

Aus dem
Institut für Humangenetik (Direktor: Prof. Dr. A. Gal) und der
Klinik und Poliklinik für Urologie (Direktor: Prof. Dr. H. Huland)
des Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf

Genexpression und chromosomale Aberrationen beim oberflächlichen Harnblasenkarzinom

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines

Doktors der Medizin

dem Fachbereich Medizin der Universität Hamburg

vorgelegt von

Christian Kuschel

aus Hamburg

Hamburg

Juni 2005

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Universität Hamburg am:

Veröffentlicht mit Genehmigung des Fachbereiches Medizin der Universität Hamburg

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende

Prüfungsausschuss, 2. Gutachter/in:

Prüfungsausschuss, 3. Gutachter/in:

EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG:

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Hamburg, Juni 2005

Christian Kuschel

Danksagung

Ich danke den Professoren A. Gal und H. Huland für die Möglichkeit diese Arbeit in ihren Abteilungen anzufertigen. Ebenso bedanke ich mich bei meinem Doktorvater PD Dr. Ulrich Finckh für die Anleitung und Betreuung dieser Arbeit. PD Dr. Martin Friedrich danke ich für die Möglichkeit an diesem Projekt arbeiten zu können. Besonders erwähnen möchte ich Dr. Ute Wölfle, bei der ich mich sehr für ihre Hilfsbereitschaft bedanke. Allen anderen danke ich für ihre Hilfestellung, Tipps und Ratschläge.

INHALT

1	EINLEITUNG	7
1.1	Epidemiologie und Ätiologie	7
1.2	Klinik und Symptomatik	7
1.3	Histopathologie	7
1.4	Staging und Grading	8
1.5	Diagnose	9
1.6	Therapie	10
1.6.1	Oberflächliches Harnblasenkarzinom	10
1.6.2	Muskelinvasives und metastasierendes Harnblasenkarzinom	11
1.7	Tumorbiologie	11
1.8	Prognose	13
1.9	Fragestellung	14
2	STUDIENDESIGN UND METHODEN	15
2.1	Patienten	15
2.2	Expressionsanalyse	15
2.2.1	Nukleinsäure-Isolierung aus Biopsiematerial	16
2.2.2	cDNA-Expressionsarrays	16
2.2.3	cDNA-Synthese	17
2.2.4	Hybridisierung der cDNA-Arrays	18
2.2.5	Datenanalyse	18
2.3	Identifikation genetischer Aberrationen	19
3	ERGEBNISSE	22
3.1	Genexpressionsanalysen	22
3.1.1	Vorbemerkungen zu Technik, Normalisierung und statistischer Auswertung	22
3.1.2	Signifikanzanalyse mit dem Student's t-Test	24
3.1.3	Signifikanzanalyse mit SAM	24
3.1.4	Analyse mit CLUSTER	25
3.1.5	Abgleich mit Online-Datenbanken	28
3.1.6	Vergleich und Wertung der statistischen Analysen	29
3.2	Mikrosatellitenanalysen	30
4	DISKUSSION	35
4.1	Zusammenfassung der ermittelten Genexpressionsdaten	35
4.2	Bestätigte Expressionsdaten	35
4.3	Neue Kandidatengene	36

4.4	Korrelation von Expressionsdaten und Mikrosatellitenanalysen	38
4.5	Kritikpunkte und Zuverlässigkeit der Daten	41
4.6	Ausblick	42
5	ZUSAMMENFASSUNG	44
6	ANHANG	45
6.1	Material	45
6.2	Tabellen Mikrosatellitenanalysen	47
6.3	Tabellen Genexpression	48
7	ABKÜRZUNGEN	51
8	LITERATURVERZEICHNIS	52

1 Einleitung

1.1 Epidemiologie und Ätiologie

Das Harnblasenkarzinom (ICD-10: C-67; ca. 16.000 Neuerkrankungen/Jahr in Deutschland; Inzidenz: 20/100.000) macht 2% aller malignen Tumore aus und ist beim Mann der vierthäufigste, bei der Frau der sechsthäufigste Tumor. Von allen urologischen Tumoren ist es der zweithäufigste nach dem Prostatakarzinom. Männer erkranken doppelt so oft wie Frauen. In den letzten Jahren nimmt die Inzidenz des Blasenkarzinoms bei einem Häufigkeitkeitsgipfel im 6. und 7. Lebensjahrzehnt deutlich zu. Jährlich versterben in Deutschland etwa 5.000 Menschen an den Folgen einer Blasenkreberkrankung. Dieser Tumor steht damit an der 12. Stelle der Todesfälle aufgrund von Karzinomen. Neben Alter, Geschlecht und Lebenswandel (Rauchen, Ernährung, städtische Lebensweise) spielen auch ethnische Zugehörigkeit, sozialmedizinische Umstände (Medikamente, chronische Harnwegsinfekte, Dauerkatheterisierung, Bilharziose, Balkannephropathie) und vor allem Umweltfaktoren (Anilinfarbstoffe und andere Aromaten) eine Rolle bei der Karzinogenese (Robert-Koch-Institut, <http://www.rki.de>).

1.2 Klinik und Symptomatik

Das Leitsymptom des Harnblasenkarzinoms ist in etwa 80% der Fälle die schmerzlose Mikro- oder Makrohämaturie, die den Patienten veranlasst den Arzt aufzusuchen. Tumorblutungen sind weitgehend stadienunabhängig, daher handelt es sich nicht um ein Frühsymptom. Miktionsbeschwerden (Dysurie, Pollakisurie, Nykturie) und Begleitinfektionen werden häufig missachtet oder fehlgedeutet. In späteren Stadien können suprapubische Schmerzen hinzutreten. Bei einer Obstruktion eines Ureterostiums kann es zur Stauungsniere und konsekutiv zu Pyelonephritis, Flankenschmerzen und Fieber kommen. In weit fortgeschrittenen Stadien fallen allgemeine und klassische Tumorsymptome wie Abgeschlagenheit, Fieber, Gewichtsverlust, Appetitlosigkeit, Schmerzen und Anämie auf.

1.3 Histopathologie

Über 90% der Blasentumore sind Karzinome des Urothels (Übergangsepithelkarzinome, transitional cell carcinoma (**TCC**)). Desweiteren finden sich 3-5% Plattenepithel-, 3% undifferenzierte und 2% Adenokarzinome. Die sehr selten vorkommenden mesenchymalen Tumoren der Harnblase können sowohl benigner (Fibrom, Myxom, Leiomyom, Hämangiom, Neurofibrom, Neurinom, Phäochromozytom) als auch maligner (Leiomyosarkom, Fibrosarkom, Rhabdomyosarkom, retikuloendotheliale Tumore) Natur sein. Sekundäre

Blasentumore durch Infiltration (weibliches Genital, Prostata, Kolon) und Metastasierung (Mamma-, Magen-, Bronchialkarzinom, Melanom) sind mit <1% ausgesprochen selten.

1.4 Staging und Grading

Die Stadieneinteilung des Harnblasenkarzinoms erfolgt nach der

- überarbeiteten **T** (Tumorgröße) **N** (Befall der lokalen Lymphknoten (nodes)) **M** (Fernmetastasen)-**Klassifikation (TNM-Staging)** für urologische Tumore der *Union International Contre le Cancer* (UICC, 1998,1997), (Abbildung 1,Tabelle 1) und dem
- **Differenzierungsgrad (Grading,G)** des Gewebes (Epstein *et al.*, 1998) (Tabelle 2).

Eine Sonderform des Blasenkarzinoms ist das **Carcinoma in situ** (Cis oder Tis). Hierbei handelt es sich um eine, nicht die Lamina propria mucosae infiltrierende, intraepithelial wachsende Dysplasie mit Zeichen einer Dedifferenzierung (GIII). Histologisch finden sich große Zellkerne mit hohem Chromatingehalt, prominente Nukleoli und erhöhte mitotische Aktivität. Zudem findet sich eine Vermehrung der Zelllagen der Schleimhaut mit unregelmäßiger Zellanordnung und diskreter Verdickung. Das Carcinoma in situ kann sowohl solitär als auch kombiniert mit einem Blasenkarzinom anderer Klassifikation vorkommen und zeichnet sich durch eine hohe Aggressivität aus (Knowles, 1999a).

