderung in menschlichen Tumoren dar. Chemo- und Strahlentherapie wirken häufig über die p53 Ebene. Sie schädigen die DNA so stark, dass p53 aktiviert wird und mit Hilfe der Apoptose (Selbstmordprogramm) der Zelltod der Tumorzellen eingeleitet wird. Verschiedene Formen der p53 Mutation führen zu einer erhöhten Chemosensitivität (Chang et al., 2001). Bereits 1993 wurde eine enge Korrelation zwischen p53 Mutation und Polysomie des Chromosoms 17 in der Tumorprogression des TCCs festgestellt, es wurden immunhistochemische sowie FISH-Untersuchungen an formalin-fixierte TCCs durchgeführt (Moch et al., 1993). Mutationen und Veränderungen des p53 Proteins werden heutzutage durch verschiedene Untersuchungen wie Immunhistochemie, Single-Strang-Conformation Polymorphismus (SSCP) und Mutationsanalyse erkannt (Tiguert et al., 2001; Dahse et al., 2002; Lu et al., 2002). Unter SSCP versteht man ein molekulares Nachweisverfahren, welches die Zusammensetzung und Veränderung von mikrobiellen Lebensgemeinschaften charakterisiert. Sie zählt zu den molekularen "Fingerprint"-Methoden. Mit einer Probe wird eine DNA-Extraktion vorgenommen, wodurch die DNA der

Lebensgemeinschaft erhalten wird. Mit dieser wird eine PCR mit universellen Primern für die 16S rRNA durchgeführt. Hierbei handelt es sich auf der einen Seite um einen universellen Rückwärtsprimer mit Phosphatgruppe und auf der anderen Seite um einen universellen Vorwärtsprimer. Die in der PCR entstandenen DNA-Doppelstränge werden mit einer Lambda Exonuklease verdaut, so dass nur noch DNA-Einzelstränge ohne Phosphatgruppe übrig bleiben. Mit den Einzelsträngen findet nun eine Gelelektrophorese statt. Nach Anfärben (z.B. mit Silberfärbung) der DNA im Gel können einzelne Banden aus dem Gel ausgeschnitten, kloniert und sequenziert werden. Vorteil von molekularen "Fingerprint"-Methoden ist die Möglichkeit der simultanen Analyse von einer großen Anzahl an Proben. Dabei konnte gezeigt werden, dass Patienten mit alterierten p53 pathways, durch Überexpression oder Mutationen, das schlechteste klinische Outcome haben. TP53 Mutationen scheinen oberflächliche TTCs zu charakterisieren, die eine Neigung zu Rekurrenz oder Progression zu muskel-invasivem Wachstum zeigen.

Auch beim Kolonkarzinom und beim Brustkrebs spielt die Polysomie des Chromosoms 17 in der Onkogenese eine Schlüsselrolle (Garcia et al., 2003; Takehisa et al., 2007).

Die Auswertung der Literatur zeigte, dass die Polysomie 17 meist mit numerischen Aberrationen anderer Chromosomen assoziiert ist. Von den 3 verstorbenen Patienten (Fälle: 39, 41 und 47) konnten die Proben, bzw. die Primärkultur, von Fall 39 und 41 zytogenetisch untersucht werden, dabei zeigten sich jeweils multiple Polysomien bzw. Monosomien pro Fall.

### **Chromosom 7**

In drei Fällen meiner Arbeit war eine signifikante Polysomie (>20% 3 oder mehr Signale pro Zellkern) des Chromosoms 7 nachweisbar, in 2 Fällen mit einer Polysomie des Chromosoms 17 gekoppelt. Insgesamt konnten numerische Aberrationen des Chromosoms 7 in 7 Fällen ermittelt werden. Wie auch bei Chromosom 17 wird in der Literatur eine Polysomie des Chromosoms 7 mit fortgeschrittenen TTCs in Zusammenhang gebracht. In der vorliegenden Arbeit konnte in zwei Fällen, BT38 und BT55, ein signifikanter Gewinn von über 20% nachgewiesen werden (Tumorklassifikation: pT2a GIII und pT3a GIII). In zwei weiteren Fällen ein Gewinn von jeweils 11 und 10 %. Im Fall 55 lag in der korrespondierenden Zellkultur der gesunden Mukosa des Falls 55 ebenfalls ein Gewinn von 24 % von Chromosom 7 vor (28% bei BT55). Dieser Gewinn stellte die einzige signifikante Aneuploidie des Chromosoms 7 in der FISH-Untersuchung der Zellkultur des normalen

Urothelgewebes der gesamten untersuchten Fälle dar. Es ist anzunehmen, dass die numerische Aberration im Gewebestück bereits vor Kultivierung vorlag. Dies spricht für die Multifokalität des TCCs, auch im makroskopisch gesund wirkenden Gewebe. Und somit könnte im frühen Tumorstadium eine nachgewiesene Polysomie 7 ein Prädiktor für die Tendenz zu einem invasiven Wachstum darstellen. In zwei FISH-Studien konnte mittels zentromerspezifischen Proben, u.a. Chromosom 7 an exfoliierten Urothelzellen aus Urinproben und aus Harnblasenwaschungen von Patienten mit TCC unterschiedlicher Stadien gezeigt werden, dass der Gewinn des Chromosoms 7 mit fortgeschrittenem Stadium und high-grade Tumoren eng korrelierte (Zhonghua-Zhong-Liu-Za-Chi et al., 2000; Degtyar et al., 2004). Auch für Tumorrekurrenz scheint eine Polysomie von Chr. 7 bei pTa/pT1 Tumoren ein Marker zu sein (Watters et al., 2000).

Dennoch konnten in der vorliegenden Arbeit neben den 2 Fällen mit signifikantem Gewinn von Chromosom 7 immerhin 5 Fälle mit Verlusten (-10 bis -19%) ermittelt werden. Somit könnte auch eine Monosomie des Chromosoms 7 einen prognostischen Faktor für invasiv wachsende TCCs darstellen. Diese wurde jedoch in der Literatur wenig beschrieben. Gallucci et al. verglich in einer Studie numerische Aberrationen (Chr. 3, 7, 9 und 17) und spezifische Gendeletionen (u.a. 9p21 und 17p13.1) zwischen Tumorgewebe von 48 muskelinvasiven TCCs und deren benachbarte gesunde Mukosa (formalin-fixiert) mittels FISH (Gallucci et al., 2005). Es konnte gezeigt werden, dass in der Frequenz der Gendeletionen keine signifikanten Unterschiede auftraten, aber dass die Monosomie von Chromosom 7 eindeutig mit TCCs Stadium III und IV assoziiert sei.

### **Chromosom 9**

Auch numerische Aberrationen des Chromosoms 9 konnten vermehrt bei Grad III und fortgeschrittenem Stadium ermittelt werden. Veränderungen des Chromosoms 9 wurden im Zusammenhang mit TCC am ausführlichsten untersucht. Nicht zuletzt, weil die Monosomie des Chromosoms 9 die häufigste beschriebene Veränderung in der Literatur darstellt, insbesondere im Frühstadium des TCCs. Häufig ist sie als einzige Veränderung bei oberflächlich wachsenden Urothelkarzinomen nachgewiesen worden (Cairns et al., 1993; Placer et al., 2005).

In der vorliegenden Arbeit wurden in vivo invasiv wachsende Tumore untersucht und es konnte nur eine Monosomie des Chromosoms 9 im Fall 54 (pT2, GIII) mit -16% gezeigt werden. Interessanterweise wurde in diesem Fall ebenfalls ein Verlust von Chromosom 7

verzeichnet. Und nur in den Fällen 51 und 50 war die Polysomie 9 als einzige Veränderung der untersuchten Chromosome nachweisbar. In den weiteren Fällen war die Aneuploidie mit anderen gekoppelt. In einer Studie der Universitätsklinik Barcelona kam bei der FISH-Untersuchung von 37 Proben von TCCs verschiedener Malignitätsstadien aus Zystektomien und transurethralen Resektionen heraus, dass die Monosomie 9 mit TCC Grad I-II vergesellschaftet waren. Demgegenüber konnte in den TCC Grad III-IV und pT1-4 Tumoren eine Polysomie der Chromosome 9, 7, 8 und 17 nachgewiesen werden (Placer et al., 2005). Die Ergebnisse dieser Studie ergaben Hinweise darauf, dass pT1 Tumoren auf genetischer Ebene den muskelinvasiven Tumoren ähneln. Weiterhin zeigte eine Untersuchung mittels FISH an aus Urin gewonnen Urothelzellen, dass eine Polysomie für die Chromosomen 7 und 9 mit high-grade TCCs assoziiert waren und Monosomie 9 dafür mit früher Tumorrekurrenz korrelierte (Degtyar et al., 2004). In meiner Arbeit konnte in 9 Fällen eine Polysomie des Chromosoms 9 verzeichnet werden. Der Gewinn lag prozentual zwischen 10 und 14%. Die verstorbenen Patienten der Fälle 39 und 41 hatten die Polysomie von Chromosom 9 und 17 als Gemeinsamkeit.

Die Monosomie 9 spielt in der Entstehung und der Prognose des TCCs eine bedeutsame Rolle. Es konnte gezeigt werden, dass urotheliale Dysplasien numerische Abberationen bzw. Deletionen an Chromosom 9 und 17 aufweisen, die ebenfalls im fortgeschrittenen TCC nachzuweisen sind. So entstand die Hypothese, die Monosomie 9 könne eine frühe neoplastische Läsion in der „multistep“ Entwicklung des TCC sein (Obermann et al., 2004). Tumorrekurrenz und Tumorprogression werden eng mit der Monosomie des Chromosomes 9 in Verbindung gebracht. In einer weiteren Studie wurden 105 TCC-Proben (formalin-fixiert) von 53 Patienten mit TCCs bezüglich Chromosom-9-Verlust und dessen Korrelation zu Rekurrenz- und Progressionsneigung mittels FISH (pericentromerischer satellite marker 9q12) untersucht (Bartlett et al., 1998). Dabei konnte gezeigt werden, dass bei 36% der untersuchten TCCs mit Rekurrenzneigung eine Monosomie 9 vorlag. Diese Veränderung war sowohl beim Primärtumor als auch in den subsequenten TCCs nachweisbar. Bei einem einzigen Patient mit TCC ohne Rekurrenzverhalten konnte eine Monosomie festgestellt werden, sonst waren alle TCCs ohne Rekurrenzverhalten diploid, auch für die Chromosomen 7 und 17. Auch für das multifokale Auftreten des TCCs wird die Monosomie 9 verantwortlich gemacht (Simoneau et al., 1999; Jung et al., 1999; Hartmann et al., 2000; Tsukamoto et al., 2002). In einer weiteren FISH-Studie wurden von 31 TCC-Proben der histologische Befund mit Ergebnissen von FISH-Untersuchungen mit zentromerspezifischen Proben der

Chromosomen 7, 8, 9 und 17 im Hinblick auf Tumorprogression und Rekurrenz untersucht (Ribal et al., 2004). Die klinischen Daten wurden aus den Patientenakten erhoben und mit chromosomalen Studien verglichen. Es konnte wie erwartet bestätigt werden, dass der histologische Befund als prognostischer Faktor für Tumorprogression ( $p=0.01$ ) an erster Stelle steht. Aber auch high-Polysomien der Chromosomen 8, 9 und 17 konnten in dieser Studie prognostisch zur Tumorprogression herangezogen werden. Die Progression von TCCs zu invasiven TCCs scheint mit dem Erwerb von genomischen Alterationen wie z.B. Aneuploidien, die das maligne Potential von Krebszellen erhöhen, vergesellschaftet zu sein. Während des Übergangs in das invasive Wachstum kommt es möglicherweise zu einer Selektion eines Zellklons mit einer Polysomie von Chr. 9. Die allgemeine genetische Instabilität des TCCs kann hierfür als Ursache herangezogen werden.

Numerische Aberrationen des Chromosoms 9 sollten aber auch nicht isoliert betrachtet werden, andere Begleitfaktoren scheinen ebenfalls auf die Malignität, bzw. auf die Progression zur Malignität, des TCCs Einfluss zu haben. Es konnte gezeigt werden, dass isolierte CIS (carcinoma in situ)- Läsionen keinen signifikanten Verlust des Chromosoms 9 boten, hingegen konnten bei den CIS-Läsionen bei gleichzeitigem Vorliegen eines TCCs eindeutige Verluste verzeichnet werden. Im Gegensatz dazu traten bei den nicht invasiven Tumoren die Chromosom-9-Verluste früher auf und waren oft mit einer homozygoten Deletion von 9p21 assoziiert (Hopman et al., 2002). In unserer Arbeit lagen bei Polysomie des Chromosoms 9 numerische Aberrationen der anderen untersuchten Chromosome vor. Somit sollte auch bei Vorliegen einer Aneuploidie von Chr. 9, Veränderungen der anderen Chromosome als Kriterium für Malignität herangezogen werden.

### **Chromosom Y**

Das Chromosom Y war ebenfalls bei den fortgeschrittenen Tumoren und den Todesfällen vertreten. Im Fall 48 war der Verlust von Y die einzige nachgewiesene Veränderung.

In der vorliegenden Arbeit wurden 10 Fälle auf Veränderungen des Chromosoms Y untersucht. Davon konnte in 4 Fällen ein Verlust von mehr als 20% und in 2 Fällen ein Gewinn (+64% und +14%) in den kultivierten Tumorzellen beobachtet werden. Diese Aneusomien waren in 3 Fällen auch in der gesunden Mukosa, wenn auch im geringeren Maße, nachvollziehbar (siehe Tab.8 Seite 40: Fall 42, 48 u. 55). Als gemeinsamen histologischen Parameter wiesen die 6 Fälle mit Aneuploidien des Chromosoms Y Grad III auf. Bei den 4 Fällen mit Verlust lag Tumorstadium von pT1 bis pT3b vor, bei den 2 Fällen

mit Gewinn pT4a und pT3a. Zu bemerken ist, dass der höchste Verlust – 44% und der höchste Gewinn +64 % jeweils bei den fortgeschrittensten Tumoren, pT3b GIII pN2 pL1 pV1 (Fall 39) und pT4a GIII M1 (Fall 41), zu verzeichnen waren. Und gerade diese zwei Patienten sind verstorben. Diese Befunde sprechen erneut für die genetische Instabilität des fortgeschrittenen TTCs und trotz der geringen Probenzahl zeigte sich hier ebenfalls eine Korrelation zwischen numerischer Aberration und invasivem Wachstum.

Numerische Aberrationen des Chromosoms Y könnten Veränderungen im Laufe der Tumorprogression unterliegen. Generell werden Y-Verluste in soliden Tumoren beobachtet (Kujawski et al., 2004). Auch in der Literatur wird ein Verlust von Chromosom Y im frühen TCC-Stadium, auch Bilharziose-assoziiert, beschrieben (Sauter et al., 1995; Aly et al., 2002). In einer Studie wurde der Verlust des Chromosoms Y mittels FISH an Zellen aus formalinfixierten TCCs von 68 männlichen Patienten sowie post-mortem an Zellen aus 11 Harnblasenwaschungen männlicher Patienten mit negativer TCC-Anamnese ermittelt (Sauter et al., 1995). Bei den Tumoren konnten 34% Y-Verluste, 41% Y- Monosomie und 25% Y- Polysomie nachgewiesen werden, somit ähnliche Ergebnisse wie in der vorliegenden Arbeit. Es konnte jedoch keine Assoziation zwischen Tumorgrad und -stadium mit dem Verlust des Chromosoms Y hergestellt werden. Dagegen war das Alter der Patienten höher bei den Tumoren mit Y-Verlust als bei den Patienten mit Tumoren ohne Y-Verlust. Somit könnte der Y-Verlust auch einen typischen „Alterseffekt“ darstellen. An 16 permanenten humanen Zelllinien von TCCs konnte zum Vergleich mittels FISH eine Polysomie des Chromosoms X (Männer:Frauen-Ratio 12:4) unabhängig vom Tumorstadium festgestellt werden (Yu et al., 2002). Interessanterweise zeigte sich bei den Untersuchungen der Zellen aus den Harnblasenwaschungen TCC-freier Patienten eine eindeutige Subpopulation (38 % der Zellen) mit Nullisomie für Y. Es wurde daraufhin postuliert, dass möglicherweise der Y-Verlust als Ereignis im frühen Stadium des Harnblasenkarzinoms stattfinden könnte. Vor allem mit dem Bilharziose-assoziierten Harnblasenkarzinom schien diese Veränderung, neben der Monosomie 9 und 17 sowie dem Gewinn von Chromosom 7, vergesellschaftet zu sein (Khaled et al., 2000; Aly et al., 2002).