Code	Histopathologisches Korrelat
Tx	Primärtumor kann nicht beurteilt werden
T0	Kein Anhalt für Primärtumor
Ta	nichtinvasiver papillärer Tumor
Tis	Carcinoma in situ: "flacher Tumor", spreitet auf dem Urothel
T1	Tumor infiltriert subepitheliales Bindegewebe
T2	Tumor infiltriert Muskulatur
T2a	Tumor infiltriert oberflächliche Muskulatur
T2b	Tumor infiltriert tiefe Muskulatur
T3	Tumor infiltriert perivesikales Gewebe
T3a	mikroskopisch
T3b	makroskopisch (extravesikale Masse)
T4	Tumor infiltriert eines der folgenden Organe:
T4a	Tumor infiltriert Prostata oder Uterus oder Vagina
T4b	Tumor infiltriert Beckenwand oder Bauchwand
Nx	regionäre LK können nicht beurteilt werden
N0	kein Anhalt für regionäre ^a LK
N1	Metastase in solitären LK <2cm in größter Ausdehnung
N2	Metastase in solitären LK > 2cm, aber < 5cm in größter Ausdehnung oder multiple LK, keiner >5cm
N3	Metastasen in LK > 5cm in größter Ausdehnung
Mx	Fernmetastasen können nicht beurteilt werden
M0	kein Anhalt für Fernmetastasen
M1	Fernmetastasen ^b

Tabelle 1: Stadieneinteilung des Harnblasenkarzinoms nach dem TNM-System: ^a Die regionären Lymphknoten sind Lymphknoten des kleinen Beckens der Gebiete der Aa. iliacae internae et externae, des Nervus obturatorius und perivesikal, die im Wesentlichen den Beckenlymphknoten unter der Bifurkation der Aa. iliacae communes entsprechen. Lateralität beeinflusst die N-Klassifikation nicht. ^b Indices (z.B. M oss, pul, hep) zeigen die Metastasenlokalisierung an. Der Prefix m soll bei der entsprechenden T-Klassifizierung zusätzlich angegeben werden, um multiple Läsionen anzuzeigen.

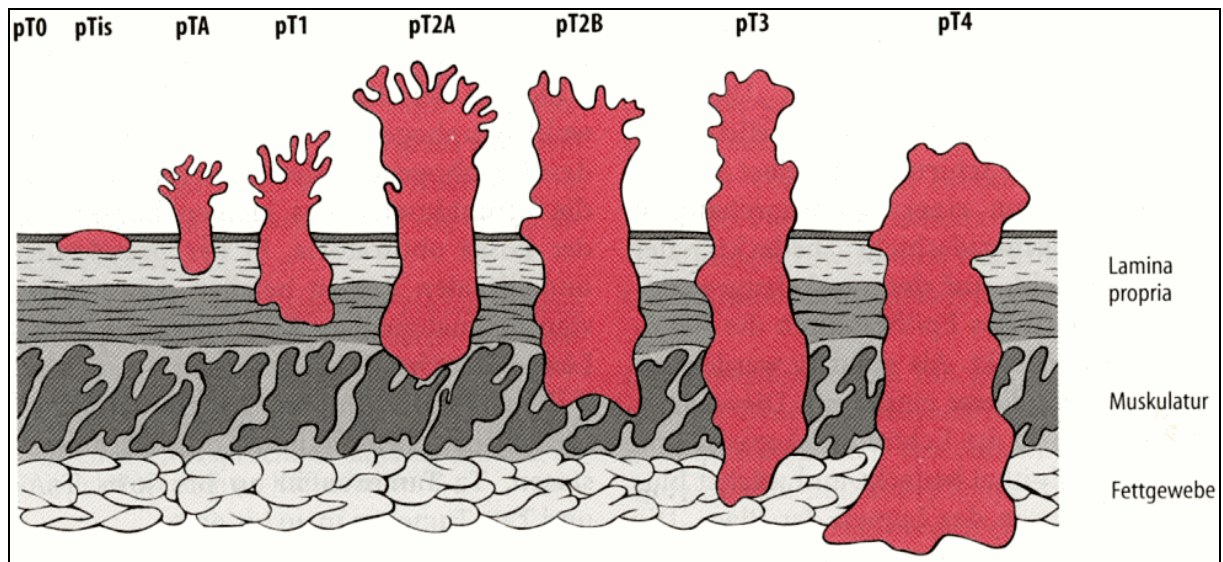


Abbildung 1: Schematische Darstellung des T-Staging beim Blasenkarzinom; Suffix p für die histopathologische Sicherung des Befundes; (nach Hautmann und Huland, Urologie, Springer-Verlag).

Code	histopathologisches Korrelat
G1	gut differenziert
GII	mäßig differenziert
GIII	schlecht differenziert
GIV	anaplastisches Karzinom

Tabelle 2: Stadieneinteilung des Harnblasenkarzinoms nach dem Differenzierungsgrad des Tumors.

1.5 Diagnose

Die Diagnostik des Harnblasenkarzinoms zielt auf die Erfassung des Primärtumors und auf die Beurteilung des lokalen und systemischen Tumorstadiums. Das Kardinalsymptom Mikro- oder Makrohämaturie wird zunächst mit Ultraschalldiagnostik hinsichtlich renaler Ursachen abgeklärt. Im Vordergrund der weiteren diagnostischen Maßnahmen steht als heutiger „Goldstandard“ die Zystoskopie, ein Verfahren mit dem Aussagen bezüglich Lokalisation, Zahl, Invasionsstiefe und Wachstumstyp des Tumors getroffen werden können und das gleichzeitig eine Möglichkeit zur endoskopischen mikrochirurgischen Therapie (Abtragung mittels Elektroschlinge) zumindest bei oberflächlichen Tumoren darstellt (siehe Kap 1.6.1). Man verwendet zu diesem Zweck verschiedene starre Optiken (30 °, 70 ° und evtl. 120 °) oder flexible Fieberglassoptiken, um die Blasenregionen visuell inspizieren und beurteilen zu können. Eine Biopsie zur Beurteilung der Histopathologie und des Differenzierungsgrades erfolgt durch die **transurethrale Resektion des Blasentumors (TUR-B)**. Im Rahmen einer TUR-B kann auch mittels bimanueller Palpation in Narkose die Beweglichkeit der Harnblase als Kriterium für extravasikales Tumorwachstum beurteilt werden. Die Fluoreszenzzystoskopie mit 5-Aminolävulinsäure (5-ALA) eignet sich zur gezielten Biopsie bzw. Resektion flacher urothelialer Läsionen, die mit bloßem Auge schwer oder nicht

erkennbar sind. Hierbei wird 5-ALA in Natriumbikarbonatlösung gelöst und 2 Stunden vor der Zystoskopie intravesikal instilliert. Die Fluoreszenzanregung erfolgt mittels blauvioletter Licht, wobei ein Tumor anhand seiner rötlichen Fluoreszenz unter Verwendung eines Gelbfilters erkannt wird. Mit der Urinzytologie werden Tumorzellen im Urin analysiert. Nach Zentrifugation des Urins (Urinzytologie) oder einer Blasenspülung (Spülzytologie, höhere Spezifität) wird das Sediment aufgeschwemmt und nativ oder gefärbt (z. B. mit Methylblau, HE, Papanicolau) mikroskopisch untersucht. Beim Carcinoma in situ der Harnblase ist die Zytologie wesentlich sensitiver als alle anderen Verfahren einschließlich der Zystoskopie. Diagnostische Versager sind durch hochdifferenzierte Tumore bedingt, die in ihrem Zellbild dem normalen Urothel oder entzündlichen Veränderungen gleichen. Eine Ausscheidungsurographie wird durchgeführt, um einen Tumor im Harnleiter oder Nierenbecken zu diagnostizieren und um Aufschluss über eine etwaige Stauung der Nieren zu erhalten. An bildgebender Diagnostik neben der obligaten Sonographie kommen CT, MRT, Röntgen-Thorax und fakultativ die Skelettszintigraphie zur Anwendung (Oosterlinck *et al.*, 2002). Neue Methoden, die Einzug in die klinische Diagnostik/Prognostik erhalten haben, deren Wert aber noch evaluiert werden muss, sind Urinproteinmarker (Blasentumor-Antigen (BTA), NMP22, CYFRA-21-1, Telomeraseaktivität), Immuncytometrie und DNA-analytische Verfahren (Kausch und Bohle, 2001; Tiguert und Fradet, 2002).

1.6 Therapie

Die Therapie des Harnblasenkarzinoms erfolgt stadienorientiert. Der Nachweis einer Tumordinvasion über die Lamina muscularis propria hinaus ist prognostisch und therapeutisch entscheidend, da in diesem Fall häufig eine lymphogene oder hämatogene Metastasierung stattfindet. Faktoren, die die zu wählende Therapieform bestimmen, sind daher die Tumorphistopathologie (Zuordnung zum TNM-System und der Differenzierungsgrad des Tumorgewebes), weitere Erkrankungen, Alter und Allgemeinzustand des Patienten.

1.6.1 Oberflächliches Harnblasenkarzinom

Bei der Behandlung des oberflächlichen Harnblasenkarzinoms (pTa, pT1, pTis, 70% der Erstdiagnosen) steht ein kurativer Ansatz mit Funktionserhalt der Harnblase im Vordergrund. Grundlage der Behandlung ist die vollständige diagnostische (siehe Kap. 1.5) und therapeutische TUR fakultativ nach intravesikaler Instillation von 5-Aminolävulinsäure. Hierbei werden die exophytischen Tumoranteile, die Tumorbasis einschließlich der Blasenwandmuskulatur und die Tumorränder reseziert. Das gewonnene Gewebe (Biopsat) wird anschließend histopathologisch hinsichtlich Tumorart, Differenzierung und Infiltrationstiefe (TNM-Staging) beurteilt. Die ebenfalls entnommenen randomisierten Probenbiopsien (Mapping) aus anderen Blasenregionen dienen der Identifikation weiterer Tumorherde, begleitender Dysplasien oder eines Carcinoma in situ. Zeigt die

histopathologische Beurteilung einen ausgedehnten uni- oder multifokalen Tumor der Stadien pTa und pT1 oder sind die Resektatränder nicht sicher vollständig tumorfrei, sollte nach etwa 3-4 Wochen eine Nachresektion erfolgen. Aufgrund der hohen Rezidivquote von bis zu 50% (Holmang et al., 1999) in den Stadien pTa, pT1, Cis und multifokalem Tumorwachstum kann eine adjuvante Therapie erfolgen. Hierfür kommen Chemo-, Immun-, Laser- und Photodynamische Therapie in Frage. Die intravesikale Applikation von Chemo- und Immuntherapeutika wird bei oberflächlichen Blasen Tumoren nach vorrausgegangener TUR-B im Sinne einer Rezidivprophylaxe und beim Cis als kuratives Therapieverfahren eingesetzt. Kommt es innerhalb von 3-6 Monaten zu einem Rezidiv, so kann eine radikale Zystektomie indiziert sein.

1.6.2 Muskelinvasives und metastasierendes Harnblasenkarzinom

Zum Zeitpunkt der Erstdiagnose wachsen 20-25% der Harnblasenkarzinome muskelinvasiv ohne Lymphknoten- oder Fernmetastasen (T2-4 N0 M0). Die Therapie unter kurativer Zielsetzung besteht aus der radikalen Zystektomie mit bilateraler pelviner Lymphadenektomie und Radiochemotherapie. Als chirurgischer Blasenersatz der ersten Wahl dient heute die Neoblase aus Abschnitten des terminalen Ileums. Beim metastasierten TCC (M1, in 5% der Erstdiagnosen) kommen palliative Polychemotherapieschemata (Cisplatin, Methotrexat, Vinblastin, Adriamycin und Gemcitabin in verschiedenen Kombinationen) zum Einsatz (EAU, 2002; Oosterlinck et al., 2002).

1.7 Tumorbiologie

Onkogene

Untersuchungen an Blasenkarzinomen (TCC) zeigten Veränderungen der Onkogene Ras, erb-B-2 und EGF-R (epithelialer Wachstumsfaktor), wobei Ras durch eine Punktmutation und die letztgenannten durch Überexpression ihre onkogene Wirkung entfalten. Insbesondere Ha-ras, das eine Schlüsselrolle in der Signaltransduktion einnimmt, hat eine wichtige Rolle in der Karzinogenese des TCC (Kroft und Oyasu, 1994) und wird in 30-40 % der Tumore gefunden (Knowles, 1995; Orntoft und Wolf, 1998). EGF-R und erb-B-2 gehören zu der Superfamilie der Tyrosinrezeptorkinasen und interagieren mit Wachstumsfaktoren. Ihre Überexpression ist mit dem Auftreten von TCC korreliert (Messing, 1990; Momose et al., 1991). Richter et al. haben eine Reihe von Onkogen-Amplifikationen auf den Chromosomen 1, 3, 6, 8, 10 und 20 mit Hilfe komparativer genomischer Hybridisierung (CGH) gefunden (Richter *et al.*, 1998).

Tumorsuppressorgene

Tumorsuppressorgene mit eindeutiger Korrelation zum TCC sind Rb (Retinoblastomgen) und p53. Rb ist ein nukleäres Phosphoprotein mit einer zentralen Funktion im Zellzyklus und erfährt bei der Progression von TCC eine somatische Deletion in beiden Allelen von

Chromosom 13q (Adshead *et al.*, 1998). Das mit vielen Tumoren assoziierte p53 ist auf Chromosom 17p lokalisiert. Es ist ebenfalls ein nukleäres Phosphoprotein und fungiert als Transkriptionsfaktor. Es kann die Zelle in der G1-Phase arretieren und erlaubt so eine DNA-Reparatur. In der allgemeinen und Blasenkrebskarzinogenese ist seine Rolle ausführlich beschrieben worden. Nach dem initialen Verlust eines Allels (LoH) erfährt das verbliebene Allel einen Aktivitätsverlust durch Mutation und umgekehrt. Dieser Vorgang ist auch als „two hit“ Hypothese bekannt. In über 60% der Blasentumore tritt ein mit dem Tumorgrad streng korrelierter Verlust von Chromosom 17p auf (Brandau und Bohle, 2001; Sidransky *et al.*, 1991). Von Deletionen und Allelverlusten betroffen ist auch das Chromosom 9p mit den Tumorsuppressoren p14, p15 und p16, die Schlüsselfunktionen im Zellzyklus einnehmen (Williams *et al.*, 2002). Weniger genau beschriebene Tumorsuppressorgene sind ARF, PTEN, PTCH und TSC1 (Knowles, 1999a).

Genetische Alterationen

Genetische Alterationen wie LoH sind bei TCC in den Regionen 3p, 4p, 8p, 9q, 11p, 13q, 17p und 18q wiederholt beschrieben worden (Knowles, 1999b; Knowles *et al.*, 1994). Die Veränderungen von 9q, 8p und 4p sind am bedeutsamsten (Cordon-Cardo *et al.*, 2000; Knowles, 1995; Reznikoff *et al.*, 1996). Deletionen von 9q werden in der Hälfte aller Tumore unabhängig von Stadium und Grad gefunden (Gonzalez-Zulueta *et al.*, 1993; Miyao *et al.*, 1993). Alterationen von Chromosom 8p werden insbesondere bei fortgeschrittenen Tumoren beobachtet (Sauter *et al.*, 1997).

Genexpressionsstudien

In neuerer Zeit sind einige Genexpressionsstudien unternommen worden mit dem Versuch, prognostische Marker oder Klassen von Genen mit prognostischer oder allgemeiner tumorbiologischer Bedeutung zu identifizieren. So fanden Thykjaer *et al.* in Untersuchungen mit großen Arrays (6500 Gene) in oberflächlichen und invasiven Tumoren 400 Gene, deren Expressionsmuster mit den histopathologischen Befunden korrelierten. Diese Gruppe konnte reziprok aus den Expressionsdaten auf oberflächliche bzw. invasive Tumorstadien interpolieren. Thykjaer und Mitarbeiter beschrieben ferner in oberflächlichen Blasenkarzinomen Cluster von heraufregulierten Genen, die bestimmten funktionellen Gruppen wie Transkriptionsfaktoren, ribosomalen Genen, Proteasen (Metalloprotease, CathepsinE) und Genen des Immunsystems (HLA, MHC) angehören. (Thykjaer *et al.*, 2001). Die Arbeitsgruppe um Dyrskjot identifizierte mit Hilfe von umfangreichen Arraystudien 32 klinisch-diagnostisch relevante Gene, mit deren Hilfe die Genexpression in Tumoren in Korrelation mit dem TNM-Stadium und dem Differenzierungsgrad des jeweiligen Tumors gesetzt werden konnte. Dyrskjot und Mitarbeitern gelang es, in 75 % der Fälle anhand des Expressionsmusters rezidivierende von nicht-rekurrenten pTa-Tumoren zu unterscheiden.

Weiterhin konnte diese Gruppe Genprofile, die eine Vielzahl von Genen einschließen, zur Charakterisierung von Tumorstadien erstellen (Dyrskjot *et al.*, 2003).

Sanchez-Carbayo und Mitarbeiter konnten mit cDNA-Arrays (9000 Gene) in Zelllinien invasiver Tumore, aber nicht aus oberflächlichen Läsionen, Überexpressionen von Calveolin-1 und Keratin 10 messen. Dieser Gruppe gelang die Assoziation von Expressionsdaten von Zyxin, Moesin und Cadherin-E mit denen von p53 und RB als den wichtigsten Faktoren (s.o.) in der Karzinogenese von TCC (Sanchez-Carbayo *et al.*, 2002). In einer neueren Arbeit postulieren Sanchez-Carbayo und Mitarbeiter u.a. für Cytokeratin 20, Neuropillin-2, p21 und Cyclin E Korrelationen mit dem Tumorstadium, -grad und -überleben (Sanchez-Carbayo *et al.*, 2003).