In einer Studie der Universität Kairo kam bei der Untersuchung des Bilharziose-assoziierten TCCs im frühen Stadium eine analoge Diskussion auf (Khaled et al., 2000). Mittels FISH konnte an TCC-Gewebe (in Paraffin eingebettet) von insgesamt 25 betroffenen ägyptischen Patienten gezeigt werden, dass der Y-Verlust, nach der Monosomie des Chromosoms 9, die häufigste Aneusomie im frühen Stadium des Bilharziose-assoziierten TCC darstellte.

Allerdings konnte keine Korrelation zwischen klinischen und histopathologischen Parametern und dem Y-Verlust gezeigt werden. Aly et al. zeigten 2002 an histologischem Material (eingefroren- frozen stored samples) von 35 Patienten im Frühstadium des Bilharziose-assoziierten TCCs mittels FISH ähnliche Ergebnisse (Aly et al., 2002), wobei in dieser Studie eine eindeutige Korrelation zwischen Bilharziose-Anamnese und Y-Verlust bestand, im Vergleich zu den anderen untersuchten Chromosomen (7, 9, 10 und 17). Auch für Rekurrenzverhalten oder Progression schien der Verlust von Y keine prognostische Bedeutung zu haben (Sauter et al., 1995; Neuhaus et al., 1999). Neuhaus et al. untersuchte insgesamt 67 pTa und 38 pT1 Tumore (formalin-fixiert) mittels FISH mit zentromerspezifischen Sonden für Chromosom 1, 17 und Y (Neuhaus et al., 1999). Dabei konnte gezeigt werden, dass die Rekurrenz bei pTa-Tumoren mit Polysomie der Chromosomen 1 und 17 einhergeht, und die Progredienz mit Polysomie des Chromosoms 17. Hingegen konnte ein Verlust von Y weder mit Progression noch mit Rekurrenzverhalten in Zusammenhang gebracht werden.

In der Literatur wird aber auch ein Gewinn des Chromosoms Y mit dem fortgeschrittenen TCC in Verbindung gebracht. In einer Studie von 2006 wurden 35 TCCs verschiedener Stadien von männlichen Patienten auf Aberrationen der Chromosomen X und Y mittels FISH an formalin-fixiertem Material untersucht (Panani et al., 2006). In 22 Fällen zeigten sich signifikante numerische Aberrationen, dabei wurden mehr Fälle von Polysomien (37,14%) als von Verlusten (25,71%) nachgewiesen. Die statistische Analyse ergab, dass die Polysomie Y insbesondere mit pT1 GIII Tumoren als mit niedrig malignen Tumoren korrelierte. Auch der Verlust von Y konnte verzeichnet werden, wobei der Gewinn überwog (Panani et al., 2006). So liefern Literaturergebnisse zu Aneuploidien des Chromosom Y in der Pathogenese des Harnblasenkarzinoms heterogene Resultate. In unserer Arbeit wurden bei den fortgeschrittenen TCCs sowohl signifikante Gewinne als auch signifikante Verluste des Chromosoms Y verzeichnet. Diese Tatsache spricht für die genetische Instabilität des Harnblasenkarzinoms. Dennoch sollten signifikante Aneuploidien des Chromosoms Y in der Diagnostik und in der Überwachung des TCCs als Hinweis für Malignität angesehen werden. Des Weiteren könnten diese Ergebnisse doch einen Hinweis dafür sein, dass mit dem Verlust oder dem Gewinn von Chromosom Y, das TCC ein typisch „männliches“ Karzinom ist.

## Chromosom 8

Signifikante Veränderungen des Chromosoms 8 wurden in der vorliegenden Arbeit in der klassischen Primärkultur in der niedrigen Passage kaum nachgewiesen. In den meisten Fällen der FISH-Untersuchungen konnte eine Euploidie für das Chromosom 8 festgestellt werden, indirekt definiert durch den fehlenden Nachweis eines Zugewinns oder Verlustes eines Signals. In den Fällen 38, 40 and 45 zeigte sich ein Gewinn von jeweils 11%. Doch eine Korrelation zu einer bestimmten Patientengruppe, z.B. pT3-pT4 TCC, konnte nicht erfolgen. Dieser Gewinn war in den höheren Passagen der Fälle 38 und 45 in der FISH-Untersuchung am Objektträger (Tabelle 13, Seite 58) mit höherer Signifikanz ermittelbar. In der Literatur wird die Polysomie des Chromosoms 8 im Zusammenhang mit dem TCC häufig beschrieben. Eine wichtige Rolle soll die Polysomie 8 bei der Tumorprogression und der Muskelinfiltration spielen. Watters et al. untersuchte insgesamt 37 Tumorproben (formalin-fixiert) von 19 Patienten mit TCCs pTa-pT1 auf Veränderungen von N-acetyltransferase 2 (NAT2 auf 8p22) und des Chromosoms 8 mittels FISH (Watters et al., 2001). Dabei wurde eine Polysomie 8 in 29% der Primärtumore, in 33% der Fälle mit Rezidivneigung pTa/pT1 und in 90% der dann muskelinvasiven Tumore nachgewiesen. Ein Zusammenhang mit dem Verlust von NAT2 konnte nicht hergestellt werden. Der gleiche Autor veröffentlichte zwei Jahre später eine Studie, die erneut eine Assoziation von Polysomie des Chromosoms 8 (und Chromosoms 1) mit der Progression zur Muskelinvasion herstellte (Watters et al., 2002). Es wurden Proben von 57 Patienten mit TCC pTa/pT1 ebenfalls mittels FISH untersucht. Eine Korrelation zu Rezidivneigung konnte aber nicht bestätigt werden.

Mahdy et al. verglich die histopathologischen Parameter von 24 Harnblasenkarzinomen (formalin-fixiert) mit dem Auftreten der Polysomie des Chr. 8, c-myc Gen-Alterationen sowie p53-Deletionen (mittels FISH). Von den 24 untersuchten TCCs zeigten 12 eine eindeutige Polysomie des Chromosoms 8. Je fortgeschrittener der Krebs, umso höher war der Gewinn an Chromosom 8 (Mahdy et al., 2001). Oder anders ausgedrückt, könnte ein höheres Staging eine erhöhte Inzidenz für das Auftreten von Aneuploidien bedeuten (Acar et al., 2003). In dieser Studie von Acar et al. wurden von 17 Patienten mit TCC sowohl Gewebeproben aus TUR und abgeschilferte Urothelzellen mittels Interphase FISH auf numerische Aberrationen der Chromosomen 8 und 11 untersucht. Die Inzidenz für das Vorliegen diploider Zellen war bei Grad-II-Tumoren höher als bei Grad-III-Tumoren. Umgekehrt waren weitaus mehr Polysomien bei Grad III Tumoren nachweisbar als bei Grad II Tumoren. Diese Ergebnisse waren sowohl am Biopsiematerial als auch an den im Urin gewonnenen Urothelzellen zu finden.

Ein Kopie-Gewinn des auf dem Chromosom 8 befindlichen c-myc Gens ist möglicherweise eine Erklärung für das invasive Wachstum des TCC. C-myc Kopiegewinn wurde in der oben angeführten Studie neben der Polysomie des Chr. 8 mit fortgeschrittenem Grading und Staging in Zusammenhang gebracht (Mahdy et al., 2001). Es wurden nämlich histologische Parameter mit Chromosom 8 Polysomie, c-myc Genalterationen sowie p53 Deletionen verglichen. Darüber hinaus konnte ebenfalls der Gewinn an c-myc Kopien sowie an p53 Deletionen signifikant mit Staging und Grading korreliert werden.

Zusammenfassend konnten sich in meiner Arbeit in der Primärkultur von fortgeschrittenen TCCs die Ergebnisse aus FISH-Untersuchungen an histologischen Präparaten und abgeschilfertem Urothelzellen aus den Literaturdaten zu großen Teilen widerspiegeln. Insbesondere scheint das Zusammenkommen von mehreren Aneusomien pro Tumor, insbesondere Polysomien, als Hinweis für muskelinvasives Verhalten zu gelten. Um so mehr erscheint die Ermittlung von Aneusomien in Urothelzellen (UroVysion, siehe 1.1.9) aus dem Urin in der Überwachung -surveillance- von erkrankten Patienten wichtig, gerade wenn der Befund der Urinzytologie unauffällig oder unklar ist. In einer Arbeit von Nguyen et al. von 2009 wurden Daten über die Konversionszeit zu einem FISH-positivem Befund in Zusammenhang mit Tumorrekurrenz bei insgesamt 149 Patienten mit unklaren FISH-Ergebnissen, sogenannte nondiagnostic FISH-Befund, und mit negativen FISH-Ergebnissen gegenübergestellt. Ein FISH-positiver Befund wurde definiert als Gewinn von 2 und mehr Chromosomen von Chr. 3, 7 und 17 in 4 Zellen, isolierter Verlust von 9p21 in 12 Zellen, oder isolierte Gewinne von nur 1 Chromosom in  $> 10\%$ . Non-diagnostic FISH-Befund wurde demgegenüber definiert als weniger als 4 Gewinne der Chr. 3, 7 und 17 in  $\leq 3$  Zellen. In der Beobachtungszeit dieser Studie von 30 Monaten konnte gezeigt werden, dass die Patientengruppe mit „nondiagnostic FISH-Befund“ signifikant höhere Raten an Progression zu FISH-positiven Befunden oder zu erneuter Tumorentwicklung aufwies im Vergleich zu der Patientengruppen mit FISH-negativem Befund. Die Progression erfolgte meistens innerhalb eines Jahres. Dagegen wiesen die Patienten mit unklarem FISH-Befund und nachgewiesener negativer Cytologie sowie unauffälliger Cystoskopie ein sehr niedriges Risiko zu Tumorrekurrenz auf, ähnlich dem der FISH-negativen Patienten (Nguyen et al., 2009).

#### 4.3.4 Invasionsmodell

Wie oben angeführt, wird die Polysomie des Chromosoms 8 in der Literatur sehr eng mit muskel-invasivem Wachstum des TCCs in Zusammenhang gebracht. Doch über das biologische Verhalten der einzelnen Tumorzellen ist noch wenig bekannt. In dem Invasionsmodell (Abb. 4, Seite 23) konnten mittels FISH (Sonde 8/c-myc) an der Unterseite der Fluoroblockmembran die Zellen untersucht werden, die die Matrigelschicht durchwandert haben. Bei der Auswertung erscheinen 8 c-myc als roter Punkt auf dem Locus 8q24 und Chromosom 8 Zentromer als grüner Punkt. Leider konnten an den Fluoroblock-Membranen keine Rhodaminsignale, rot für Locus 8q24, detektiert werden. Eine Erklärung hierfür könnte die Beschaffenheit der Fluoroblock-Membran sein. Denn das FISH-Protokoll wurde am Fluoroblock in dieser Arbeit zum ersten Mal durchgeführt.

Die untersuchten Zellen stammten aus der Primärkultur der 4 ausgewählten Tumorfälle und lagen in höheren Passagen (p5-p6) vor. Es konnte in den Fällen 38, 45 und 49 eine signifikante Polysomie des Chromosoms 8 verzeichnet werden (jeweils +19%, +24% und +25%). Parallel zu dem Invasionsmodell wurden die aufgetauten Zellen der ausgesuchten 4 Tumorfälle in Objektträgerkammern ohne Invasionsmöglichkeit kultiviert und mit der gleichen Sonde untersucht. Die Polysomie-Rate des Chromosoms 8 im Invasionsmodell war deutlich höher als bei der FISH an den Objektträgern der gleichen Zellkultur und Passage. Anders ausgedrückt, wiesen die Zellen, die in der Lage waren die Matrigelschicht zu durchwandern, mehr numerische Aberrationen als die regulär kultivierten Zellen in Objektträgerkammern auf. Es ist davon auszugehen, dass die Anwesenheit von Attractants- in unserem Falle stromale Faktoren der ko-kultivierten Fibroblasten- das invasive Verhalten der Zellen ermöglicht. Sekundär kam es zu einer Selektion besonders maligner Tumorzellen. Bekannt ist, dass die Anwesenheit von stromalem Gewebe Zytodifferentiation *in vitro* unterstützt und das Verhalten maligner TCC Zellen beeinflusst (Booth et al., 1997; Bindels et al., 2000). Diese Aussage wurde bereits unter 4.2. besprochen.

Jedenfalls scheint eine Korrelation zwischen Aneuploidie und die zelluläre Fähigkeit Stromagewebe zu infiltrieren, zu bestehen.

Im Fall BT49 zeigte sich im Invasionsmodell eine signifikante Polysomie von + 25%, die in der parallelen Untersuchung in Objektträgerkulturkammern gerade noch +12% betrug. In der Passage 2 im ersten Teil dieser Arbeit (Tabelle 8, Seite 40) waren keine Auffälligkeiten nachweisbar. In den Fällen BT 38 und BT 45 lag eine Polysomie von jeweils + 11% in der niedrigen Passage vor, im Vergleich zu 14 und 15 % in der höheren Passage. Somit bleiben in

der klassischen Zellkultur aneuploide Zellklone auch nach mehrfachem Passagieren erhalten, diese Zellen scheinen sogar bevorzugt zu wachsen, bzw. in der höheren Passage in der Kultivierung einen Selektionsvorteil zu haben.

Meine Untersuchungen zeigten, dass das Auftreten von Polysomie 8 beim TCC in vitro/ im Zellkultursystem stark von der Zellkulturmethode abhängig war. Während in der klassischen Zellkultur nur eine geringe Polysomierate des Chr. 8 in den niedrigen Passagen auftrat, zeigte sich in höheren Passagen eine Selektion zu Gunsten der Zellen bzw. der Zellklone mit Polysomie des Chr.8. Noch signifikanter wurde der Nachweis der Polysomie in den im Invasionsmodell kultivierten Zellen. Wir fanden eine Selektion zu Gunsten aneusomer Zellen, die in der Lage waren, an die Unterseite der Fluoroblockmembran zu wandern. Das Invasionsmodell bot in unserem Fall die Möglichkeit, genau die kultivierten Zellen zu selektieren, die malignes Wachstumsverhalten aufwiesen und in vivo z. B. muskelinfiltrativ wachsen würden. Anders ausgedrückt, konnte mit dem Invasionsmodell eindeutig eine Korrelation zwischen einer genetischen Veränderung, in meinem Fall die Polysomie 8, und eine Funktionsänderung der Zellen, nämlich der Invasionsfähigkeit, hergestellt werden.

In dieser Arbeit wurden die Zellen auf Aneuploidien des Chromosoms 8 untersucht. In einem weiteren Schritt könnte man gezielt die durchgewanderten Tumorzellen des Invasionsmodells auf andere genetische Veränderungen hin untersuchen, wie z.B. Deletionen. In der Tumorgenese des TCC wird zum Beispiel eine Beteiligung des HER2 (human epidermal growth factor receptor 2) angenommen und so als zusätzliches Diagnostikelement vorgeschlagen (Krueger et al., 2002; Hauser-Kronberger et al., 2006). HER2 oder c-erb-2 ist ein transmembranäres Rezeptorprotein. Es ist in die Regulation von Zellwachstum und – differenzierung involviert und dient als Rezeptor von Wachstumsfaktoren. In normalen Zellen ist das HER2-Protein immunhistochemisch nicht nachweisbar, hingegen beobachtet man bei Überexpression eine membranständige und z.T. auch zytoplasmatische Reaktion. Die Firma DakoCytomation bietet seit Anfang 1999 unter dem Namen HercepTEST™ einen immunhistochemischen Test zum Nachweis des membranständigen Rezeptors HER2 bei Mamma-Karzinomen an. Der Test dient der Ermittlung des HER2-Status als Vorbedingung für eine mögliche Therapie mit Trastuzumab, die im Falle einer Überexpression in Frage kommt. Trastuzumab ist ein therapeutischer humanisierter monoklonaler Antikörper gegen HER2 auf der Zelloberfläche von Krebszellen. Hauser-Kronberger et al. ermittelte die HER2-Überexpression an Paraffinmaterial von nicht invasiven und invasiven TCCs immunhistochemisch durch den HercepTest™ sowie mittels FISH und CISH (chromogenic in

situ hybridization) die HER2 Genamplifikation. In der Studie konnte immunhistochemisch (HercepTest) eine Überexpression in 37% der 203 untersuchten muskelinvasiven TCC (Paraffinpräparat) nachgewiesen werden, insbesondere bei high-grade Tumoren mit Lymphknotenmetastasen.