1.8 Prognose

Bei der Erstdiagnose finden sich in ca. 70% „oberflächliche“ Harnblasenkarzinome der Stadien pTa und pT1 (Landis *et al.*, 1999), (Tabelle 3). Diese Tumore haben trotz ihres vergleichsweise frühen, wenig fortgeschrittenen Stadiums und optimaler Therapie eine sehr hohe Wahrscheinlichkeit von 40-60% lokal zu rezidivieren (Cookson *et al.*, 1997; Holmang *et al.*, 1999; Pawinski *et al.*, 1996), was eine wesentliche Verschlechterung der Prognose mit sich bringt (Fitzpatrick *et al.*, 1986; Kurth *et al.*, 1995; Millan-Rodriguez *et al.*, 2000). Das Risiko eines pTa/pT1-Tumors, trotz histopathologischer Tumorfreiheit der Resektatränder dennoch progredient, dh. muskelinvasiv oder metastatisch zu wachsen, steigt mit dem Grading (de Wit *et al.*, 2002). GI-Tumore („low risk“, unifokaler Tumor, Durchmesser \leq 3 cm, pTaGI) haben allgemein ein kleineres Risiko von 7% progredient zu werden verglichen mit 40% in GIII-Tumoren („high risk“, multifokal, pT1GIII). Die Mortalität von initial nichtinvasiven Tumoren rangiert zwischen 4,3% bei low-risk-Tumoren und 30 % in high-risk-Tumoren (Chopin und Gattegno, 2002; Millan-Rodriguez *et al.*, 2000). Dieses Risiko ist beim aggressiv wachsenden Carcinoma in situ generell hoch (Kurth *et al.*, 2000). Diese Daten unterstreichen eine nur sehr schwache Korrelation zwischen den histopathologischen Befunden und dem klinischen Verlauf.

Tumorstadium	Häufigkeit bei Erstdiagnose
pTa	40%
pT1	30%
Tis	2-5%
pT2	20%
Metastasierendes Harnblasenkarzinom	3-5%

Tabelle 3: Relative Häufigkeit verschiedener Stadien des Harnblasenkarzinoms bei Erstdiagnose.

1.9 Fragestellung

Für oberflächliche Blasenkarzinome gibt es bis heute keine klinisch-prädiktive Marker (Kausch und Bohle, 2002; Khan et al., 2001). Die hohe Rezidiv- bzw Progressionsquote der pTa /pT1-Tumore impliziert die Notwendigkeit, neben den klassischen histopathologischen weitere prognostisch-diagnostische Methoden zu entwickeln. Risikopatienten mit hoher Rezidivwahrscheinlichkeit könnten identifiziert werden, um bei ihnen andere, individuell angepasste bzw. aggressivere Therapieschemata (z. B. Cystektomie, adjuvante Chemotherapie) anzuwenden. Patienten mit geringerem Rezidivrisiko würden nebenwirkungsreiche Therapien erspart bleiben. Zu diesem Zweck sollen subzelluläre Unterschiede zwischen Tumor und der Mucosa untersucht werden. Ein vielversprechender Ansatz ist hier die Analyse der Genexpression auf RNA-Ebene. Die Karzinogenese von Normalgewebe über Dysplasie bis hin zum Tumor beinhaltet eine große Vielfalt an dauerhaften Veränderungen in interagierenden zellulären Reaktions- und Regulationssystemen, von denen auch die umgebenden Wirtszellen betroffen sind. Allerdings konnten bis vor kurzem nur wenige Faktoren gleichzeitig auf Protein- oder RNA-Ebene hinsichtlich ihrer biologischen, prognostischen und prädiktiven Wertigkeit in Tumoren und Vergleichsgeweben untersucht werden. Diese Lücke kann die cDNA-Mikroarray-Technologie, mit der die Expression auf RNA-Ebene (Transkriptomanalyse) von Tausenden von Genen parallel bestimmt (Screening) werden, zumindest teilweise schließen. Mit dieser Methode kann man die differentielle Genexpression (herauf/herunter [up/down]-Regulation der Expression von Genen) vieler Gene identifizieren und so ihre funktionale Beziehung in der Karzinogenese aufdecken. Die Erkenntnisse können dann mit morphologischen, therapeutischen und klinischen Daten korreliert werden. Unterschiede in der Genexpression könnten Hinweise auf die molekularen Mechanismen von Invasion und Rezidivierung von oberflächlichen TCC der Harnblase geben. Gene für Adhäsionsproteine, Proteasen, Zell-Zyklus-Regulatoren, Wachstumsfaktoren, Onkogene, Tumorsuppressorgene und Zytokine sind denkbare Kandidaten für bedeutsame Veränderungen ihrer Expression in Tumoren. Weiterhin soll untersucht werden, inwieweit die differenzielle Genexpression mit Veränderungen auf DNA-Ebene (genomische Alterationen, chromosomale Aberrationen) wie der Verlust eines Allels (LoH, loss of heterozygosity) korreliert. Die gewonnenen Erkenntnisse können zu einem besseren Verständnis der Tumorbiologie und somit zu verbesserter Diagnose, Therapie und Prognose von oberflächlichen Harnblasenkarzinomen beitragen.

2 Studiendesign und Methoden

Material (siehe Anhang, Abschnitt 6.1)

2.1 Patienten

Die für die Genexpressionsanalyse und die genetischen Untersuchungen verwendeten Gewebeproben stammen von Patienten (Tabelle 4), die sich einer TUR-B eines oberflächlichen Urothelkarzinoms der Harnblase unterziehen mussten. Der Eingriff erfolgte in der Klinik und Poliklinik für Urologie, Universitätskrankenhaus Eppendorf, Hamburg. Routinemäßig wurden der Tumor und mehrere Schleimhautproben vom Dach und Boden sowie den Seitenwänden der Harnblase entnommen. Die histopathologische Beurteilung fand im Institut für Pathologie, Universitätskrankenhaus Eppendorf, Hamburg, statt. Die Biopsate der Patienten wurden direkt nach dem Eingriff bei -20°C in RNAlater[®] konserviert.

Patient	Staging	Grading	Tumorstatus	Geschlecht	Alter
12	pTa	GII	kein Rezidiv	M	82
13	pT1	GIII	Rezidiv: pT1GIII	M	82
14	pTa	GI	Rezidiv: pT1GII	M	62
15	pTa	GII	kein Rezidiv	M	46
16	pTa	GI	kein Rezidiv	M	66
17	pTa	GI	Rezidiv: pTaGII	M	62
18	pTa	GII	Rezidiv: pT2GIII	M	75
19	pTa	GII	kein Rezidiv	M	90
20	pTa	GII	kein Rezidiv	M	57
21	pTa	GI	Rezidiv: pTaGI	M	77
22	pTa	GII	kein Rezidiv	M	91
23	pT1	GIII	Rezidiv: pT2GIII	M	70
24	pT1	GIII	Rezidiv: pT2N2M1	M	52
25	pT1	GII	kein Rezidiv	M	75
26	pTa	GI	kein Rezidiv	F	63
27	pTa	GI	kein Rezidiv	M	71

Tabelle 4: Patientendaten

2.2 Expressionsanalyse

Die zelluläre total-mRNA wurde in radioaktive cDNA revers transkribiert. Diese cDNA wurde mit der auf einer Nylonmembran befindlichen genspezifischen cDNA hybridisiert und durch Radiogramme nachgewiesen. Der Ablauf der Genexpressionsanalysen ist schematisch in Abbildung 2 als Flußdiagramm dargestellt.