Die HercepTest-Methode könnte man durchaus in unserem Invasionsmodell durchführen. Auch hier würde dieser Test dem Kliniker eine zusätzliche Hilfe bei der Einschätzung eines TCCs bedeuten und somit die Therapie beeinflussen. In der klassischen Zellkultur oder im histologischen Präparat bestünde die Möglichkeit, die Häufigkeit der HER2-Überexpression zu ermitteln. In einem Invasionsmodell könnte man zusätzlich den Einfluß von Trastuzumab auf das Zellwachstum beobachten. Die Effizienz der Trastuzumab-Therapie für die Zellen einer Primärkultur des TCCs eines Patienten könnte mit der Erfassung der Durchwanderungsfähigkeit und der Durchwanderungszeit sowie der Apoptose-Analyse der behandelten Zellen gemessen werden. Klinische Versuche wurden bereits beschrieben. Peyromaure et al. behandelten 6 Patienten mit metastasiertem TCC mit einer Trastuzumab-basierten Chemotherapie über ein Jahr: 4 erhielten zusätzlich Paclitaxel und Carboplatin und einer Paclitaxel und kein Carboplatin. Auch wenn 5 der Patienten nach Beginn der Therapie innerhalb von 8 bis 22 Monaten verstarben, konnte eine Metastasenregression zwischen 30 und 80% bei guter Verträglichkeit der Chemotherapie beobachtet werden (Peyromaure et al., 2005). In diesem Zusammenhang werden prospektive Versuche benötigt, um diese therapeutische Option weiter zu untersuchen. Aktuelle Veröffentlichungen berichten von erfolgversprechenden therapeutischen Ansätzen in der Behandlung von Harnblasenkarzinomen durch den elektrogenen Transfer von einkettigem Interleukin12 an das einkettige variable Fragment des antiHER2-Antikörpers (antiHER2scFv-IL12). Tsay et al. zeigte 2009 in einem orthotopen syngenem Harnblasentumor-Modell, dass der Einsatz von antiHER2 Antikörper in Kombination mit IL-12 eine positive Verstärkung der Immunantwort bzw. des antineoplastischen Effektes auf die Krebszellen hervorrief. Anders ausgedrückt konnte nachgewiesen werden, dass das Tumorstadium deutlich zurückging und eine erhöhte Infiltration von CD4(+) und CD8(+) T-Zellen in der Mukosa sowie eine reduzierte Expression des VEGF (vascular endothelial growth factor) im Tumorgewebe nachgewiesen wurde (Tsay et al., 2009). Zu bemerken ist jedoch, dass weniger als 10% der invasiv wachsenden TCC eine HER2-Überexpression aufweisen. Laé et al. untersuchte 2009 immunhistochemisch mittels HER2-Antikörper Paraffinproben von insgesamt 1005 Patienten mit invasivem TCC. Darüberhinaus wurden alle Proben mit 2+ und 3+ HER2-Befund mittels FISH auf

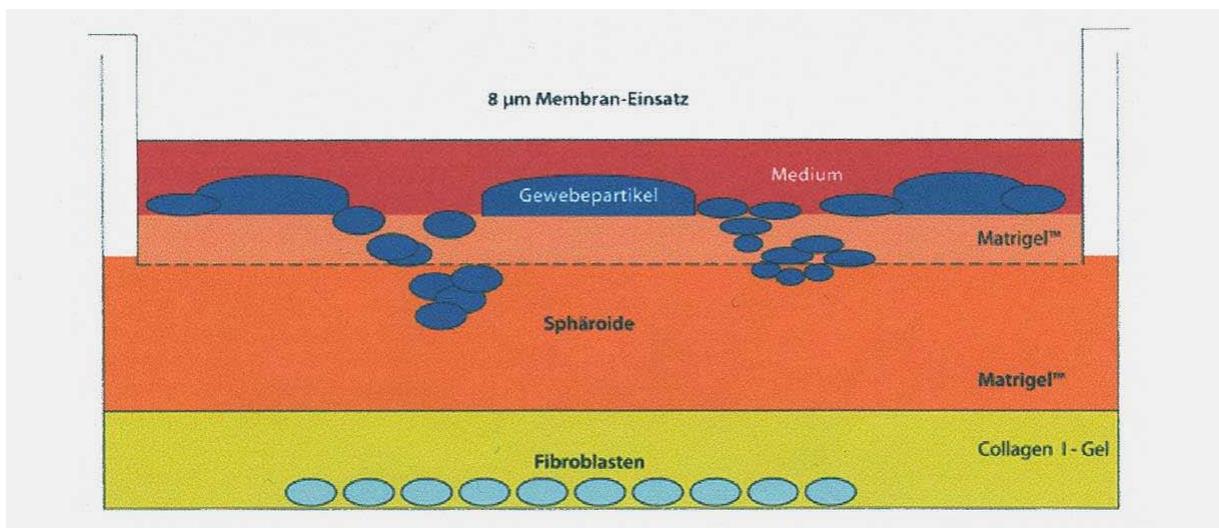
Genamplifikation untersucht. Dabei zeigte sich, dass nur bei 9,2% der Tumore eine Überexpression für HER2 zu beobachten war, und davon nur 5,1% eine Genamplifikation aufwiesen (Laé et al., 2009).

In einer weiteren Studie wurde u.a. in einem mit Matrigel beschichtetem Invasionsmodell der Effekt der HYAL1 Hyaluronidase Aktivität der permanenten Zelllinie HT1376 (high-grade TCC) untersucht (Lokeshwar et al., 2005). Erhöhte Konzentrationen der hyaluronischen Säure wurden bereits in Brust-, Kolon- und Prostatakrebs beobachtet, welche mit dem Tumorgrad korrelieren. Hyaluronidasen gehören zu den Endoglykosidasen, die am Abbau der Hyaluronsäure beteiligt sind. Lokeshwar et al. konnte zeigen, dass mittels HYAL1 AS-Zugabe ( antisense cDNA construct ), welches durch Blockieren der HYAL1-Expression wirkt, die invasive Aktivität der Tumorzellen in vitro deutlich reduziert wurde. Auch im Tierversuch konnte dieser Effekt im Vergleich zum Vektortumor beobachtet werden. Dies suggeriert, dass HYAL1-Expression die Zellproliferation und Invasion reguliert und somit als spezifischer Marker zur Detektion von high-grade Harnblasentumoren angesehen werden kann. Im Urin ist es möglich, mit einem Elisa-Verfahren die Hyaluronidaseaktivität zu messen (Loshkewar et al., 2000). Im Urin von Patienten mit Harnblasenkarzinom wurden bei mittelgradig bis schlecht differenzierten Tumoren (G2 und G3) 5- bis 8-fach höhere Konzentrationen als bei gut differenzierten Tumoren (G1) beobachtet (Pham et al., 1997).

Das Invasionsmodell erlaubt das Einsetzen verschiedener Methoden zur Beantwortung gezielter Fragestellungen in Bezug auf Prozesse des invasiven Wachstums. Zum Beispiel könnte die Rolle der MMP (matrix metalloproteinase) und TIMP (tissue inhibitor of metalloproteinase) am dynamischen Modell des Invasionsmodell neu untersucht werden. In den aktuelleren Publikationen wurde z.B. an Urothelzellen aus dem Urin die Methylierung der TIMP als möglicher Marker für Tumorprogression mittels real-time PCR untersucht. In einer Studie von Hoque et al. wurden 175 DNA-Proben aus Urinsediment von Patienten mit charakterisierten pathologischen und klinischen Parametern nach der oben genannten Methode untersucht (Hoque et al., 2008). Es konnte gezeigt werden, dass eine enge Korrelation zwischen Mortalität der Patienten und einer hohen TIMP-3-Methylierung bestand, diese wurde vermehrt bei den Grad-III-Tumoren und den metastasierten Stadien nachgewiesen. Im Invasionsmodell könnten die selektierten Zellen ebenfalls auf TIMP-Methylierung untersucht werden.

Darüber hinaus wurde unser Invasionsmodell als Vorlage zur Entwicklung eines dreidimensionalen Zellkultursystems für das Prostatakarzinom der Forschungsgruppe für

experimentelle Urologie der Universität des Saarlandes benutzt und erfolgreich weitergeführt. In dieser Arbeit von Jung et al. wurde ein Primärzellkulturmodell mit einem Invasionsystem kombiniert. So konnten nicht nur invasiv wachsende Zellpopulationen aus Primärkulturen selektioniert werden, sondern auch diese Zellen in einem 3D-Modell unter der Ausbildung von Sphäroiden weiter kultiviert werden. Zur Charakterisierung dieser Zellklone wurden vergleichende genomische Hybridisierungen durchgeführt. Das vorgestellte Invasionsystem ermöglichte es erstmalig, invasive Zellklone aus primärem Prostatakarzinomgewebe zu gewinnen und durch Kultivierung für weitere Untersuchungen zu verwenden (Jung et al., 2008).



**Abbildung 54: Schematische Darstellung des 3D-Invasionsmodells mit Sphäroiden**

Limitiert werden die Vorteile dieses Modells nur durch folgende Parameter:

- Man benötigt eine direkte praktische Kooperation zwischen Klinik (OP), Pathologie und Zellkulturlabor.
- Die experimentellen Arbeiten erfordern ein hohes Maß an Zellkulturerfahrung.
- Die Kultivierungstechnik ist langwierig und teuer.
- Nur über eine Vernetzung mit Molekulargenetik und molekularer Zellbiologie können valide Marker ermittelt werden.
- Das Modell bedarf in jeder Phase eine Rückkopplung mit Klinik und Histologie.

Im Mausmodell wurden, vorwiegend mit permanenten Zelllinien von TCC, ebenfalls therapeutische Ansätze der Behandlung des Harnblasenkarzinoms evaluiert. 2009 wurde ein Artikel über die Optimierung der Implantation von murinen Harnblasenkrebszellen (MBT-2) im syngenem Mausmodell veröffentlicht (Chan et al., 2009). Durch chemische Vorbehandlung der Harnblase der Maus (Phosphat-Puffer, HCl, Trypsin, Poly-L-Lysin) konnte eine zuverlässige Implantation der instillierten Zellen stattfinden. Das Tumorstadium wurde sonographisch verfolgt. Dieses Modell wurde als Grundlage zur Evaluation der therapeutischen Paradigmen des TCCs vorgeschlagen. Im direkten Vergleich bietet unser Invasionsmodell verschiedene Vorteile:

- Man ist nicht auf Tierversuche und die aufwendige Züchtung angewiesen.
- Die durchwanderten Zellen gehören einem invasiven Zellklon an und repräsentieren mit sehr hoher Wahrscheinlichkeit den Ursprungstumor.
- Die durchgewanderten Zellen können direkt molekular-genetischen Untersuchungen unterzogen werden, bzw. weiterkultiviert werden.

#### **4.3.5 FISH-Untersuchung der Primärkultur des makroskopisch normalen Urothelgewebes**

Neben Tumorgewebe bzw. Zellen wurde auch das normale Gewebe zum jeweiligen Fall in Kultur gebracht und mittels FISH untersucht. Das Gewebe wurde durch den Pathologen aus makroskopisch tumorfreien Arealen entnommen und von mir mit der gleichen Methodik des Tumorgewebes in Kultur gebracht. Der Unterschied zwischen Tumorgewebe und normaler Mukosa in Bezug auf Aneusomien war eindeutig (Tabelle 8, Seite 40). In 4 Fällen von 17 (23,5%) konnten Aneusomien in der gesunden Mukosa gegenüber 13 Fällen von 17 (76,5%) der Tumorfälle festgestellt werden. Hervorzuheben war der Fall 55, da sowohl die Gewinne an den Chromosomen 7 und 9 als auch der Verlust von Chromosom Y sich im Normalgewebe widerspiegeln.

Da im makroskopisch gesund wirkenden Gewebe, bzw. aus den daraus angelegten Zellkulturen, Aneusomien nachgewiesen werden konnten, war anzunehmen, dass die Mukosa vor der Kultur bereits genetisch aberrante Zellklone aufwies. Es ist allgemein davon auszugehen, dass auch Tumorzellen oder besser gesagt veränderte Zellen sich im Urothel

befinden, bevor man das Tumorwachstum endoskopisch, makro- oder mikroskopisch, nachweisen kann. In der vorliegenden Arbeit erfolgten nach Cystoskopie keine histologischen Untersuchungen der gesunden Mukosa, daher traf die Bezeichnung „tumorfrei“ für das entnommene vermeintlich gesunde Gewebe nicht exakt zu. Es war nämlich nicht auszuschließen, dass es sich bei dem entnommenen Gewebe aus dem tumorfreien Areal z.B. um flache Läsionen handelte. Denn Atypien, Dysplasien (Grad I-III) und carcinoma in situ sind makroskopisch schwer von gesunder Mukosa zu unterscheiden. Gerade diese Läsionen zeigen auf molekulargenetischer Ebene ebenfalls Aneuploidien (Krause et al., 2004). So konnte nachgewiesen werden, dass die Monosomie 9 häufiger bei den Dysplasien Grad I-III vorkam als beim cis (carcinoma in situ), dafür aber die Rate an Aneuploidien der Chromosomen 1 und 9 (Tri- und Tetrasomie) beim cis deutlich höher war. Insofern müsste man die nachgewiesenen numerischen Aberrationen der FISH-Untersuchung an der Primärkultur des „gesund“ wirkenden und nicht histologisch gesicherten tumorfreien Urothelgewebes kritisch betrachten. Andererseits konnte in der oben angeführten Studie in der Kontrollgruppe aus histologisch gesicherter gesunder Mukosa eine Rate der Monosomie 9 von knapp 10% ermittelt werden.

Auch in der Literatur wurden chromosomale Veränderungen aus makroskopisch tumorfreiem Urothelgewebe bei Patienten mit pT1 und pT2a TTCs nachgewiesen (Mazzucchelli et al., 2005). In dieser Arbeit wurden Probiopsien sowohl in der Nähe als auch entfernt vom neoplastischen Fokus entnommen, histologisch waren diese entweder unauffällig oder zeigten Veränderungen im Sinne einer Hyperplasie bis CIS (Carcinoma in situ). In der FISH-Untersuchung konnten ein Gewinn der Chromosomen 7, 9 und 17 und eine Deletion von 9p21 dokumentiert werden. So ergeben sich erneut Hinweise dafür, dass diese Veränderungen in dem Prozess der Tumorreduktion und -progression involviert sind. In einer weiteren Studie wurde histologisch normales Urothelgewebe von Patienten mit TCC (CIS, pT1-4, GIII) und ohne TCC mittels LOH (Loss of Heterozygoty, unter Verwendung 16 polymorphischer Marker auf Chr. 8p, 9p/q und 17 p) untersucht (Stoehr et al., 2003). Dabei fanden sich bei den tumorfreien Patienten keine Deletionen, in der anderen Gruppe waren 9,4% Deletionen zu verzeichnen (17p war davon nicht betroffen). Es können demnach spezifische genetische Veränderungen, die mit TCC assoziiert sind, in histologisch unauffälligem Urothelgewebe nachgewiesen werden. Dies unterstützt die Feld-Effekt-Hypothese in der urothelialen Karzinogenese, charakterisiert durch Multifokalität und Rekurrenz. Aber auch in der Untersuchung mittels FISH an histologisch gesundem Urothelgewebe bei Patienten mit

premaligen Urotheläsionen konnte eine häufige Monosomie des Chr. 9 sowie Deletion von 9p nachgewiesen werden (Krause et al., 2004; Obermann et al., 2004).

Am Beispiel des Prostata-Ca lässt sich die Problematik der Multifokalität und der genetischen Heterogenität veranschaulichen. Es können in unmittelbarer Nachbarschaft (z.B. innerhalb eines Areals von etwa 0,3-0,4 mm<sup>2</sup> in einem histologischen Präparat) neben nicht tumorösen atopen Drüsen hochdifferenzierte glanduläre und gering differenzierte glandulär-kribiforme Anteile eines Prostata-Ca vorkommen (Wullich, 1995). Die histopathologische Heterogenität ist eng mit einer intratumoralen genetischen Heterogenität gekoppelt (Wullich et al., 1992; Wullich, 1995). Es wird angenommen, dass eine genetische Heterogenität innerhalb eines Tumors für die Progression zu einem hochmalignen und metastasierten Stadium verantwortlich ist (Lundgren et al., 1992; Micale et al., 1992). Diese Heterogenität des Prostata-Ca in vivo könnte der Grund sein, dass in der Kultur klonal aberrante, nicht klonale Veränderungen und normale diploide Zellen koexistieren (Lundgren et al., 1992; Micale et al., 1992). Beim TCC wären ähnliche Pathomechanismen durchaus anzunehmen; z.B. konnte mittels UroVysion-FISH im follow-up von Patienten mit TCC gezeigt werden, dass Tumorprogression eng mit einer Akkumulation von genetischen Veränderungen verbunden war (Bollman et al., 2005). In dieser Studie zeigte sich bei den Patienten mit muskelinvasivem Verlauf des TCCs eine high-frequency Polysomie der Chromosome 7, 8, 9 und 17 in der FISH-Untersuchung, also Veränderungen, die nicht nur ein Chromosom betrafen. Somit wurde postuliert, dass gerade diese Veränderungen deutlicher die übergreifende genetische Instabilität des TTCs während der Tumorprogression widerspiegeln als spezifische genetische Alterationen.