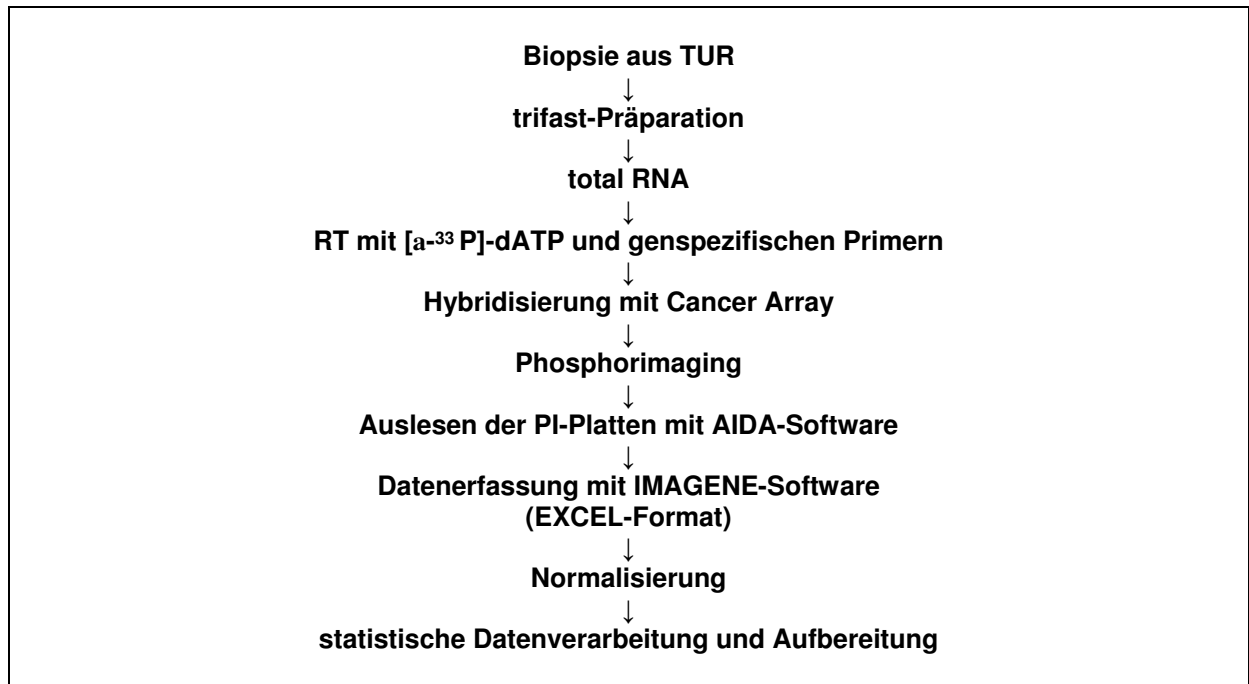


Abbildung 2: Experimenteller Ablauf der Genexpressionsanalysen

2.2.1 Nukleinsäure-Isolierung aus Biopsiematerial

Zur Isolierung wurde das Gewebestück in flüssigem Stickstoff schockgefroren und mechanisch zerkleinert. Danach wurden die Nukleinsäuren mit peqGold TriFast[®] entsprechend des Herstellerprotokolls extrahiert und präzipitiert. Das RNA-Pellet wurde in RNase-freiem Wasser mit 1U RNase Inhibitor (SUPERaseIn[®])/μl RNA resuspendiert und bei -80°C bis zur weiteren Analyse gelagert. Kurz vor der weiteren Analytik wurde ein DNA-Verdau für 30 Minuten bei 37°C mit 1 Unit DNase/μg RNA mit DNA-free[®] durchgeführt, um genomische DNA zu entfernen. Das DNA-Pellet wurde je nach Löslichkeit in bis zu 30μl bidestilliertem Wasser aufgenommen.

2.2.2 cDNA-Expressionsarrays

Der „BD Clontech Atlas-Human-1.2-Cancer-Array[®]“ (im Folgenden synonym: Filter, Membran oder Array) ist eine positiv geladene Nylonmembran, auf der cDNA-Fragmente von 1176 tumorassoziierten menschlichen Genen aufgetragen (als kreisrunde Tröpfchen [spots]) und immobilisiert sind. Die einzelnen Spots enthalten je Gen 10 ng +/- 2 ng cDNA (PCR amplifiziert, mit einer Länge von 400-600 bp). Auf dem Array sind außerdem 9 konstitutiv exprimierte Gene („House-Keeping-Gene“) als Positivkontrollen (z.B. Tubulin, β-Aktin, GAPDH, etc) sowie Bakteriophagen-DNA als Negativkontrollen und genomische DNA zur Bestimmung einer etwaigen DNA-Kontamination der Proben immobilisiert (Abbildung 3).

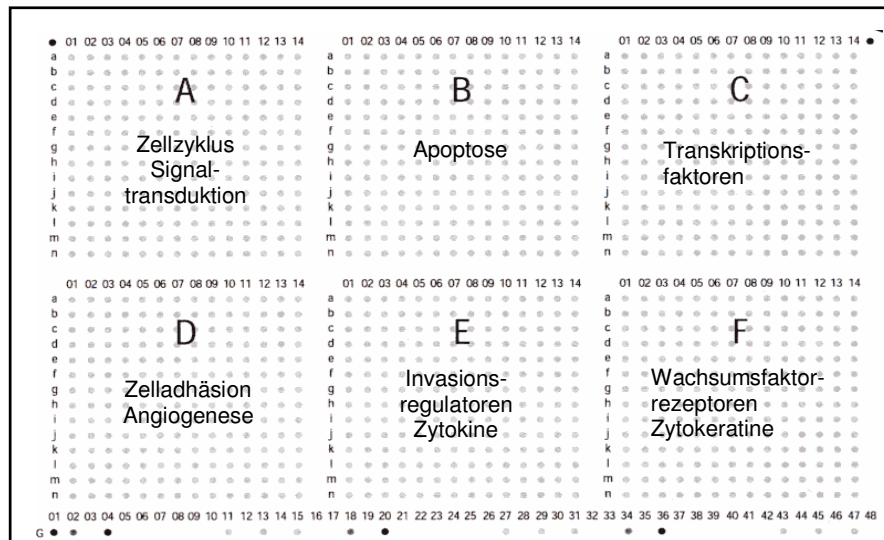


Abbildung 3: Darstellung der Anordnung der funktionellen Gengruppen auf dem 1.2-Cancer-Array. Jeder Filter enthält immobilisierte cDNA von 1176 tumorassoziierten humanen Genen aus funktionellen Gruppen, die u.a. dem Zellzyklus, der Apoptose, der DNA-Reparatur, der Zelladhäsion, der Invasion oder den Wachstumsfaktoren zugeordnet werden können. Diese Gene sind in jeweils rechteckigen Gruppierungen auf dem Filter angeordnet und anhand ihrer Koordinaten identifizierbar. Unter der Koordinate G (unterste Zeile) befinden sich Bakteriophagen-DNA und cDNA von „House-Keeping-Genen“.

2.2.3 cDNA-Synthese

Für die cDNA-Synthese wurden 5 µg DNA-freie Gesamt-RNA mit 1 µl CDS (cDNA-Synthese)-Primern des „1.2-Cancer-Array-Kits“ für fünf Minuten auf 65°C erhitzt. Ein Mastermix bestehend aus 2 µl 5x first strand cDNA Puffer, 0,5 µl 100 mM DTT, 1 µl dNTP-Mix (je 5 mM dCTP, dGTP, dTTP) und 3,5 µl [α -³³P]dATP (3000 Ci/mmol in 10 µl) wurde diesem Ansatz hinzugefügt und für zwei Minuten bei 42 °C inkubiert. Dann wurde 1 µl Superscript-II-Reverse-Transkriptase (200 U/µl) hinzupipettiert. Da die SuperScript-II-Reverse-Transkriptase (aus E.coli, die das pol-Gen von MMLV enthalten) nicht durch ribosomale RNA oder tRNA gehemmt wird und auch besonders lange Transkripte umschreiben kann, ist dieses Enzym für die cDNA-Synthese aus Gesamt-RNA gut geeignet. Die cDNA-Synthese erfolgte für 50 Minuten bei 42°C. Anschließend wurde die Reaktion bei 70°C für 15 Minuten beendet. Die cDNA-Probe wurde mit dem „Nucleotide Removal Kit“ von überschüssigen, nicht eingebauten Nukleotiden gereinigt. Der Einbau von [α -³³P]dATP in die cDNA wurde mit einem Szintillationszähler bestimmt, wobei die markierte Probe mindestens 2×10^6 cpm aufweisen sollte. Die noch in der cDNA-Probe vorhandene RNA wurde durch eine alkalische Hydrolyse mit 10 µl 1M NaOH und 10 mM EDTA bei 68°C in 20 Minuten degradiert, danach wurden die Proben mit 112,5 µl 1M NaH₂PO₄ bei 68°C für 10 Minuten neutralisiert. Repetitive Sequenzen in der markierten cDNA-Probe wurden durch Zugabe von 2,5 µg Cot-1-DNA zu der cDNA-Probe abgesättigt.

2.2.4 Hybridisierung der cDNA-Arrays

Nachdem die Arrays luftblasenfrei in eine Rollflasche eingelegt wurden, erfolgte für 30 Minuten bei 68°C eine Vorhybridisierung mit 5 ml ExpressHyb Solution und 100 µg denaturierter Lachssperma-DNA pro ml Hybridisierungslösung. Die Denaturierung der Lachssperma-DNA erfolgte für 5 Minuten bei 99°C. Salmon-Testis-DNA dient der Blockierung unspezifischer Bindungen der cDNA-Fragmente auf der Nylonmembran. Danach erfolgte die Hybridisierung der markierten cDNA-Proben bei 68°C über Nacht. Die Membranen wurden viermal mit geringer Stringenz in Waschlösung-1 (2x SSC, 1% SDS), einmal mit hoher Stringenz in Waschlösung-2 (0,1x SSC, 0,5% SDS) bei 68°C für jeweils 20 Minuten gewaschen und danach feucht in eine Folie eingeschweißt.

Die auf die Arrays hybridisierte cDNA- Probe wurde durch 10-minütige Inkubation der Arrays in kochender SDS-Lösung (0,1% (v/v) SDS) wieder von den Filtern entfernt. Nach dem Erkalten der SDS-Lösung wurde die Membran kurz in Waschlösung-1 gewaschen, feucht in eine Folie eingeschweißt und bei -20°C gelagert.