Daher bleibt auch heute die FISH-Analyse eine zuverlässige diagnostische Methode zur Erfassung prämaligener Veränderungen im follow-up von Patienten mit TCC. Insbesondere die UroVysion-Methode (unter 1.1.9) bekommt unter diesem Blickwinkel eine besondere Bedeutung. Es könnten dann Tumorzellen bzw. veränderte Zellen erfasst werden, die bei einer Standard-TUR oder in der Urinzytologie zum gleichen Zeitpunkt nicht erkennbar gewesen bzw. zeitversetzt aufgefallen wären. Aber auch Erfolge von medikamentösen Therapien wie z.B. die BCG (Bacille de Guérin)- Instillation können neuerdings mittels UroVysion nicht-invasiv verfolgt werden (Halling et al., 2008; Whitson et al., 2009).

Die FISH-Untersuchung der Tumorfälle 31, 36, 43 und 52 für die Chromosomen 7, 8, 9 17 sowie Y wiesen keinen pathologischen Befund auf. In der Studie von Deliveliotis et al. wurden die paraffin-eingebetteten Proben von fortgeschrittenen TCC von 66 Patienten, die

sich einer radikalen Cystektomie unterzogen, mittels flow cytometry auf numerische Aberrationen untersucht. Die Ergebnisse wurden unter Berücksichtigung des Gradings und Stagings sowie des klinischen Verlaufes analysiert. 63% der untersuchten Tumore waren aneuploid. In der Subgruppe der Patienten mit  $pT \geq 3b$  ohne Nachweis einer Aneusomie kam es während der Studienzeit im Vergleich zu den Patienten mit aneuploiden Tumoren zu keinem Todesfall. Alle Patienten mit diploiden Tumoren überlebten die follow-up Phase ohne Rekurrenz oder Progression. Durch die Erfassung der Ploidie nach radikaler Cystektomie wurde in dieser Studie diskutiert, bei diploiden Tumoren auf eine adjuvante Chemotherapie zu verzichten. Zumindest erlaubte die mögliche Diskriminierung von Patienten mit fehlender Aneusomie eine Selektion von Patienten innerhalb einer Gruppe mit schlechter Prognose ( $pT \geq 3$ ) im Hinblick auf das post-operative Management. In meiner Arbeit verstarben im Zeitraum 2003-2005 3 Patienten (Fall 39, 41 und 47), die histologischen Befunde waren  $pT3a$ ,  $pT3b$  und  $pT4a$ . In der FISH-Untersuchung der entsprechenden Tumorfällen lagen ein signifikanter Y Verlust (-44%) und Y Gewinn (+64%) sowie Polysomien für die Chromosomen 9 und 17 vor.

#### **4.4 Zusammenfassung**

Die Bestimmung der DNA-Ploidie mittels FISH an histologischen Präparaten ermöglicht zwar die Detektion von Aneuploidien, aber diese Methode ist ungenügend, um Informationen über Tumorentstehung und Tumorprogression der invasiv wachsenden TCC-Zellen zu gewinnen. Gerade die Charakterisierung individueller Tumorzellen, welche letztendlich das Patientenschicksal bestimmen, gehört nach wie vor zu den größten Herausforderungen in der Tumorbiologie und in der Medizin. Grenzen der klassischen Zellkultur zum Nachweis von Aneusomien sind die selektive Isolierung und das präferentielle Wachstum von diploiden Epithelzellen gegen aneusome Tumorzellen. In der vorliegenden Arbeit konnten nach Passagieren der Primärkultur aus Tumorgewebe Aneuploidien des Chromosoms 8 nachgewiesen werden. Somit fand eine Selektion von Tumorzellen statt, die im Originaltumor sehr wahrscheinlich repräsentiert waren. Vorwiegend zeigten wir Polysomien der Chromosomen 7, 9 und 17 sowie Verluste und Gewinne des Chromosomen Y. In den parallel untersuchten Primärkulturen der normalen Mukosa wurden im Vergleich knapp 80% euploide Fälle ermittelt. Demnach wäre für den Patienten der Nachweis einer fehlenden Aneusomie für die ausgewählten Chromosome mit einer guten Prognose gleichzusetzen. Dennoch wurden auch in der makroskopisch normal wirkenden Mukosa signifikante Aneuploidien aufgedeckt.

Diese Veränderungen auf zytogenetischer Ebene, die für die Entwicklung eines invasiv wachsenden Tumors sprechen könnten, wären mittels FISH-Untersuchungen detektierbar bevor Auffälligkeiten in der makroskopischen Begutachtung oder gar in der Urinzytologie auftreten. Daher spielen zytogenetische Untersuchungen eine wichtige Rolle bei der Früherkennung des TCCs und bieten ein hilfreiches diagnostisches Instrument in der Überwachung, im follow-up der betroffenen Patienten. Auch im frühen Stadium macht die Ermittlung von chromosomalen Veränderungen auf Einzelzellniveau Sinn. Demnach würde der Nachweis von bestimmten numerischen Aberrationen für die Entwicklung von invasivem Wachstum sprechen, bzw. von Progressions- und Rezidivverhalten. Bei den Tumoren im fortgeschrittenen Stadium dieser Arbeit waren pro Tumorfall einige multiple Aneusomien nachzuweisen (siehe Tabellen 8 u. 12, Seite 40 u. 43). Der histopathologische Befund des Tumors und der klinische Befund bleiben zentrale Bestandteile der Diagnostik und die Basis der Behandlung des TCCs. Der Nachweis einer multiplen Aneusomie bei einem bestimmten TCC würde dem Kliniker zusätzliche Informationen in der Einschätzung des Tumors liefern und Therapieansatz sowie Überwachung beeinflussen. Beispielsweise könnten oberflächlich wachsende TCCs im frühen Stadium mittels FISH-Untersuchungen auf numerische Aberrationen selektiert werden und in der Behandlung des einzelnen Patienten nicht unterschätzt werden. Die Krebsforschung ist auf die Verwendung von Zellkulturen angewiesen. Es deutet aber immer mehr darauf hin, dass bisher verwendete permanente Zelllinien unzureichend das klinisch relevante Harnblasenkarzinom repräsentieren. Patienten mit gleichem Tumorgrad oder Tumorstadium können unterschiedlich Prognosen bezüglich ihres „outcomes“ haben. Dafür ist insbesondere die Gruppe der pT1 GIII-Tumore repräsentativ, denn diese weisen auf der genetischen Ebene Parallelen mit den muskelinvasiven TCCs auf.

Invasive TCCs können entweder durch Infiltration der Harnblasenwand oder durch hämatogene Streuung an entfernter Lokalisation wachsen. Für den Kliniker ist die Frage wichtig, welches früh diagnostizierte TCC in diese Entwicklung übergehen wird. Anders ausgedrückt, welcher Genotyp besitzt die veränderte Urothelzelle, die in der Lage ist, die Lamina propria und die Muskelschicht zu durchwandern oder hämatogen zu streuen. Etablierte Zelllinien des TCCs wurden bereits auf ihre Fähigkeit durch Membranporen oder durch Matrixelemente zu wandern in vitro untersucht. In diesem Zusammenhang konnten die modulatorischen Effekte von verschiedenen Faktoren wie die Wachstumshormone auf den invasiven Phänotyp gezeigt werden. Dennoch sind diese Modelle mit dem Einsatz von

permanenten Zelllinien nicht patientennah. Diese unterscheiden oft sich genetisch vom Ursprungstumor und weisen in der Regel auch ein anderes biologisches Verhalten auf. Der Zellklon, den man in unserem Versuchsaufbau aus permanenten Zelllinien selektieren könnte, würde einerseits tatsächlich invasives Wachstum zeigen, andererseits wäre fraglich, ob diese veränderten Zellen auch im Ursprungstumor vorhanden waren und die gleichen biologischen Funktionen bzw. genetischen Veränderungen besaßen. Daher bietet das Invasionsmodell unter Verwendung von Primärkulturen die Möglichkeiten, die veränderten Zellen des Tumors direkt zu gewinnen bzw. invasive Zellklone zu isolieren, und diese zu charakterisieren.

Aneusome Klone aus dem Ursprungstumor werden aufgrund ihres invasiven Wachstums selektioniert. Anders ausgedrückt, können Zellen im Invasionsmodell aus ursprünglich heterogenem Material isoliert und selektioniert werden. In meiner Arbeit zeigten sich dadurch signifikante Polysomien für Chromosom 8. Zudem bestünde die Möglichkeit, die durchgewanderten Zellen nicht nur auf ihre DNA-Ploidie zu untersuchen, sondern auch gezielt auf die Expression von bestimmten Enzymen oder Amplifikation von Genen, die in der Literatur mit dem invasiven Wachstum einhergehen bzw. dieses einleiten (HYAL1 Hyaluronidase und HER-2 z.B.). Aber auch therapeutische Ansätze wären durchaus denkbar und durchführbar. Der Einfluß von Medikamenten, Zytostatika, Immuntherapien und Bestrahlung auf das invasive Verhalten der Zellen könnte somit beobachtet werden. Das Modell bleibt aber universell einsetzbar. So entwickelte die Forschungsgruppe für experimentelle Urologie der Universität des Saarlandes in Anlehnung an das hier vorgestellte Invasionsmodell ein dreidimensionales Prostatakarzinomzellkultursystem. In dieser Arbeit wurde ein Primärzellkulturmodell mit einem Invasionsmodell kombiniert (siehe Abbildung 54). So konnten nicht nur invasiv wachsende Zellpopulationen aus Primärkulturen selektioniert werden, sondern auch diese Zellen in einem 3D-Modell unter der Ausbildung von Sphäroiden weiter kultiviert werden. Zur Charakterisierung dieser Zellklone wurden vergleichende genomische Hybridisierungen durchgeführt. Das vorgestellte Invasionsmodell ermöglichte es erstmalig, invasive Zellklone aus primärem Prostatakarzinomgewebe zu gewinnen und durch Kultivierung für weitere Untersuchungen zu verwenden (Jung et al., 2008).

Eine weitere denkbare Versuchsaufstellung wäre, ähnlich Booth et al., die Aussaat von Primärkulturen auf normales humanes de-epithelialisiertes Urothelgewebe (Booth et al., 1997). Man hätte die Möglichkeit, die Invasion in vivo nah zu beobachten und sowohl

---

Genotyp als Phänotyp der Zellen immunhistochemisch und molekulargenetisch zu ermitteln. Das System würde ebenfalls vaskuläre Streuung erlauben.

In den Publikationen der letzten Jahre war die FISH in der Erkennung von Tumorzellen unabhängig von Staging und Grading stets der konventionellen Urinzytologie überlegen. Die Malignität wird festgestellt, bevor cystoskopisch Läsionen sichtbar sind. Insbesondere ist dies beim carcinoma in situ von Vorteil. Auch in der Therapiewahl eines Patienten mit pT1 GIII TCC könnte der Nachweis von Aneuploidien eine entscheidende Rolle spielen.

Ob die Urothelzellen aus Urin, Primärmaterial oder Zellkultur stammen, die FISH-Untersuchung wird für die Diagnosestellung, die Therapieauswahl und die Nachsorge von TCC-Patienten unverzichtbar bleiben.

## 5 LITERATURVERZEICHNIS

1. **Alcaraz A**; Takahashi S, Brown A (1994) Aneuploidie and Aneusomie of Chromosome 7 Detected by Fluorescence in Situ Hybridization Are Markers of Poor Prognosis in Prostate Cancer. *Cancer Res.* 54: 3998-4002
2. **Altieri A**, la Vecchia C, Negri E (2003) Fluid intake and risk of bladder and other cancers. *Eur J Clin Nutr* 57 Suppl 2:S59-68
3. **Aly MS**, Khaled HM (2002) Chromosomal aberrations in early-stage bilharzial bladder cancer. *Cancer Genet Cytogenet.* 132(1):41-5
4. **Arnoldus EPJ**, Noordemer IA, Peters ACB, Raap AK, von der Ploeg M (1991) Interphase cytogenetics reveals somatic pairing of chromosome 17 centromers in normal brain tissue, but no trisomy 7 or sex chromosome loss. *Cytogenet Cell Genet.* 56: 214-6
5. **Baretton GB**, Valina C, Vogt T, Schneiderberger K, Diebold J, Löhns U (1994) Interphase Cytogenetic Analysis of Prostatic Carcinomas by Use of Nonisotopic in Situ Hybridization. *Cancer Res.* 54:4472-80
6. **Bartlett JM**, Watters AD, Ballantyne SA, Going JJ, Grigor KM, Cooke TG (1998) Is chromosome 9 loss a marker of disease recurrence in transitional cell carcinoma of the urinary bladder? *Br J Cancer.* 77(12):2193-8.
7. **Bender CM**, Jones PA (1998) *Carcinoma of the Bladder: Innovations in Management.* Petrovich Z, Baert L and Brady LW (ed). Springer: Heidelberg/New York, pp. 37-51.
8. **Bernardini S**, Adessi GL, Chezy E, Billerey C, Carbillet JP, Bittard H (2001) Influence of cigarette smoking on P53 gene mutations in bladder carcinomas. *Anticancer Res.* 21(4B):3001-4.
9. **Bindels EM**, Vermey M, van den Beemd R, Dinjens WN, Van Der Kwast TH (2000) E-cadherin promotes intraepithelial expansion of bladder carcinoma cells in an in vitro model of carcinoma in situ. *Cancer Res.* 60(1):177-83
10. **Björklund M**, Koivunen E (2005) Gelatinase-mediated migration and invasion of cancer cells. *Biochim Biophys Acta.* 1755(1):37-69
11. **Boice Jr JD** Day NE, Andersen A (1985) Second cancers following radiation treatment for cervical cancer. An international collaboration among cancer registries. *J Natl Cancer Inst* 74: 955-75
12. **Bollmann M**, Heller H, Bánkfalvi A, Griefingholt H, Bollmann R (2005) Quantitative molecular urinary cytology by fluorescence in situ hybridization: a tool for tailoring surveillance of patients with superficial bladder cancer? *BJU Int.* 95(9):1219-25
13. **Boonstra JJ**, van der Velden AW, Beerens EC, van Marion R, Morita-Fujimura Y, Matsui Y, Nishihira T, Tselepis C, Hainaut P, Lowe AW, Beverloo BH, van Dekken

- H, Tilanus HW, Dinjens WN (2007) Mistaken identity of widely used esophageal adenocarcinoma cell line TE-7. *Cancer Res.* 67(17):7996-8001
14. **Booth C**, Harnden P, Trejdosiewicz LK, Scriven S, Selby PJ, Southgate J (1997) Stromal and vascular invasion in an human in vitro bladder cancer model. *Lab Invest.* 76(6):843-57
  15. **Breitkreuz T**, Romanakis K, Lutz S, Seitz G, Bonkhoff, Unteregger G, Zwergel T, Zang KD, Wullich B (1993) Genotypic Characterisation of Prostatic Carcinomas: A Combined Cytogenetic, Flow Cytometry and in Situ Hybridisation Study. *Cancer Res.* 53:4035-40
  16. **Brennan P**, Bogillot O, Cordier S (2000) Cigarette smoking and bladder cancer in men: a pooled analysis of 11 case-control studies. *Int J Cancer* 86: 289-94
  17. **Brennan P**, Bogillot O, Greiser E (2000) The contribution of cigarette smoking to bladder cancer in women (pooled European data). *Cancer causes control* 12: 411-7
  18. **Brothmann AR**, Patel AM, Peehl DM, Schellhammer PF (1992) Analysis of Prostatic Tumor cultures using FISH. *Cancer Genet Cytogenet.* 62:180-5
  19. **Burgues JP**, Gomez L, Pontones JL, Vera CD, Jimenez-Cruz JF, Ozonas M (2007) A chemosensitivity test for superficial bladder cancer based on three-dimensional culture of tumor spheroids. *Eur Urol* 51:962-970
  20. **Cairns P**, Shaw ME, Knowles MA (1993) Initiation of bladder cancer may involve deletion of a tumour suppressor gene on chromosome 9. *Oncogene.* 8(4):1083-5
  21. **Celis A**, Rasmussen HH, Celis P, Basse B, Lauridsen JB, Ratz G (1999) Short-term culturing of low-grade superficial transitional cell carcinomas leads to changes in the expression levels of several proteins involved in key cellular activities. *Electrophoresis* 20:355-361
  22. **Chan ES**, Patel AR, Smith AK, Klein JB, Thomas AA, Heston WD, Larchian WA (2009) Optimizing orthotopic bladder tumor implantation in a syngeneic mouse model. *J Urol*; 182(6):2926-31
  23. **Chang FL**, Lai MD (2001) Various forms of mutant p53 confer sensitivity to cisplatin and doxorubicin in bladder cancer cells. *J Urol.* 166(1):304-10.
  24. **Chen YC**, Su HJ, Guo YI, Hsueh YM, Smith TJ, Ryan LM, Lee MS, Christiani DC (2003) Arsenic methylation and bladder cancer risk in Taiwan. *Cancer Causes Control* 14:303-10
  25. **Cheng L**, Bostwick DG, Li G (2001) Conserved genetic findings in metastatic bladder cancer: a possible utility of allelic loss of chromosomes 9p21 and 17p13 in diagnosis. *Arch Pathol Lab med.* 125(9): 1197-9
  26. **Chiou HY**, Chiou ST, Hsu YH et al.: Incidence of transitional cell carcinoma and arsenic in drinking water: a follow-up study of 8,102 residents in an arseniasis-endemic area in northeastern Taiwan. *Am J Epidemiol* 2001; 153:411-8

27. **Chitsulo L**, Loverde P, Engels D (2004) Schistosomiasis. *Nat Rev Microbiol.* 2(1):12-3
28. **Cianciulli AM**, Bovani R, Leonardo F, Antenucci A, Gandolfo GM, Giannarelli D, Leonardo C, Iori F, Laurenti C (2000) Interphase cytogenetics of bladder cancer progression: relationship between aneusomy, DNA ploidy pattern, histopathology, and clinical outcome. *Int J Clin Lab Res.* 30(1):5-11.
29. **Claude J**, Kunze E, Frentzel-Beyme R (1988) Occupation and risk of cancer of the lower urinary tract among men. A case-control study. *Int J Cancer* 41:371-9
30. **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
31. **Colditz G**, Dejong W, Hunter D, Trichopoulos D, Willet HW (1996) Harvard report on cancer prevention Vol 1: Causes of human cancer. *Cancer Causes Control.* 7 (Suppl.):S3-59
32. **Cremer T**, Landegent JE, Brückner H, Scholl HP, Schardin M, Hager HD, Devilee P, Pearson PL, van der Ploeg M (1986) Detection of chromosome aberrations in the human interphase nucleus by visualization of specific target DNAs with radioactive and nonradioactive in situ hybridization techniques: Diagnosis of trisomy 18 with probe L1.84. *Hum Genet*, 74: 346-52
33. **Cremer T**, Tesin D, Hopman AHN, Manuelidis L (1988): Rapid interphase and metaphase assessment of specific chromosomal changes in neuroectodermal tumor cells by in situ hybridisation with chemically modified DNA probes. *Exp Cell.* 176:199-220
34. **Dahse R**, Utting M, Werner W, Schimmel B, Claussen U, Junker K (2002) TP53 alterations as a potential diagnostic marker in superficial bladder carcinoma and in patients serum, plasma and urine samples. *Int J Oncol.* 20(1):107-15
35. **Degtyar P**, Neulander E, Zirkin H (2004). Fluorescence in situ hybridization performed on exfoliated urothelial cells in patients with transitional cell carcinoma of the bladder. *Urology.* 63(2):398-401
36. **Deliveliotis C**, Georgoulakis J, Skolarikos A, Trakas N, Varkarakis J, Albanis S, Proterogerou B, Bamias A (2004) DNA Ploidy as a prognostic factor in muscle invasive transitional cell carcinoma of the bladder. *Urol Res* 33:39-43
37. **Denzinger S**, Burger M, Fritsche HM, Ganzer R, Blana A, Wieland WF, Otto W (2008) Bladder preservation or initial cystectomy in T1G3 bladder cancer: which parameters help in therapeutic decision-making? *Aktuelle Urol.* 39(1):58-61
38. **Devilee P**, Cornelisse CJ, Kuipers DN, Jonker C, Pearson PI (1990): Loss of heterozygosity on 17p in human breast carcinomas. Defining the smallest common region of deletion. *Cygenet Cell Genet.* 53:52-4

39. **Devilee P**, Thierry RF, Kievits T, Kolluri R, Hopman AH, Willard HF, Pearson PL, Cornelisse CJ (1988) Detection of chromosome aneuploidy in interphase nuclei from human primary breast tumors using chromosome-specific repetitive DAN probes. *Cancer Res*, 48:5825-30
40. **Dirks RW**, van Gijlswijk RPM, Vooijs MA, Smit AB, Bogerd J, van Minnen J, Raap AK, van der Ploeg M (1991) 3'-end fluorochromized and haptenized oligonucleotides as in situ hybridization probes for multiple simultaneous RNA detection. *Exp Cell res*. 194:310-5
41. **Doll R**, Peto R (1981) The causes of cancer: Quantitative estimates of avoidable risks of cancer in the United States today. *J Natl Inst.* 66:1191-308
42. **Dozmorov MG**, Kyker KD, Saban R, Knowlton N, Dozmorov I, Centola MB, Hurst RE. (2006) Analysis of the interaction of extracellular matrix and phenotype of bladder cancer cells. *BMC Cancer*. 6:12
43. **Dunnick JK**, Melnick RL (1993) Assessment of the carcinogenic potential of chlorinated water: experimental studies of chlorine, chloramine, and trihalomethanes. *J Natl Cancer Inst* 85:817-22
44. **Eissa S**, Swellam M, Sadek M, Mourad MS, El Ahmady O, Khalifa A (2002) Comparative evaluation of the nuclear matrix protein, fibronectin, urinary bladder cancer antigen and voided urine cytology in the detection of bladder tumors. *J Urol*. 168(2):465-9
45. Eissa S, Swellam M, Ali-Labib R, Mansour A, El-Malt O, Tash FM (2007) Detection of telomerase in urine by 3 methods: evaluation of diagnostic accuracy for bladder cancer. *J Urol*; 178(3 Pt1):1068-72
46. **Eissa S**, Swellam M, Shehata H, El-Khouly IM, El-Zayat T, El-Ahmady O (2010) Expression of HYAL1 and survivin RNA as diagnostic molecular markers for bladder cancer. *J Urol*; 183(2):493-8
47. **Eleuteri P**, Grolino MG, Pomponi D, De Vita R (2001) Chromosome 9 aberrations by fluorescence in situ hybridisation in bladder transitional cell carcinoma. *Arv*. 37(12):1496-503
48. **Fadl-Elmula I** (2005) Chromosomal changes in uroepithelial carcinomas. *Cell Chromosome*. 4:1
49. **Fadl-Elmula I**, Gorunova L, Mandahl N, Elfving P, Lundgren R, Mitelman F, Heim S (2000) Cytotypic characterization of urinary bladder transitional cell carcinomas. *Genes Chromosom Cancer*. 29(3):256-65
50. **Fadl-Elmula I**, Kytola S, Leithy ME, Abdel-Hameed M, Mandahl N, Elagib A, Ibrahim M, Larsson C, Heim S (2002) Chromosomal aberrations in benign and malignant bilharzia-associated bladder lesions analyzed by comparative genomic hybridization. *BMC Cancer*. 2:5

51. **Flieger A**, Golka K, Schulze H, Föllmann W (2008) Primary Cultures of Human Urothelial Cells for Genotoxicity Testing. *Journal of Toxicology and Environmental Health*, 71:930-935
52. **Friedrich MG**, Hellstern A, Hautmann SH, Graefen M, Conrad S, Huland E, Huland H (2002) Clinical use of urinary markers for the detection and prognosis of bladder carcinoma: a comparison of immunocytology with monoclonal antibodies against Lewis X and 486p3/12 with the BTA STAT and NMP22 tests. *J Urol*. 168(2):470-4
53. **Gall JG**, Pardue ML (1969) Formation and detection of RNA-DNA hybrid molecules in cytological preparations. *Proc Natl Acad Sci USA*; 63:378-83
54. **Gallucci M**, Guadani F, Marzano R, Leonardo C, Merola R, Sentinelli S, Ruggeri EM, Cantiani R, Sperduti I, Lopez Fde L, Cianciulli Am (2005) Status of the p53, p16, RB1, and HER-2 genes and chromosomes 3, 7, 9, and 17 in advanced bladder cancer: correlation with adjacent mucosa and pathological parameters. *J Clin Pathol*. 58(4):367-71
55. **Garcia J**, Duran A, Tabernero MD, Garcia Plaza A, Flores Corral T, Najera ML, Gomez-Alonso A, Orfao A (2003) Numerical abnormalities of chromosomes 17 and 18 in sporadic colorectal cancer: Incidence and correlation with clinical and biological findings and the prognosis of the disease. *Cytometry B Clin Cytom*. 51(1):14-20
56. **Geoffroy-Perez B**, Cordier S (2001) Fluid consumption and the risk of bladder cancer: results of a multicenter case-control study. *Int J Cancer* 93:880-7
57. **Gerhards S**, Jung K, Koenig F, Daniltchenko D, Hauptmann S, Schnorr D, Loening SA (2001) Excretion of matrix metalloproteinases 2 and 9 in urine is associated with a high stage and grade of bladder carcinoma. *Urology*. 57(4):675-9
58. **Goebell PJ**, Vllanueva CM, Rettenmaier AW, Rübber H, Kogevinas M (2004) Environmental exposure, chlorinated drinking water, and bladder cancer. *World J Urol* 21:424-32
59. **Golijanin D**, Sherman Y, Shapiro A, Pode D (1995) Detection of bladder tumors by immunostaining of the Lewis X antigen in cells from voided urine. *Urology*. 46(2):173-7
60. **Griew F, Li WQ**, Iacopetta B (2004) Genetic polymorphisms in the MMP-2 and MMP-9 genes and breast cancer phenotype. *Breast Cancer Res Treat*. 88(3):197-204
61. **Hafner C**, Knuechel R, Zanardo L, Dietmaier W, Blaszyk H, Cheville J, Hofstaedter F, Hartmann A (2001) Evidence for oligoclonality and tumor spread by intraluminal seeding in multifocal urothelial carcinomas of the upper and lower urinary tract. *Oncogene*. 20(35):4910-5
62. **Halling KC**, King W, Sokolova IA, Meyer RG, Burkhardt HM, Halling AC, Cheville JC, Sebo TJ, Ramakumar S, Stewart CS, Pankratz S, O'Kane DJ, Seelig SA, Lieber MM, Jenkins RB (2000) A comparison of cytology and fluorescence in situ hybridization for the detection of urothelial carcinoma. *J Urol*. 164(5):1768-75

63. **Halling KC** (2004) Vysis UroVysion for the detection of urothelial carcinoma. *Expert Rev Mol Diagn.* 4(2): 266.
64. **Halling KC**, Kipp BR (2008) Bladder cancer detection using FISH (UroVysion assay). *Adv Anat Pathol.* 15(5):279-86
65. **Harris AL**, Neal DE (1992) Bladder cancer-field versus clonal origin. *N. Engl. J. Med.* 326, 737-740
66. **Hartmann A**, Rösner U, Schlake G, Dietmaier W, Zaak D, Hofstaedter F, Knuechel R (2000) Clonality and genetic divergence in multifocal low-grade superficial urothelial carcinoma as determined by chromosome 9 and p53 deletion analysis. *Lab Invest.* 80(5):709-18
67. **Hauptverband** der gewerblichen Berufsgenossenschaften ( HVBG ), Hrsg.: Beruflich verursachte Krebserkrankungen. Eine Darstellung der im Zeitraum 1978 bis 2003 anerkannten Berufskrankheiten. 8. überarbeitete und ergänzte Auflage Sankt Augustin: Hrsg. 2005. [www.hvbg.de/d/pages/services/publik/pdf\\_bild/krebs.pdf](http://www.hvbg.de/d/pages/services/publik/pdf_bild/krebs.pdf)
68. **Hauser-Kronberger C**, Peham K, Grall J, Rausch W, Hutarew G, Dietze O (2006) Novel approach of human epidermal growth factor receptor 2 detection in noninvasive and invasive transitional cell carcinoma of the bladder. *J Urol.* 175(3 Pt 1):875-80
69. **Heney NM**, Daly J, Prout GR, Nieh PT, Heaney JA, Trebeck NE. (1978). Biopsy of apparently normal urothelium in patients with bladder carcinoma. *J. Urol.* 120:559-560
70. **Herr HW**, (1985) Durable response of a carcinoma in situ of the renal pelvis to topical bacillus Calmette-Guerin. *J Urol.* 134(3):531-2
71. **Herr HW**, Laudone VP, Badalament RA, Oettgen HF, Sogani PC, Freedman BD, Melamed MR, Whitmore WF Jr (1988) Bacillus Calmette-Guérin therapy alters the progression of superficial bladder cancer. *J Clin Oncol.* 6(9):1450-5
72. **Herz F**, Deitch D, Adler SA, Brijlall D (1993) Short-term cultures of exfoliated cells from the urine of patients with bladder tumours. *Urol Res* 21:23-26
73. **Hojilla CV**, Mohammed FF, Khokha R (2003) Matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors direct cell fate during cancer development. *Br J Cancer.* 89(10):1817-21
74. **Hopman AH**, Kamps MA, Speel EJ, Schapers RF, Sauter G, Ramaekers FC (2002) Identification of chromosome 9 alterations and p53 accumulation in isolated carcinoma in situ of the urinary bladder versus carcinoma in situ associated with carcinoma. *Am J Pathol.* 161(4):1119-25
75. **Hopman AH**, Moesker O, Smeets AW, Pauwels RP, Vooijs GP, Ramaekers FC (1991) Numerical chromosome 1, 7, 9 and 11 detected by in situ hybridization. *Cancer Res.* 51: 644-51

76. **Hopman AHN**, Poddighe PJ, Smeets AWGB, Pauwels RPE, Vooijs GP, Ramaekers FCS (1989 ) Detection of numerical aberrations in bladder cancer detected by in situ hybridization. *Am J Path.* 135:1105-17
77. **Hoque MO**, Begum S, Brait M, Jeronimo C, Zahurak M, Ostrow KL, Rosenbaum E, Trock B, Westra WH, Schoenberg M, Goodman SN, Sidransky D (2008) Tissue inhibitor of metalloproteinases-3 promoter methylation is an independent prognostic factor for bladder cancer. *J Urol.* 179(2):743-7
78. **Hurst RE**, Kyker KD, Bonner RB, Bowditch RD, Hemstreet GP 3rd. (2003) Matrix-dependent plasticity of the malignant phenotype of bladder cancer cells. *Anticancer Res.* 23(4):3119-28
79. **Hutterer GC**, Karakiewicz PI, Zippe C, Lüdecke G, Boman H, Sanchez-Carbayo M, Casella R, Mian C, Friedrich MG, Eissa S, Akaza H, Serretta V, Hedelin H, Rupesh R, Miyanaga N, Sagalowsky AI, Perrotte P, Lotan Y, Marberger MJ, Shariat SF. (2008) Urinary cytology and nuclear matrix protein 22 in the detection of bladder cancer recurrence other than transitional cell carcinoma. *BJU Int.* 101(5):561-5
80. **Inoue T**, Sako K, Tsuchiya N (2004) Numeric aberrations of HER-2 and chromosome 17 detected by fluorescence in situ hybridization in urine-exfoliated cells from patients with urothelial carcinoma. *Urology.* 64(3):617-21
81. **International** Agency for Research on Cancer (1991) ed. Chlorinated drinking-water; chlorination by-products; some other halogenated compounds; cobalt and cobalt compounds. Lyon: World Health Organization 1991 ( IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenetic Risks to Humans, Volume 52 )
82. **International** Agency for Research on Cancer (2004) ed. Tobacco smoke and involuntary smoking. Lyon: World Health Organization. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. 83
83. **Jiang F**, Caraway NP, Sabichi AL, Zhang HZ, Ruitrok A, Grossman HB, Gu J, Lerner SP, Lippman S, Katz RL (2003) Centrosomal abnormality is common in and a potential biomarker for bladder cancer. *Int J Cancer.* 106(5):661-5.
84. **John H**, Birnstiel M, Jones K (1969) RNA-DNA hybrids at cytological level. *Nature.* 233:582-7
85. **Jones E**, Zhu XL, Rohr R, Stephenson RA, Brothman AR (1994) Aneusomy of Chromosomes 7 and 17 Detected by FISH in Prostate Cancer and the Effects of Selection in Vitro. *Genes Chromosomes Cancer.* 11:163-70
86. **Joos S**, Fink TM, Ratsch A, Lichter P (1994) Mapping and chromosome analysis: the potential of fluorescence in situ hybridisation. *J Biotech,* 35:135-53
87. **Jorgensen AL**, Bostock CJ, Bak AL (1986) Chromosome-specific subfamilies within human alphoid repetitive DNA. *J Mol Biol.* 187:185-96
88. **Jung I**, Reeder JE, Cox C, Siddiqui JF, O'Connell MJ, Collins L, Yang Z, Messing EM, Wheelless LL (1999) Chromosome 9 monosomy by fluorescence in situ