2.2.5 Datenanalyse

Die eingeschweißte Membran wurde für mindestens 72 Stunden auf eine Phospho-Imagerplatte (Raytest) in einer Röntgenfilmkassette gelegt. Die exponierte Phospho-Imagerplatte wurde mit einem Phospho-Imager (Fuji Bas 3000) bei einer Auflösung von 100 µm eingescannt. Die exprimierten Gene erschienen dabei als punktförmige Signale (spots). Da der Fuji Bas Phosphoimager nur transformierte „TIFF-Files“ generiert, wurden die Bilder mit der „lmg2tiff Software“ von Raytest zu linearen „TIFF-Files“ konvertiert, damit die Stärke der Genexpression proportional dem Schwärzungsgrad der Spots entsprach. Diese linearisierten Bilder wurden mit der Imogene 4.2 Software digitalisiert und in absolute Intensitätswerte umgewandelt. Zur Datenanalyse wurden die entsprechenden lokalen Hintergrundwerte mit dem Tabellenverarbeitungsprogramm Excel vom Signalwert subtrahiert. Negative Werte wurden gleich null gesetzt, da in diesem Fall der Wert des Hintergrundes höher war als der Signalwert, so dass das entsprechende Gen auf jeden Fall als nicht exprimiert galt. Für den Vergleich der Daten wurde eine gemeinsame Referenz berechnet, die auf der mittleren Expression aller Gene der zu vergleichenden Proben basierte. Die Expression der Gene auf den Arrays wurde dann auf der Basis des Mittelwertes der Referenz normalisiert. Die Intensitätsdaten wurden anschließend mittels des Student's t-Test, der „SAM“- (Significance Analysis of Microarrays)-Software (Tusher *et al.*, 2001) und mithilfe der Software „Cluster“ zur Clusteranalyse (Eisen *et al.*, 1998) statistisch analysiert bzw. aufbereitet. Alle Berechnungen erfolgten mit \log_2 -transformierten Daten. Im t-Test wurden nur die Gene für statistisch signifikant differentiell exprimiert erachtet, die einen p-Wert von 0,05 nicht überschritten. Bei der SAM-Analyse wurden q-werte von unter 20% als

signifikant angesehen. Die Ergebnisse wurden zur Identifikation spezifischer Expressionsprofile und -muster mit Hilfe des „Cluster“-Programmes analysiert. Es wurde ein hierarchisches „Clustering“ vorgenommen, wodurch differenziell exprimierte Gene in rot/grün-Unterschieden visuell mit dem Programm „TreeView“, (Eisen et al., 1998) dargestellt werden konnten.

2.3 Identifikation genetischer Aberrationen

DNA-Mikrosatellitenmarker (**short tandem repeat polymorphisms**, STRPs) sind im Hinblick auf die Anzahl der Wiederholungseinheiten hochpolymorphe repetitive kurze DNA-Sequenzen (z.B. CACACACACA), die im Genom verstreut liegen. Aufgrund der hohen Polymorphie in der Bevölkerung sind erwartungsgemäß viele Individuen heterozygot für diese STRPs. Heterozygote chromosomale Deletionen führen durch Verlust eines Allels zum „Loss of Heterozygosity“ (LoH; Verlust der Heterozygotie) — ein bekanntes Phänomen in einer Reihe von Tumoren. Mittels der Mikrosatellitenmarkeranalyse können diese Allelverluste nachgewiesen werden. Hierzu wurden fluoreszenzmarkierende PCR und das Analysesystem ABI 310 eingesetzt. Der forward-Primer wurde jeweils mit den Fluoreszenz-Farbstoffen FAM, HEX oder TET markiert. Die verwendeten Marker wurden zuvor (Schneider et al., 2000; Steiner et al., 1997) beschrieben (D8S133, D8S136, NEFL, D8S137, D9S156, IFNA, D9S161, D9S747, D9S195) oder aus dem ABlprism linkage mapping set (D2S164, D1S468, D12S351 und D17S802) ausgewählt (Tabelle 12). Drei neue Marker (c17tg22, c17ca24 und c21tg30) wurden durch die Suche nach (CA)_{>24} und (TG)_{>22} Dinukleotidwiederholungen (Tabelle 13) in chromosomalen Regionen identifiziert, in denen herunterregulierte Gene gefunden wurden. (Angaben zu den Mikrosatellitenmarkern siehe Anhang, 6.2)

Alle PCR-Reaktionen wurden in einem Volumen von 12 µl durchgeführt. Die Ansätze wurden in einem Mastermix zusammenpipettiert. Pro Einzelansatz waren folgende Reagenzien enthalten:

- 1,2 µl 10 x Reaktionspuffer
- 0,6 µl Primermix (forward (fluoreszenzmarkiert) +reverse je 10 µM).
- 0,24 µl dNTP-Mix (je 10 mM dATP, dCTP, dTTP und dGTP)
- 0,096 µl Quiagen Taq Polymerase (5 U/µl)
- 7,4 µl H₂O
- 0,4 µl Genomische DNA
- 15 µl Wachs zum Erreichen von Hotstartbedingungen

Folgende Parameter wurden als Reaktionsprofil mit dem PCR-Cycler GenAmp 9600 eingestellt:

- Initiale Denaturierung mit 95 °C für 45 sec

14 Cyclen mit 95°C für 15 sec Denaturierung, 68°C für 30 sec Annealing mit einem Dekrement von -1°C pro Zyklus, 72°C für 30 sec Extension gefolgt von 26 Cyclen mit 95°C für 15 sec Denaturierung, 55°C für 30 sec Annealing mit einem Inkrement von 2°C pro Zyklus, 72°C für 30 sec Extension und 72°C für 10 min zur Beendigung der Reaktion sowie Kühlung bei 10°C.

Zur Darstellung und Qualitätskontrolle der PCR-Produkte wurde die Agarosegelelektrophorese eingesetzt. Die Länge (in Basenpaaren, bp) der fluoreszenzmarkierten PCR-Produkte wurde mit dem ABI Prism 310 GeneticAnalyzer untersucht. Hierfür wurden in Abhängigkeit von der im Agarosegel geschätzten PCR-Produktkonzentration 0,5-1,5 µl PCR-Produkt mit 20 µl Formamid und 0,5µl Längenstandard Tamra500® zusammenpipetiert, bei 95°C denaturiert und schnell auf Eis abgekühlt. Die Proben wurden im ABI310 System mittels Kapillargelelektrophorese und lasergestützter Fluoreszenzanalyse untersucht. Die GeneScan-Software setzt mit Hilfe des Längenstandards Tamra500™ die Fluoreszenzsignale entsprechend den Retentionszeiten in Intensitätswerte und Längenangaben (in Basenpaaren) um. Die Daten wurden als Chromatogramme dargestellt, in denen die beiden Allele eines Markers in heterozygotem Normalgewebe als 2 Peaks erscheinen (Abbildung 4 und Abbildung 5). Für den Nachweis eines LoH wurde jeweils Tumor und Mucosa eines Patienten miteinander verglichen. Kriterium für einen LoH war das Ausbleiben eines Peaks im Tumorgewebe oder ein deutlich verkleinerter Signalpeak (mindestens 50% Intensitätsverlust, visuell abgeschätzt) im Vergleich zur Mucosa (Abbildung 4).

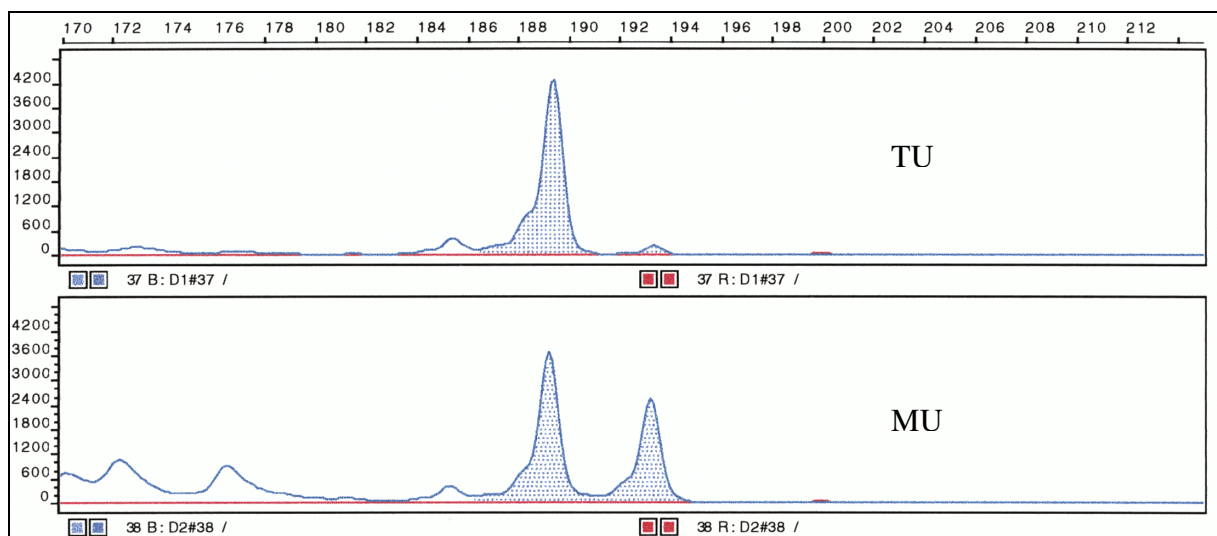


Abbildung 4: Mikrosatellitenanalyse bei Tumor und Mucosa eines Patienten. Verlust des längeren Allels im Tumor (LoH). Aufgetragen ist die PCR-Produktlänge in bp gegen den absoluten Intensitätswert.