- hybridization of bladder irrigation specimens is predictive of tumor recurrence. . J Urol. 162(6):1957-8
89. **Jung V**, Saar M, Grobholz R, Stöckle M, Unteregger G, Kamradt J (2008) Development of a three-dimensional primary prostate cancer cell culture model Urologe A. 47(9):1199-204
  90. **Kader AK**, Liu J, Shao L, Dinney CP, Lin J, Wang Y, Gu J, Grossman HB, Wu X (2007) Matrix metalloproteinase polymorphisms are associated with bladder cancer invasiveness. Clin Cancer Res. 13(9):2614-20.
  91. **Kantor AF**, Hartge P, Hoover RN, Narayana AS, Sullivan JW, Fraumeni JF Jr (1984) Urinary tract infection and risk of bladder cancer. Am J Epidemiol. 119(4):510-5
  92. **Kessler C** (1990) The digoxigenin system: principle and applications of the novel nonradioactive DNA labeling and detection system. BioTechnology Int. 83-94
  93. **Kessler C** (1991): The digoxigenin system: anti-digoxigenin technology a survey on the concept and realization of a novel bioanalytic indicator system. Mol Cell Probes, 5:161-205
  94. **Kessler C**, Hölte H-J, Seibl R, Burg J, Mühlegger K (1990) Nonradioactive labeling and detection of nucleic acids: I. A novel DNA labeling and detection system based on digoxigenin: anti-digoxigenin ELISA principle. Biol Chem Hoppe-Seyler. 317:917-27
  95. **Ketter R**, Zwergel T, Romanakis K, Unteregger G, Ziegler M, Zang K-D, Wullich B (1996) Selection Toward Diploid Cells in Prostatic Carcinoma Derived Cell Cultures. Prostate. 28:364-71
  96. **Khaled HM**, Aly MS, Magrath IT (2000) Loss of Y in bilharzial bladder cancer. Cancer Genet Cytogenet. 117(1):32-6
  97. **Kibbelaar RE**, Kok F, Dreef EJ, Kleiverda JK, Cornelisse CJ, Raap AK, Kluin PM (1993) Statistical Methods in Interphase Cytogenetics: An Experimental approach. Cytometry. 14:716-24
  98. **Kielb SJ**, Shah NL, Rubin MA, Sanda MG (2001) Functional p53 mutation as a molecular determinant of paclitaxel and gemcitabine susceptibility in human bladder cancer. J Urol. 166(2):482-7
  99. **Komulainen H**, Kosma VM, Vaittinen SL (1997) Carcinogenicity of the drinking water mutagen 3-chloro-4-(dichloromethyl)-5-hydroxy-2(5H)-furanone in the rat. J Natl Cancer Inst 89:848-56
  100. **König JJ**, van Dongen JJW, Schröder FH (1993a) Preferential Loss of Abnormal Prostate Carcinoma Cells by Collagenase Treatment. Cytometrie. 14:805-10
  101. **König JJ**, Teubel W, van Dongen JJW, Hagemeyer A, Romijn JC, Schröder FH (1993b) Tissue Culture Loss of Aneuploid Cells From Carcinomas of The Prostate. Genes Chrom Cancer. 8:22-7

102. **Krause S**, Feil G, Beiter T, Pressler H, Schrott KM, Bichler KH (2004) Examination of tumorigenesis of precursor lesions in bladder cancer by in situ hybridization. *Urol Int.* 72(2):118-22
103. **Kriegmair M**, Baumgartner R, Knuechel R (1994) Fluorescence photodetection of neoplastic urothelial lesions following intravesical instillation of 5-aminolevulinic acid. *Urology.* 44 : 836-841
104. **Krüger S**, Weitsch G, Büttner H, Matthiensen A, Böhmer T, Marquardt T, Sayk F, Feller AC, Böhle A (2002) Overexpression of c-erbB-2 oncoprotein in muscle-invasive bladder carcinoma: relationship with gene amplification, clinicopathological parameters and prognostic outcome. *Int J Oncol.* 21(5):981-7
105. **Kujawski M**, Jarmuz M, Rydzanicz M, Szukala K, Wierzbicka M, Grenman R, Golusinski W, Szyfter K (2004) Frequent chromosome Y loss in primary, second primary and metastatic squamous cell carcinomas of the head and neck region. *Cancer Lett.* 208(1):95-101
106. **Kurokawa Y**, Hayashi Y, Maekawa A, Takahashi M, Kokubo T, Odashima S (1983) Carcinogenicity of potassium bromate administered orally to F344 rats. *J Natl Cancer Inst* 71: 965-72
107. **Kyker KD**, Culkin DJ, Hurst RE (2003) A model for 3-dimensional growth of bladder cancers to investigate cell-matrix interactions *Urol Oncol.* 21(4):255-61
108. **Laé M**, Couturier J, Oudard S, Radvanyi F, Beuzeboc P, Vieillefond D (2009) Assessing HER2 gene amplification as a potential target for therapy in invasive urothelial bladder cancer with a standardized methodology: results in 1005 patients. *Ann Oncol.* 21(4):815-9
109. **Lamm DL** (1985) Bacillus Calmette-Guerin immunotherapy for bladder cancer. *J Urol.* 134(1):40-7
110. **Lamm DL** (1992) Complications of bacillus Calmette-Guérin immunotherapy. *Urol Clin North Am.* 19(3):565-72
111. **Leonardo C**, Merola R, Orlandi G et al. ( 2005 ): C-erb-2 gene amplification and chromosomal anomalies in bladder cancer: preliminary results. *J Exp Clin Cancer Res;* 24 (4): 633-8
112. **Lokeshwar VB**, Obek C, Pham HT, Wei D, Young MJ, Duncan RC, Soloway MS, Block NL (2000) Urinary hyaluronic acid and hyaluronidase: markers for bladder cancer detection and evaluation. *J Urol.* 163(1): 348-56
113. **Lokeshwar VB**, Cerwinka WH, Lokeshwar BL (2005) HYAL1 hyaluronidase: a molecular determinant of bladder tumor growth and invasion. *Cancer Res.* 65(6):2243-50
114. **Lu ML**, Wikman F, Orntoft TF, Charytonowicz E, Rabbani F, Zhang Z, Dalbagni G, Pohar KS, Yu G, Cordon-Cardo C.(2002) Impact of alterations affecting the p53

- pathway in bladder cancer on clinical outcome, assessed by conventional and array-based methods. *Clin Cancer Res.* 8(1):171-9.
115. **Lundgren R**, Heim S, Mandahl N, Anderson H, Mittelman F (1992) Chromosomen abnormalities are associated with unfavorable outcome in prostatic cancer patients. *J Urol.* 147:784-8
  116. **Mahdy E., Pan Y**, Wang N, Malmstrom PU, Ekman P, Bergerheimer U (2001) 8 numerical aberration and C-myc copy number gain in bladder cancer are linked to stage and grade. *Anticancer Res.* 21(5):3167-73
  117. **Malavaud B** (2004) T1G3 bladder tumours: the case for radical cystectomy. *Eur Urol.* 45(4):406-10
  118. **Malaveille C**, Hautefeuille A, Pignatelli B, Talaska G, Vineis P, Bartsch H (1996) Dietary phenolics as anti-mutagens and inhibitors of tobacco-related DNA adduction in the urothelium of smokers. *Carcinogenesis.* 17(10):2193-200
  119. **Maniatis T**, Fritsch EF, Sambrock J (1982) *Molecular Cloning. A Laboratory Manual.* Cold Spring Harbor Laboratory, New York, pp 86-96
  120. **Manuelidis L**, Langer-Safer PR, Ward DC (1982) High resolution mapping of satellite DNA using biotin labelled DNA probes. *J Cell Biol.* 95:619-25
  121. **Martínez-Torrecuadrada J**, Cifuentes G, López-Serra P, Saenz P, Martínez A, Casal JI (2005 ) Targeting the extracellular domain of fibroblast growth factor receptor 3 with human single-chain Fv antibodies inhibits bladder carcinoma cell line proliferation. *Clin Cancer Res.* 11(17):6280-90
  122. **Masters JR**, Hepburn PJ, Walker L, Highman WJ, Trejdosiewicz LK, Povey S (1986) Tissue culture model of transitional cell carcinoma: characterization of twenty-two human urothelial cell lines. *Cancer Res.*46:3630-3636
  123. **Mc Keehan WL**, Adams PS, Rosser MP (1984) Direct Mitogenic Effects of Insulin, Epidermal Growth Factors and Possibly Prolactin, but not Androgen, on Normal Rat Prostate Epithelial Cells in Serum-free Primary Cell Culture. *Cancer Res.* 44:1998-2010
  124. **McGeehin MA**, Reif JS, Becher JC, Mangione EJ (1993) Case-control study of bladder cancer and water disinfection methods in Colorado. *AM J Epidemiol* 138:482-501
  125. **Micale MA**, Sanford JS, Powell IJ, Sakr WA, Wolman SR (1993) Defining the extent and nature of cytogenetic events in prostatic adenocarcinoma: Paraffin FISH vs. Metaphase analysis. *Cancer Genet Cytogenet,* 69:7-12
  126. **Michaud DS**, Spiegelmann D, Clinton SK, Rimm EB, Curhan GC, Willett WC, Giovannucci EL (1999) Fluid intake and the risk of bladder cancer in men. *N Engl J med* 340:1390-97

127. **Moch H**, Sauter G, Gudat F, Waldman F, Mihatsch MJ (1993) Ki-67 fraction, p53 alteration and numerical chromosome aberrations (chromosomes 7 and 17) in formalin fixed bladder tumors. *Verh Dtsch Ges Pathol.* 77:226-30
128. **Moore LE**, Titenko-Holland N, Quintana PJ (1993) Novel biomarkers of genetic damage in humans: use of fluorescence in situ hybridization to detect aneuploidy and micronuclei in exfoliated cells. *Journal of toxicology and environmental health.* 40(2-3):349-57
129. **Moses MA**, Wiederschain D, Loughlin KR, Zurakowski D, Lamb CC, Freeman MR (1998) Increased incidence of matrix metalloproteinases in urine of cancer patients. *Cancer Res.* 58(7):1395-9
130. **Mowatt G**, Zhu S, Kilonzo M, Boachie C, Fraser C, Griffiths TR, N'Dow J, Nabi G, Cook J, Vale L (2010) Systematic review of the clinical effectiveness and cost-effectiveness of photodynamic diagnosis and urine biomarkers ( FISH, ImunoCyt, NMP22) and cytology for the detection and the follow-up of bladder cancer. *Health Technol Assess;* 14(1):1-331, iii-iv
131. **National** Academy of Science- National Research Council Academy of Life Science (1981) The health effects of nitrate, nitrite, and N-nitroso compounds. Washington DC: National Academy of Science Press 1981
132. **Nederlof PM**, Robinson D, Abuknesha R, Wiegant J, Hopman AHN, Tanke HJ, Raap AK, 1989: Three-color fluorescence in situ hybridization for the simultaneous detection of multiple nucleic acid sequences. *Cytometry*, 10: 20-7
133. **Neuhaus M**, Wagner U, Schmid U (1999) Polysomies but not Y chromosome losses have prognostic significance in pTa/pT1 urinary bladder cancer. *Hum Pathol.* 30(1): 81-6
134. **Nguyen CT**, Jones JS (2008) Defining the role of NMP22 in bladder cancer surveillance. *World J Urol.* 26(1):51-8
135. **Nguyen CT**, Litt DB, Dolar SE, Ulchaker JC, Jones JS, Brainard JA (2009) Prognostic Significance of Nondiagnostic Molecular Changes in Urine Detected by
136. **UroVysion** Fluorescence In Situ Hybridization During Surveillance for Bladder Cancer. *Urology.* 73(2):347-50
137. **Oberman EC**, Meyer S, Hellge D, Zaak D, Filbeck T, Stoehr R, Hofstaedter F, Hartmann A, Knuechel R (2004) Fluorescence in situ hybridization detects frequent chromosome 9 deletions and aneuploidy in histologically normal urothelium of bladder cancer patients. *Oncol Rep.* 11(4):745-51.
138. **O'Brien T**, Cranston D, Fuggle S, Bicknell R, Harris AL (1995) Different angiogenic pathways characterize superficial and invasive bladder cancer. *Cancer Res.* 55(3):510-3
139. **Okuna H**, Kakehi Y, Ozdemir E, Terachi T, Okada Y, Yoshida O (1997) Association of in vitro growth potential of urinary exfoliated cells with tumor localization and intraluminal recurrences rates of urothelial cancers. *J Urol* 158:1996-1999

140. **Olsen JH**, Jensen O (1987): Occupation and risk of cancer in Denmark. An analysis of 93, 810 cancer cases, 1970-1979. *Scand J Work Environ Health* 13 ( Suppl. 1 ): 43-51
141. **Paiss T**, Wöhr G, Hautmann RE, Mattfeldt T, Müller M, Haeussler J, Vogel W(2002) Some tumors of the bladder are polyclonal in origin. *J Urol.* 167(2 Pt 1):718-23
142. **Panana AD**, Roussos C (2006) Sex chromosome abnormalities in bladder cancer: Y polysomies are linked to pT1-grade III transitional cell carcinoma. *Anticancer Res.* 26(1A):319-23
143. **Parson W**, Kirchebner R, Mühlmann R, Renner K, Kofler A, Schmidt S, Kofler R (2005) Cancer cell line identification by short tandem repeat profiling: power and limitations. *FASEB J.* 19(3):434-6
144. **Peehl DM**, Stamey (1986) Serum-free growth of adult human prostatic epithelial cell. *In vitro.* 22:82-90
145. **Persons DL**, Gibney DJ, Katzmann JA, Lieber MM, Farrow GM, Jenkins RB (1993) Use of fluorescent in situ hybridisation for DNA ploidy analysis of prostatic adenocarcinoma. *J Urol.* 150:120-5
146. **Pesch B**, Halekoh U, Ranft U, Richter M, Pott F (1994): Atlas zur Krebssterblichkeit in Nordrhein-Westfalen. Düsseldorf: Ministerium für Arbeit, Gesundheit und Soziales des Landes Nordrhein-Westfalen
147. **Peyromaure M**, Scotté F, Amsellem-Ouazana D, Vieillefond A, Oudard S, Beuzeboc P (2005) Trastuzumab (Herceptin) in metastatic transitional cell carcinoma of the urinary tract: report on six patients. *Eur Urol.* 48(5):771-5
148. **Pham HT**, Block NL, Lokeshwar VB (1997) Tumor-derived hyaluronidase: a diagnostic urine marker for high-grade bladder cancer. *Cancer Res.* 57(4): 778-83
149. **Pinkel D**, Landegent J, Collins C, Fuscoe J, Segraves R, Lucas J, Gray JW (1988) Fluorescence in situ hybridization with human chromosome-specific libraries: Detection of trisomy 21 and translocations of chromosome 4. *Proc Natl Acad Sci USA*, 85:9138-42
150. **Pinkel D**, Landegent J, Collins C, Fuscoe J, van Dekken H (1986-a) Cytogenetic analysis by in situ hybridization with fluorescently labeled nucleic acid probes. *Cold Spring Symp quant Biol* 51:151-7 HK
151. **Pinkel D**, Straume T, Gray JW (1986-b) Cytogenetic Analysis using quantitative, high sensitivity, fluorescence hybridisation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 83: 2934-8
152. **Placer J**, Espinet B, Salido M (2005) Correlation between histologic findings and cytogenetic abnormalities in bladder carcinoma : a FISH study. *Urology.* 65(5): 913-8
153. **Poddighe PJ**, Ramaekers F, Hopman AHN (1992) Interphase cytogenetics of tumours. *J Pathol.* 166:215-24

154. **Pycha A**, Mian C, Posch B, Haitel A, El-Baz M, Ghoneim MA, Marberger M. Numerical aberrations of chromosomes 7, 9 and 17 in squamous cell and transitional cell cancer of the bladder: a comparative study performed by fluorescence in situ hybridization. *J Urol.* 1998 Sep;160(3 Pt 1):737-40
155. **Rebel JM**, Thijssen CD, Vermey M, Zwarthoff EC, Van der Kwast TH (1995) Modulation of intra-epithelial expansion of human T24 bladder-carcinoma cells in murine urothelium by growth factors and extracellular-matrix components. *Int J Cancer.* 60(5):707-11
156. **Ribal MJ**, Alcaraz A, Mengual L (2004) Chromosomal high-polysomies predict tumour progression in T1 transitional cell carcinoma of the bladder. *Eur Urol;* 45(1): 593-9
157. **Rigby PWJ**, Dieckmann M, Rhodes C, Berg P (1977) Labeling Deoxyribonucleic Acid to High Specific Activity in Vitro by Nick Translation with DNA Polymerase I. *J Mol Biol.* 113:237-51
158. **Rockwell S** (1980) In vivo-in vitro tumour cell lines: characteristics and limitations as models for human cancer. *Br J Cancer Suppl.* 4:118-22
159. **Sauter G**, Moch H, Wagner U (1995) Y chromosome loss detected by FISH in bladder cancer. *Cancer Genet Cytogenet.* 82(2):163-9
160. **Shoji A**, Sakamoto Y, Tsuchiya T, Moriyama K, Kaneko T, Okubo T, Umeda M, Miyazaki K (1997) Inhibition of tumor promoter activity toward mouse fibroblasts and their in vitro transformation by tissue inhibitor of metalloproteinases-1 (TIMP-1). *Carcinogenesis.* 18(11):2093-100
161. **Sidransky D**, Frost P, von Eschenbach A, Oyasu R, Preisinger A, Vogelstein B (1992) Clonal origin bladder cancer. *N. Engl. J. Med.* 326: 737-740
162. **Simoneau M**, LaRue H, Aboukassim T (1999) Chromosom 9 deletions and recurrence of superficial bladder cancer : identification of four regions of prognostic interest. *Oncogen.* 18: 157-163
163. **Skacel M**, Pettay JD, Tsiftsakis EK, Procop GW, Biscotti CV, Tubbs RR (2001) Validation of a multicolor interphase fluorescence in situ hybridization assay for detection of transitional cell carcinoma on fresh and archival thin-layer, liquid-based cytology slides. *Anal Quant Cytol Histol.* 23(6):381-7
164. **Skacel M**, Liou S, Pettay JD, Tubbs RR (2002) Interphase fluorescence in situ hybridization in diagnosis of bladder cancer. *Front Biosci.* 1; 7:e27-33
165. **Smith BA**, Kennedy WJ, Harnden P, Selby PJ, Trejdosiwicz LK, Southgate J (2001) Identification of genes involved in human urothelial cell-matrix interactions: implications for the progression pathways of malignant urothelium. *Cancer Res.* 61(4):1678-85
166. **Sternberg CN** (2000) Gemcitabine in bladder cancer. *Nat Rev Microbiol.* 2(1):12-3

167. **Stetler-Stevenson WG**, Liotta LA, Kleiner DE Jr. (1993) Extracellular matrix 6: role of matrix metalloproteinases in tumor invasion and metastasis. *FASEB J.* 7(15):1434-41
168. **Stilgenbauer H**, Döhner H, Bulgay-Mörschel M, Weitz S, Bentz M, Lichter P (1993) High Frequency of Monoallelic Retinoblastoma Gene Deletion in B-Cell Chronic Lymphoid Leukemia Shown by Interphase Cytogenetics. *Blood.* 81: 2118-24
169. **Stoehr R.**, Zietz S., Burger M ( 2005 ) Deletions of chromosomes 9 and 8p in histologically normal urothelium of patients with bladder cancer. *Eur Urol.* 47(1):58-63
170. **Strefford JC**, Lillington DM, Stegagall M, Lane TM, Nouri AME, Young BD, Oliver RTD (2002) Novel chromosome findings in bladder cancer lines detected with multiplex fluorescence in situ hybridization. *Cancer Genet Cytogenet.* 135(2):139-46
171. **Syrigos KN**, Harrington KJ, Pignatelli M (1999) Role of adhesion molecules in bladder cancer: an important part of the jigsaw. *Urology.* 53(2):428-34
172. **Takahashi S**, Qian J, Brown JA, Alcaraz A, Bostwick DG, Lieber MM, Jenkins RB (1994) Potential markers of prostate cancer aggressiveness detected by Fluorescence in situ hybridization in needle biopsies. *Cancer Res.*54: 3574-9
173. **Takehisa M**, Sasa M, Bando Y, Hirose T, Morimoto T, Nagao T, Tangoku A (2007) Chromosomal aneusomy (chr 1, 11, 17) detected by fluorescence in situ hybridization may be a prognostic factor in breast cancer. *Anticancer Res.* 27(2):1073-8.
174. **Thomas EL**, Jefferson MM, Bennett JJ, Learn DB (1987) Mutagenic activity of chloramines. *Mutat Res* 188: 35-43
175. **Tiguert R**, Bianco FJ Jr, Oskanian P, Li Y, Grignon DJ, Wood DP Jr, Pontes JE, Sarkar FH (2001) Structural alteration of p53 protein in patients with muscle invasive bladder transitional cell carcinoma. *J Urol.* 166(6):2155-60
176. **Travis LB**, Curtis RE, Glimelius B (1995) Bladder and kidney cancer following cyclophosphamid therapy for non-Hodgkin's lymphoma. *J Natl Cancer Inst* 87:524-30
177. **Tsay YS**, Shiau AL, Chen YF, Tsai HT, Lee HL, Tzai TS, Wu CL (2009) Enhancement of antitumor immune response by targeted interleukin-12 electroporation transfer through antiHER single-chain antibody in a murine bladder tumor model. *Vaccine*, 27(39): 5383-92
178. **Tsukamoto M**, Matsuyama H, Oba K, Yoshihiro S, Takahashi M, Naito K (2002) Numerical aberrations of chromosome 9 in bladder cancer. A possible prognostic marker for early tumor recurrence. *Cancer Genet Cytogenet.* 134(1):41-5.
179. **Tyrkus M**, Powell I, Fakr W.(1992) Cytogenetic studies of carcinoma in situ of the bladder: prognostic implications. *J Urol.*, 148(1):44-6

180. **Van Dekken H**, Bauman JG,1988: A new application of in situ hybridization detection of numerical and structural chromosome aberrations with a combination centromeric-telomeric DNA probe. *Cytogenet Cell Genet*,48:188-9
181. **Van Dekken H**, Pizzollo JG, Kelsen DP, Melamed MR (1990) Cytogenetic analysis of human solid tumors by in situ hybridisation with a set of 12 chromosome-specific DNA-Probes. *Cytogenet Cell Genet*. 54: 103-7
182. **Villanueva CM**, Cantor KP, King WD (2006) Total and specific fluid consumption as determinants of bladder cancer risk. *Int J Cancer* 118: 2040-7
183. **Villanueva CM**, Fernandez F, Malats N, Grimalt JO, Kogevinas M (2003) Metaanalysis of studies on individual consumption of chlorinated drinking water. *J Epidemiol Community Health* 57:166-173
184. **Wang H**, Huang S, Shou J, W Su E, Onya JE, Liao B, Li S (2006) Comparative analysis and integrative classification of NC160 cell lines and primary tumors using gene expression profiling data. *BMC Genomics*. 7:166
185. **Ward MH**, Cantor KP, Rilex D, Merkle S, Lynch CF (2003) Nitrate in public water supplies and risk of bladder cancer. *Epidemiology* 14:183-90
186. **Watters AD**, Going JJ, Grigor KM, Bartlett JM (2002) Progression to detrusor-muscle invasion in bladder carcinoma is associated with polysomy of chromosomes 1 and 8 in recurrent pTa/pT1 tumours. *Eur J Cancer*. 38(12):1593-9
187. **Watters AD**, Stacey MW, Going JJ, Grigor KM, Cooke TG, Sim E, Bartlett JM (2001) Genetic aberrations of NAT2 and chromosome 8: their association with progression in transitional cell carcinoma of the urinary bladder. *Urologia internationalis*.67(3):235-9
188. **Whitson JM**, Berry AB, Carroll PR, Konety BR (2009) UroVysion Testing can lead to early identification of intravesical therapy failure in patients with high risk non-muscle invasive bladder cancer. *Int Braz J Urol*. 35(6):664-70; discussion 671-2
189. **Willard HF** (1985) Chromosome-specific organization of human alpha satellite DNA. *Am J Hum Genet*. 37:524-32
190. **William SG**, Stein JP (2004) Molecular pathways in bladder cancer. *Uro Res*. 32 (6): 373-85
191. **Wolf HK**, Stöber C, Hohenfellner R, Leissner J (2001) Prognostic value of p53, p21/WAF1, Bcl-2, Bax, Bak and Ki-67 immunoreactivity in pT1 G3 urothelial bladder carcinomas. *Tumour Biol*. 22(5):328-36.
192. **Wolman SR**, Waldman FM, Balazs M (1993) Complementary of Interphase and Metaphase Chromosome Analysis in Human Renal Tumors. *Genes Chrom Cancer*. 6:17-23

193. **World Cancer Research Fund and American Institute for Cancer Research** (1997) Food, nutrition and the prevention of cancer: a global perspective, WCRF 4.18: 338-61. *World J Urol.* 26(1):51-8
194. **Wullich B** (1995) Untersuchungen zu den genetischen Grundlagen der biologischen Heterogenität des Prostatakarzinoms. Habilitationsschrift. Medizinische Fakultät der Universität des Saarlandes
195. **Wullich B**, Breitzkreuz T, Zwergel T, Unteregger G, Seitz G, Zang KD (1992) Cytogenetic Evidence of Intratumoral Focal Heterogeneity in Prostatic Carcinomas. *UrolInt.*48:372-7
196. **Yu DS**, Chen HI, Chang SY (2002) Chromosomal aberrations in transitional cell carcinoma: its correlation with tumor behaviour. *Urol Int* 69(2):129-35
197. **Zaak D**, Kriegmair M, Stepp H, Stepp H, Baumgartner R, Oberneder R, Schneede P, Corvin S, Frimberger D, Knüchel R, Hofstetter A (2001) Endoscopic detection of transitional cell carcinoma with 5-aminolevulinic acid: results of 1012 fluorescence endoscopies. *Urology.* 57(4):690-4
198. **Zeegers MP**, Goldbohm RA, van der Brandt PA (2001) Are retinol, vitamin C, vitamin E, folate and carotinoids intake associated with bladder cancer risk? Results from the Netherlands Cohort Study. *Br J Cancer* 85:977-83
199. **Zeegers MP**, Kellen E, Buntinx F, van der Brandt PA (2004) The association between smoking, beverage consumption, diet and bladder cancer: a systematic literature review. *World J Urol* 21:392-401
200. **Zhonghua-Zhong-Liu-Za-Chi** (2000) Molecular cytogenetic study of bladder transitional cell carcinoma by FISH. *Chinese Journal of Oncology* 22(1): 36-8
201. **Zingg EJ**, Wallace DMA: Bladder cancer. *Clinical practice in urology.* New York, Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag 1985
202. **Zinzindohoué F**, Lecomte T, Ferraz JM, Houllier AM, Cugnenc PH, Berger A, Blons H, Laurent-Puig P (2005) Prognostic significance of MMP-1 and MMP-3 functional promoter polymorphisms in colorectal cancer. *Clin Cancer Res.* 11(2 Pt 1):594-9.
203. **Zwarthoff EC** (2008) Detection of tumours of the urinary tract in voided urine. *Scand J Urol Nephrol Suppl. Sep;*(218):147-53.
204. **Zwergel T**, Kakirman H, Schorr H, Wullich B, Unteregger G (1998a): Androgen Receptor Expression, Proliferation Index and Aneuploidy in Tissue Explant Cultures Dreived Prostate Carcinoma Cells Co-Cultivated on Membranes. *Eur Urol.* 33:413-23
205. **Zwergel T**, Kakirman H, Schorr H, Wullich B, Unteregger G (1998b): A New serial transfer Explant Cell Culture System for Human Prostatic Cancer Tissues Preventing Selection toward Diploid Cells. *Cancer Genet Cytogenet.* 101:16-23

**6 ANHANG**

**BN31**

SONDE	0 SIG	1 SIG	2 SIG	3 SIG	4 SIG
7 BIO	0	6	186	3	5
	0%	3,00%	93%	1,50%	2,5%
8 BIO	3	5	191	1	0
	1,5%	2,5%	95,50%	0,5%	0%
9 DIG	2	3	185	4	6
	1%	1,50%	92,5%	2%	3%
17 DIG	0	0	200	0	0
	0%	0%	100%	0%	0%

**BT31**

SONDE	0 SIG	1 SIG	2 SIG	3 SIG	4 SIG
7 BIO	3	4	173	7	13
	1,5%	2%	86,5%	3,5%	6,5%
8 BIO	0	6	176	7	11
	0%	3%	88%	3,5%	5,5%
9 DIG	2	3	183	4	8
	1%	1,5%	91,5%	2,00%	4%
17 DIG	7	9	179	2	3
	3,5%	4,5%	89,5%	1%	1,5%

**BN36**

SONDE	0 SIG	1 SIG	2 SIG	3 SIG	4 SIG
7 BIO	0	6	187	1	6
	0%	3,00%	93,50%	0,50%	3,00%
8 BIO	2	8	181	3	6
	1%	4,00%	90,50%	2%	3%
9 DIG	1	5	189	2	3
	1%	2,50%	95%	1%	1,50%
17 DIG	0	8	188	3	1
	0%	4,00%	94%	1,50%	0,5%

**BT36**

SONDE	0 SIG	1 SIG	2 SIG	3 SIG	4 SIG
7 BIO	3	7	181	5	4
	1,5%	3,5%	90,50%	2,50%	2%
8 BIO	0	7	185	7	1
	0%	3,50%	92,50%	4%	1%
9 DIG	2	11	180	4	1
	1%	5,5%	90%	2,00%	0,5%
17 DIG	1	9	181	6	4
	0,5%	4,5%	90,5%	3%	2%

**BN38**

SONDE	0 SIG	1 SIG	2 SIG	3 SIG	4 SIG
7 BIO	0	5	189	5	1
	0,00%	2,50%	94,50%	2,50%	0,50%
8 BIO	2	7	187	4	0
	1,00%	3,50%	93,50%	2,00%	0,00%
9 DIG	0	9	182	6	3
	0,00%	4,50%	91,00%	3,00%	1,50%
17 DIG	0	5	186	7	2
	0,00%	2,50%	93,00%	3,50%	1,00%
Y DIG	12	185	3	0	0
	6,00%	92,50%	1,50%	0,00%	0,00%

**BT38**

SONDE	0 SIG	1 SIG	2 SIG	3 SIG	4 SIG
7 BIO	0	0	149	47	4
	0,00%	0,00%	74,50%	23,50%	2,00%
8 BIO	0	3	175	22	0
	0,00%	1,50%	87,50%	11,00%	0,00%
9 DIG	0	2	171	23	4
	0,00%	1,00%	85,50%	11,50%	2,00%
17 DIG	0	0	146	36	18
	0,00%	0,00%	73,00%	18,00%	9,00%
Y DIG	16	183	1	0	0
	8,00%	91,50%	0,50%	0,00%	0,00%

BN39

SONDE	0 SIG	1 SIG	2 SIG	3SIG	4 SIG
7 BIO	0	6	194	0	0
	0%	3%	97%	0%	0%
8 BIO	2	5	193	0	0
	1%	2,50%	96,50%	0%	0%
9 DIG	0	0	198	2	0
	0%	0%	99,00%	1%	0,00%
17 DIG	0	7	189	4	0
	0%	3,50%	94,50%	2%	0%
Y BIO	9	190%	1	0	0
	4,50%	95%	0,50%	0%	0%

BT39

SONDE	0 SIG	1 SIG	2 SIG	3SIG	4 SIG
7 BIO	3	20	176	1	0
	2%	10%	88%	1%	0%
8 BIO	0	17	183	0	0
	0%	8,50%	91,50%	0%	0%
9 DIG	0	2	177	21	0
	0%	1%	88,50%	10,50%	0%
17 DIG	3	2	170	24	1
	1,50%	1%	85,00%	12%	0,50%
Y BIO	88	111	1	0	0
	44%	55,50%	0,50%	0%	0%

BN40

SONDE	0 SIG	1 SIG	2 SIG	3SIG	4 SIG
7 BIO	0	6	189	5	0
	0%	3%	94,50%	2,50%	0%
8 BIO	3	8	187	2	0
	1,50%	4%	93,50%	1%	0%
9 DIG	0	11	179	9	1
	0%	5,50%	89,50%	4,50%	0,50%
17 DIG	0	2	193	3	2
	0%	1%	96,50%	1,50%	1%

BT40

SONDE	0 SIG	1 SIG	2 SIG	3SIG	4 SIG
7 BIO	0	9	173	14	4
	0%	4,50%	86,50%	7%	2%
8 BIO	5	3	171	17	4
	2,50%	1,50%	85,50%	8,50%	2%
9 DIG	0	2	181	16	1
	0%	1%	90,50%	8%	0,50%
17 DIG	0	0	178	17	5
	0%	0%	89%	8,50%	2,50%

BN41

SONDE	0 SIG	1 SIG	2 SIG	3SIG	4 SIG
7 BIO	0	6	194	0	0
	0%	3%	97%	0%	0%
8 BIO	0	6	193	1	0
	0%	3,00%	96,50%	1%	0%
9 DIG	0	4	192	4	0
	0%	2%	96,00%	2%	0,00%
17 DIG	0	8	188	4	0
	0%	4,00%	94,00%	2%	0,00%
Y BIO	6	190%	4	0	0
	3,00%	95%	2,00%	0%	0%

BT41

SONDE	0 SIG	1 SIG	2 SIG	3SIG	4 SIG
7 BIO	2	20	176	1	0
	1%	10%	88%	1%	0%
8 BIO	0	16	184	0	0
	0%	8,00%	92,00%	0%	0%
9 DIG	0	2	169	21	7
	0%	1%	84,50%	10,50%	4%
17 DIG	3	2	172	20	3
	1,50%	1%	86,00%	10%	1,50%
Y BIO	15	58	81	46	0
	7,5%	29,00%	40,50%	23%	0%