Eine Umkehr der allelischen Peakhöhenrelation im Paarvergleich wurde als allelische Imbalance (Abbildung 5) bezeichnet. Residuale Signale des im Tumor in der Regel nicht ganz verschwundenen Allels bei LoH oder AI wurden auf Stromagewebe und tumorflankierendes Normalgewebe zurückgeführt. Jedes positive Ergebnis wurde zweifach repliziert.

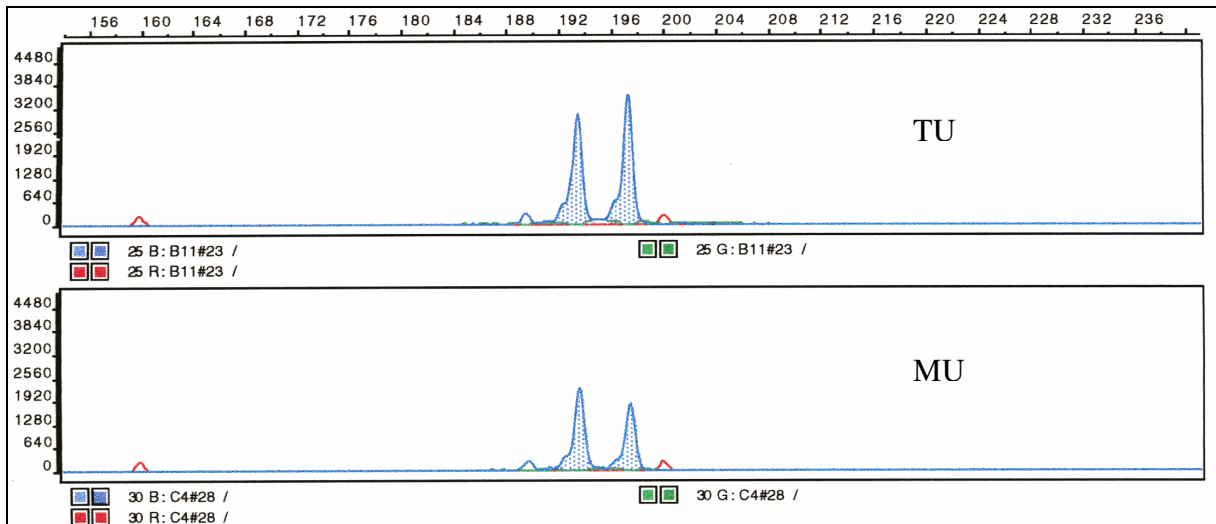


Abbildung 5: Mikrosatellitenanalyse bei Tumor und Mucosa eines Patienten. Intensitätsverlust des kürzeren Allels im Tumor (AI).

3 Ergebnisse

3.1 Genexpressionsanalysen

Ziel dieser Arbeit war die Identifikation differentiell exprimierter Gene, die Analyse von Genexpressionsmustern und die Untersuchung einer möglichen Korrelation von differentieller Genexpression mit genetischen Alterationen des primären oberflächlichen Harnblasenkarzinomes sowie die Beurteilung bezüglich tumorbiologischer und klinischer Fragestellungen. In den Expressionsanalysen wurde der Tumor mit der makroskopisch-chirurgisch und mikroskopisch-histopathologisch unauffälligen Schleimhaut (Urothel, Mucosa) sowohl intraindividuell als auch interindividuell verglichen. Die Analyse und Interpretation dieser Daten ist sehr komplex und nur im Zusammenhang mit einer detaillierten Beschreibung der Bedingungen unter denen sie gewonnen wurden sinnvoll. Daher wurde das MIAME (**M**inimum **I**nformation **A**bout a **M**icroarray **E**xperiment)-Konzept entwickelt (Brazma *et al.*, 2001), mit dessen Hilfe die Ermittlung der Mikroarraydaten (bestehend aus dem experimentellen Aufbau, der Arrayherstellung, der Probenpräparation, der Hybridisierung, der Quantifizierung und der Normalisierung der Ergebnisse) standardisiert werden soll.

3.1.1 Vorbemerkungen zu Technik, Normalisierung und statistischer Auswertung

Technik

Die Genexpressionsanalyse wurde mit dem Atlas® Human 1.2-Cancer-Array durchgeführt. Dieser Array enthält insgesamt 1176 tumorassoziierte Gene, die in biologisch-funktionelle Kategorien eingeteilt werden können (Abbildung 3). Die eigentlichen Messwerte sind absolute Strahlungsintensitäten durch die eingebauten Radionuklide (Abbildung 6). Diese Intensitäten werden durch die Software in Zahlenwerte umgesetzt und sind somit nach Normalisierung einer statistischen vergleichenden Analyse zugänglich.

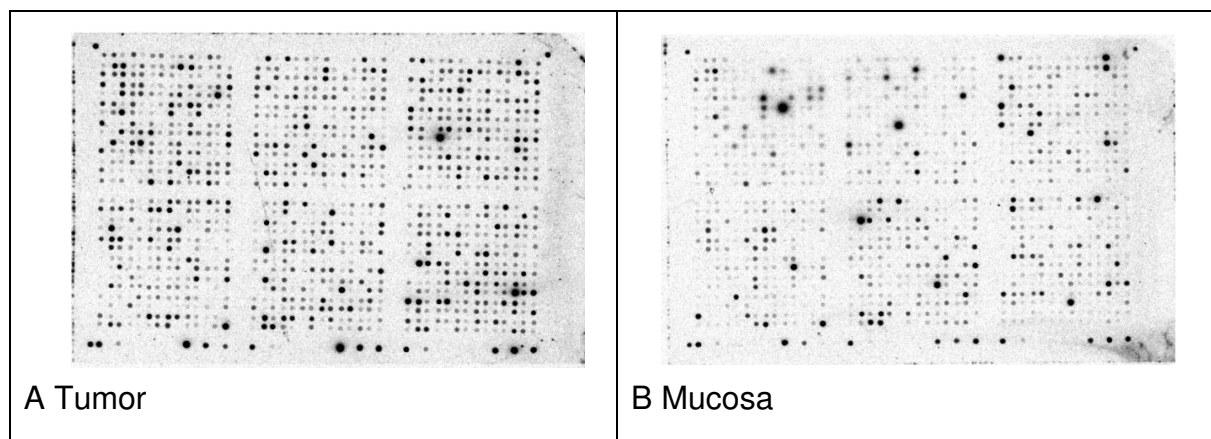


Abbildung 6: Autoradiogramm der Arrayhybridisierung mit cDNA eines Tumors (A) und einer makroskopisch unauffälligen Blasenmucosa (B) desselben Patienten (Pat. 4). Ein exprimiertes Gen ist als punktförmiges Signal zu erkennen.

Normalisierung

Durch die Normalisierung werden die technisch-experimentell bedingten Unterschiede (Qualität und Menge der mRNA, Markierungs- und Detektionseffizienz der Proben, Qualität cDNA) zwischen den einzelnen Hybridisierungsexperimenten ausgeglichen und die Einzelproben somit miteinander vergleichbar gemacht. Die Normalisierung wurde basierend auf allen exprimierten Genen in allen Experimenten durchgeführt. Hierfür wurde für jeden Filter der Mittelwert aller gemessenen Intensitäten ermittelt. In einem 2. Schritt wurden die Mittelwerte aller Einzelgene aus allen Experimenten berechnet. Der hieraus gemittelte Referenzfaktor wiederum wurde mit den jeweiligen Genintensitäten des Einzelfilters multipliziert, die somit normalisiert waren und der statistisch bewertet werden konnten.

Statistische Auswertung

Zur Beurteilung wurden die Daten drei Methoden statistischer Behandlung unterzogen. Als differenziell exprimiert eingestuft wurden Gene, die nach der Normalisierung im zweiseitigen **Student's t-Test** bezüglich der untersuchten Gruppen (Tumore und makroskopisch unauffällige Mucosa) statistisch signifikante ($p < 0.05$) Unterschiede aufwiesen. Der Student's t-Test wurde mit \log_2 transformierten Daten durchgeführt, um extreme Abweichungen einer Probe innerhalb einer Gruppe auszugleichen. Die Bildung des Quotienten aus der normalisierten Intensität des Tumors und der Schleimhaut ergab direkt den Genexpressionsunterschied und einen Hinweis auf die Veränderung der Genregulation auf Transkript-Ebene. Parallel wurden die Daten des t-Tests mit der **SAM**-Software analysiert, die aus einer Folge von mehreren *t*-Tests die Verteilung und Verlässlichkeit der Daten ermittelt (Tusher *et al.*, 2001). Abschließend wurde eine weitere Beurteilung mit der Klassifizierungssoftware **CLUSTER** vorgenommen (Eisen *et al.*, 1998).