BN42

SONDE	0 SIG	1 SIG	2 SIG	3SIG	4 SIG
7 BIO	0	7	180	8	5
	0%	3,50%	90%	4%	2,50%
8 BIO	10	17	161	6	6
	5%	8,50%	80,50%	3%	3%
9 DIG	0	7	171	15	7
	0%	3,50%	85,50%	7,50%	3,50%
17 DIG	0	3	188	4	5
	0%	1,50%	94%	2%	2,50%
Y DIG	22	171	5	2	0
	11%	85,50%	2,50%	1%	0%

BT42

SONDE	0 SIG	1 SIG	2 SIG	3SIG	4 SIG
7 BIO	2	18	170	9	1
	1%	9%	85%	4,50%	0,50%
8 BIO	0	11	185	3	1
	0%	5,50%	92,50%	1,50%	0,50%
9 DIG	0	5	174	16	5
	0%	2,50%	87%	8%	2,50%
17 DIG	0	8	171	18	3
	0%	4%	85,50%	9%	1,50%
Y DIG	45	145	6	4	0
	22,50%	72,50%	3%	2%	0%

BN43

SONDE	0 SIG	1 SIG	2 SIG	3SIG	4 SIG
7 BIO	0	6	193	1	0
	0,00%	3,00%	96,50%	0,50%	0,00%
8 BIO	1	3	196	0	0
	0,50%	1,50%	98,00%	0,00%	0,00%
9 DIG	0	0	196	4	0
	0,00%	0,00%	98,00%	2,00%	0,00%
17 DIG	0	1	193	6	0
	0,00%	0,50%	96,50%	3,00%	0%

BT43

SONDE	0 SIG	1 SIG	2 SIG	3SIG	4 SIG
7 BIO	1	3	196	0	0
	0,50%	1,50%	98,00%	0,00%	0,00%
8 BIO	0	6	194	0	0
	0,00%	3,00%	97,00%	0,00%	0,00%
9 DIG	0	10	188	2	0
	0%	5%	94%	1%	0
17 DIG	0	0	196	3	1
	0,00%	0,00%	98,00%	1,50%	0,50%

BN45

SONDE	0 SIG	1 SIG	2 SIG	3SIG	4 SIG
7 BIO	0	17	169	8	6
	0%	8,50%	84,50%	4,00%	3,00%
8 BIO	1	13	186	0	0
	1%	6,50%	93,00%	0%	0%
9 DIG	1	0	185	11	3
	1%	0,00%	92,5%	5,5%	1,50%
17 DIG	0	4	169	14	13
	0%	2,00%	85%	7,00%	3,5%

BT45

SONDE	0 SIG	1 SIG	2 SIG	3SIG	4 SIG
7 BIO	0	6	167	15	6
	0%	3%	83,50%	7,50%	3%
8 BIO	0	9	171	13	7
	0%	4,50%	85,50%	6,5%	3,5%
9 DIG	0	13	179	2	6
	0%	6,5%	89,5%	1,00%	3%
17 DIG	0	1	155	27	17
	0%	1%	78%	13,5%	8,5%

## BN48

SONDE	0 SIG	1 SIG	2 SIG	3SIG	4 SIG
7 BIO	1	5	191	3	0
	0,50%	2,50%	95,50%	1,50%	0,00%
8 BIO	0	8	192	0	0%
	0,00%	4,00%	96,00%	0,00%	0,00%
9 DIG	0%	2	193	11	0
	0,00%	0,97%	93,60%	5,30%	0,00%
17 DIG	0	3	197	0	0
	0,00%	1,50%	98,50%	0,00%	0,00%
Y BIO	50	156	0	0	0
	24,30%	75,70%	0,00%	0,00%	0,00%

## BT48

SONDE	0 SIG	1 SIG	2 SIG	3SIG	4 SIG
7 BIO	0	12	179	6	3
	0,00%	6,00%	89,50%	3,00%	1,50%
8 BIO	0	4	195	1	0%
	0,00%	2,00%	97,50%	0,50%	0,00%
9 DIG	0%	0	189	11	0
	0,00%	0,00%	94,50%	5,50%	0,00%
17 DIG	0	1	184	15	0
	0,00%	0,50%	92,00%	7,50%	0,00%
Y BIO	45	155	0	0	0
	22,50%	77,50%	0,00%	0,00%	0,00%

## BN49

SONDE	0 SIG	1 SIG	2 SIG	3SIG	4 SIG
7 BIO	0	5	193	2	0
	0,00%	2,50%	96,50%	1,00%	0,00%
8 BIO	2	6	191	1	0
	1,00%	3,00%	95,50%	0,50%	0,00%
9 DIG	0	0	196	3	1
	0,00%	0,00%	98,00%	1,50%	0,50%
17 DIG	0	3	195	2	0
	0,00%	1,50%	97,50%	1,00%	0,00%

## BT49

SONDE	0 SIG	1 SIG	2 SIG	3SIG	4 SIG
7 BIO	7	30	163	0	0
	3,50%	15%	81,50%	0%	0%
8 BIO	7	4	189	0	0
	3,50%	2,00%	94,50%	0%	0%
9 DIG	0	0	193	7	0
	0%	0%	96,50%	3,50%	0%
17 DIG	0	0	197	3	0%
	0%	0%	98,50%	1,50%	0%

## BN50

SONDE	0 SIG	1 SIG	2 SIG	3SIG	4 SIG
7 BIO	0	7	182	5	6
	0%	3,50%	91,00%	2,50%	3,00%
8 BIO	3	5	185	2	5
	2%	2,50%	92,50%	1%	3%
9 DIG	1	2	191	2	4
	1%	1,00%	96%	1%	2,00%
17 DIG	0	9	178	2	11
	0%	4,50%	89%	1,00%	6%

## BT50

SONDE	0 SIG	1 SIG	2 SIG	3SIG	4 SIG
7 BIO	0	11	174	6	9
	0%	6%	87,00%	3,00%	5%
8 BIO	4	8	180	3	5
	2%	4,00%	90,00%	2%	3%
9 DIG	1	4	175	11	9
	1%	2%	88%	5,50%	5%
17 DIG	2	6	173	6	13
	1%	3%	87%	3%	7%

**BN51**

SONDE	0 SIG	1 SIG	2 SIG	3SIG	4 SIG
7 BIO	0	1	195	3	1
	0,00%	0,50%	97,50%	1,50%	0,50%
8 BIO	2	6	189	0	3
	1%	3%	94,50%	0%	1,50%
9 DIG	1	1	190	7	1
	0,50%	0,50%	95%	3,50%	0,50%
17 DIG	0	1	195	4	0
	0%	0,50%	97,50%	2%	0%
Y DIG	0	198	2	0	
	0%	99%	1%	0%	

**BT51**

SONDE	0 SIG	1 SIG	2 SIG	3SIG	4 SIG
7 BIO	0	11	178	11	0
	0%	5,50%	89,00%	5,50%	0%
8 BIO	3	0	187	10	0
	1,50%	0%	93,50%	5,00%	0%
9 DIG	0	0	178	22	0
	0%	0%	89,00%	11,00%	0%
17 DIG	0	0	183	9	8
	0%	0%	91,50%	4,50%	4,00%
Y DIG	10	189	1		
	5%	94,50%	0,50%		

**BN52**

SONDE	0 SIG	1 SIG	2 SIG	3SIG	4 SIG
7 BIO	3	1	189	3	4
	1,50%	0,50%	94,50%	1,50%	2,00%
8 BIO	3	7	183	2	5
	2%	4%	91,50%	1%	2,50%
9 DIG	3	2	186	8	1
	1,50%	1,00%	93%	4,00%	0,50%
17 DIG	0	1	193	5	1
	0%	0,50%	96,50%	3%	1%
Y DIG	6	191	3	0	
	3%	96%	2%	0%	

**BT52**

SONDE	0 SIG	1 SIG	2 SIG	3SIG	4 SIG
7 BIO	3	13	173	7	4
	2%	5,50%	86,50%	3,50%	2%
8 BIO	5	10	175	7	3
	2,50%	5%	87,50%	3,50%	2%
9 DIG	0	9	172	15	4
	0%	4%	86,00%	7,50%	2%
17 DIG	0	0	181	11	8
	0%	0%	90,50%	5,50%	4,00%
Y DIG	15	182	3		
	8%	91,00%	1,50%		

**BN53**

SONDE	0 SIG	1 SIG	2 SIG	3SIG	4 SIG
7 BIO	1	0	197	2	0
	0,50%	0,00%	98,50%	1,00%	0,00%
8 BIO	0	4	194	1	1
	0,00%	2,00%	97,00%	0,50%	0,50%
9 DIG	0	1	194	3	1
	0,00%	0,50%	97,00%	1,50%	0,50%
17 DIG	1	2	187	9	1
	0,50%	1,00%	93,50%	4,50%	0,50%
Y DIG	4	195	1	0	0
	2,00%	97,50%	0,50%	0,00%	0,00%

**BT53**

SONDE	0 SIG	1 SIG	2 SIG	3SIG	4 SIG
7 BIO	0	5	195	0	0
	0,00%	2,50%	97,50%	0,00%	0,00%
8 BIO	0	26	173	1	0
	0,00%	13,00%	86,50%	0,50%	0,00%
9 DIG	0	5	170	24	1
	0,00%	2,50%	85,00%	12,00%	0,50%
17 DIG	0	4	175	16	5
	0,00%	2,00%	87,50%	8,00%	2,50%
Y DIG	3	170	27	0	0
	1,50%	85,00%	13,50%	0,00%	0,00%

## BN55

SONDE	0 SIG	1 SIG	2 SIG	3SIG	4 SIG
7 BIO	0	1	151	19	29
	0,00%	0,50%	75,50%	9,50%	14,50%
8 BIO	2	14	166	12	6
	1,00%	7,00%	83,00%	6,00%	3,00%
9 DIG	1	6	173	15	5
	0,50%	3,00%	86,50%	7,50%	2,50%
17 DIG	0	1	186	2	9
	0,00%	0,50%	93,00%	1,00%	4,50%
Y DIG	27	171	2	0	0
	13,50%	85,50%	1,00%	0,00%	0,00%

## BT55

SONDE	0 SIG	1 SIG	2 SIG	3SIG	4 SIG
7 BIO	2	2	141	34	21
	1,00%	1,00%	70,50%	17,00%	10,50%
8 BIO	15	16	156	10	2
	7,50%	8,00%	78,00%	5,00%	1,00%
9 DIG	8	9	155	22	6
	4,00%	4,50%	77,50%	11,00%	3,00%
17 DIG	5	4	169	17	5
	2,50%	2,00%	84,50%	8,50%	2,50%
Y DIG	41	159	0	0	0
	20,50%	79,50%	0,00%	0,00%	0,00%

Publikation:

Wullich B, Irscheid B, Riedinger S, Stöckle M, Unteregger G (2003) Bladder Cancer Invasion Model Using Genetically Characterised Primary Cell Cultures. Als Poster vorgestellt beim **Deutschen Urologen Kongress in Hamburg 2003**

---

## Danksagung

Diese Dissertation wurde in Zusammenarbeit mit der Klinik und Poliklinik für Urologie und Kinderurologie und dem Institut für Humangenetik an den Universitätskliniken des Saarlandes, Homburg/Saar, angefertigt.

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen herzlich danken, die zum Gelingen dieser Dissertation beigetragen haben.

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. rer. nat. G. Unteregger für die Überlassung des interessanten Themas, für die kompetente und kritische Betreuung während meiner Arbeit. Auch nach abgeschlossener Labortätigkeit und nach Studiumabschluss in meiner Zeit als Assistenzarzt in der Weiterbildung zum Facharzt für Kinder- und Jugendmedizin in Rheinland-Pfalz war Prof. Dr. rer. nat. G. Unteregger stets präsent für meine Anfragen und flexibel für Besprechungstermine.

Bei Herrn Prof. Dr. med. Remberger, dem ehemaligen Leiter des Instituts für Pathologie des Universitätsklinikums Homburg, für die freundliche Übergabe des Untersuchungsmaterials nach Cystektomie.

Insbesondere danke ich Frau Helga Angeli für ihre kompetente Einarbeitung in die Methodik der Zellkultur, ihr Organisationsvermögen und ihr großes Engagement für die Laborarbeit.

Ich möchte allen Mitgliedern des Institutes für Humangenetik danken, für die Einarbeitung in die FISH-Methodik, für die gemeinsame Erstellung der Sonden und das angenehme Arbeitsklima. Insbesondere Prof. Dr. med. Bernd Wullich, Genetiker und ehemaliger leitender Oberarzt der Urologie des Universitätsklinikum in Homburg, möchte ich für seinen Einsatz und seine Ideen in der Anfangsphase der Arbeit danken.

Ein großer Dank gilt natürlich meiner Familie, für ihre Unterstützung und ihr stetiges Interesse an meinem Werdegang.

# Herr Bassem Irscheid

Persönliche Informationen	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Familienstand: ledig</li> <li>▪ Nationalität: deutsch-französisch</li> <li>▪ Alter: 31 Jahre</li> <li>▪ Geburtsort: Saarbrücken</li> </ul>
Ausbildung	<p><b>Juni 1997</b> Abitur als Doppeldiplom Abitur/baccalauréat am deutsch französischen Gymnasium mit Prädikat - sehr gut - in Saarbrücken</p> <p><b>Oktober 1998- Oktober 2005</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Medizinstudium an der Universität des Saarlandes in Homburg</li> <li>▪ Auslandsjahr im Rahmen des ERASMUS-Programm in Lausanne 2000/2001</li> <li>▪ Praktisches Jahr Universität des Saarlandes mit Wahlfach Pädiatrie</li> <li>▪ Mai 2005: Drittes Staatsexamen und Approbation</li> </ul>
Berufserfahrung	<p><b>Oktober 2005-Juli 2006:</b> Assistenzarztstätigkeit im Bereich Innere Medizin im St. Nikolausspital in Andernach, Lehrkrankenhaus der Universität Bonn, mit Schwerpunkt Kardiologie und Gastroenterologie unter der Leitung von Prof. Dr. med. Armin Steinmetz.</p> <p><b>Juli 2006-Mai 2011:</b> Assistenzarztstätigkeit im Bereich Kinder- und Jugendheilkunde im Marienhaus Neuwied, Lehrkrankenhaus der Universität Mainz unter der Leitung von Dr. med. Urban Himbert.</p> <p><b>Facharzt für Kinder- und Jugendmedizin seit 24. März 2011</b></p> <p><b>Seit Mai 2011:</b> Weiterbildung Schwerpunkt Neuropädiatrie im Heinrichhaus Neuwied-Engers unter der Leitung von Fr. Dr. med. Ingrid Degen.</p>
Veröffentlichungen/Dissemination	Poster 2003: Bladder Cancer Invasion Model Using Genetically Characterised Primary Cell Cultures. Deutscher Urologen Kongress in Hamburg
Weitere Berufstätigkeiten	<p>Triple P ( positive parental Programm )-Coach-Ausbildung August 2011 abgeschlossen,</p> <p>Kinderärztlicher Notdienst ( Kid e.V )</p>
Sprachkenntnisse	Französisch und Deutsch: Muttersprache, Englisch: sehr gute Kenntnisse, Arabisch: Basiskenntnisse
Hobbies	Reisen, internationale Literatur, Outdoor-Sport

Lösungen:

- PBS: 1 Liter Lösung enthält 8,0 g Natriumchlorid (NaCl), 0,2 g Kaliumchlorid (KCl), 1,44 g Dinatriumhydrogenphosphat ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) und 0,24 g Kaliumdihydrogenphosphat ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) auf Aqua dest.
- 5xPBS: 1 g KCl, 1 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 40 g NaCl, 7,3 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_3$  in 1L A.dest. lösen
- Blockierungslösung 80 ml Tris/ HCl, 20 ml FCS und 3 g BSA bei pH: 7,2
- TAE-Elektrogelpuffer: 100 mmol Tris-HCL, 50 mmol Acetat, 1 mmol EDTA, pH: 8,0
- 20xSSC: 3 M NaCl, 0,3 M NaCitrat, pH 7
- PFA 4%: 8 g PFA (Paraformaldehyd) in 200 ml PBS

Abkürzungen:

CGH: comparative genomic hybridization

Chr.: Chromosom

DNA: Desoxyribonukleinsäure

ECM: Extracelluläre Matrix

EMT: epitheliale-mesenchymale Transition

FCS: fötales Kälberserum

FISH: Fluoriszierende in situ Hybridisierung

HER2: human epidermal growth factor receptor 2

MMP: Matrix-Metallo-Proteinasen

NBT: Nitroblau Tetrazolium

PFA: Paraformaldehyd

SKY: spektrale Karyotypisierung

SNP: Single Nucleotide Polymorphism

TCC: transitional cell carcinoma

TUR: Transurethrale Resektion