3.1.2 Signifikanzanalyse mit dem Student's t-Test

Ziel war es, Gene zu identifizieren, die in Tumor und Mucosa differentiell exprimiert sind. Mithilfe des Student's t-Test wurde analysiert, inwieweit die Expressionsunterschiede als signifikant oder zufällig einzuschätzen sind. Sowohl das Ausmaß der differentiellen Expression der einzelnen Gene als auch die Häufigkeit mit der das entsprechende Gen bei den einzelnen Individuen differentiell exprimiert war, ging in den t-Test mit ein. Die Analyse der Genexpressionsdaten mit dem t-Test ergab 77 differentiell exprimierte Gene, deren p-Werte ($p < 0.05$) nominell auf Signifikanz hinwiesen. Zugrunde gelegt wurden Intensitätsratios (Intensität Tumor/Intensität Mucosa) von $< 0,5$ für Herunterregulation und > 2 für Heraufregulation. Von diesen 77 Genen waren 48 Gene in der Tumorgruppe stärker und 29 Gene schwächer exprimiert. Es waren also ca. 2/3 der gefundenen Gene hochreguliert (up) und 1/3 herunterreguliert (down) (Tabelle 15). Zu den im Tumor stärker exprimierten Genen gehörten u.a. Gene des allgemeinen und des Nukleinsäurestoffwechsels ($n=17$), der Signaltransduktion ($n=8$), Onko- und Tumorsuppressorgene ($n=7$) und Intermediärfilamente ($n=4$). Im Tumor schwächer exprimiert wurden Gene für Zelloberflächenproteine bzw. Extrazellulärmoleküle ($n=9$) (Tabelle 5).

Genfunktion	Genexpression im Tumor		Σ
	erhöht	reduziert	
Nukleinsäurestoffwechsel	17	2	19
Signaltransduktion	8	5	13
Zellzyklus	3	2	5
Zelloberfläche	4	9	13
Apoptose	2	3	5
Wachstumsfaktoren, Cytokine	2	2	4
Onkogene und Tumorsuppressoren	7	2	9
Intermediärfilamente	4	1	5
Transkriptionsaktivatoren	0	2	2
Proteaseinhibitoren	1	1	2
Summe	48	29	77

Tabelle 5: Gruppen differentiell exprimierter Gene

3.1.3 Signifikanzanalyse mit SAM

Die SAM-Software analysiert mit einem komplexen Algorithmus aus mehreren genspezifischen t-Tests die Verteilung und die Vertrauensbereiche der Daten (Tusher *et al.*, 2001). Mit diesem Verfahren wurden die 77 Gene statistisch analysiert. Dieses Programm identifizierte 11 Gene mit q-Werten von unter 20% als vertrauenswürdig. Diese 11 Gene stimmten weitgehend mit den Genen überein, die auch im t-Test die höchste Signifikanz (kleinster p-Wert) zeigten (Tabelle 17).

3.1.4 Analyse mit CLUSTER

Mittels des Klassifikationsprogramms CLUSTER wurden die Genexpressionsprofile der 10 Patienten analysiert und graphisch dargestellt. Der Algorithmus dieses Programms ordnet die Gewebeproben entsprechend ihres Genexpressionsprofils in der so genannten "unsupervised" Methode des "hierarchischen Clusterings"¹ mit Hilfe der Pearson-Korrelation. Der Expressionswert eines Gens in einer Probe wurde dabei als Verhältnis der Expression in dieser Probe zu der medianen Expression des Gens in allen Gewebeproben bestimmt. Das Ergebnis der Analyse wurde graphisch mit Hilfe des Programms TREE-VIEW dargestellt. Die Farbintensität codiert die Größe des Expressionsunterschiedes. In dieser Analyse wurden die Daten so gefiltert, dass wenigstens 80% der Daten eines Gens vorhanden sein mussten, um in die Analyse einzugehen. Somit verblieben von den 77 signifikanten Genen aus dem Student's t-Test 66 Gene (Abbildung 7). Das Dendrogramm oberhalb der Analyse zeigt die Ähnlichkeiten der Gewebeproben in Bezug auf ihre Genexpressionsmuster. Vertikale Astlängen des Dendrogramms sind umgekehrt proportional zur Ähnlichkeit der Expressionsprofile. Gene oder Gruppen von Genen mit einem ähnlichen Genexpressionsmuster erschienen benachbart in „Clustern“ (Haufen). Einen solchen Cluster herunterregulierter Gene stellen die Kollagene (6,11,16 und 8) α 2M, Decorin/PGS2 und MLCK dar. Ein Gencluster mit heraufregulierten Genen gruppiert sich um die Cytokeratine 8, 18 und 19. In der Clusteranalyse wurde die Gruppe der Tumore („Tumorarm“) deutlich von der Mucosagruppe („Mucosaarm“) abgegrenzt. Es fand sich eine Ausnahme (Pat. 21). Bei diesem Patienten wurden die Mucosa in den Tumorarm und der Tumor in den Mucosazweig eingeordnet.

¹ Beim „unsupervised Clustering“ werden keine vordefinierten Referenzvektoren verwendet. Hierarchisches Clustering ist ein Verfahren, das zuerst in phylogenetischen (Stammbaum-)Analysen durchgeführt wurde. Ähnlichkeiten zwischen Datenpunkten werden dabei durch einen Stammbaum repräsentiert, wobei die Länge der Äste mit dem Grad der Verwandtschaft bzw. der Gemeinsamkeiten zwischen den Objekten umgekehrt proportional korreliert.

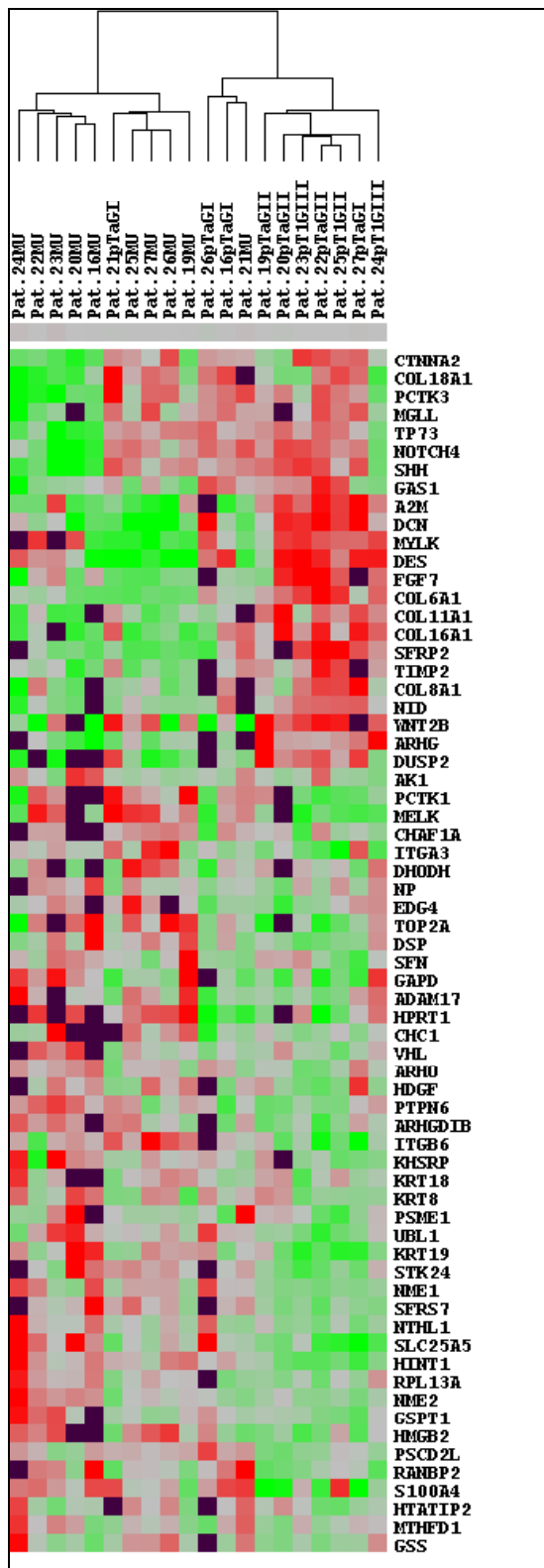


Abbildung 7: Darstellung der differentiellen Genexpression der Tumore (Patienten-Nr.; Histopathologie; R, Rezidiv) und Schleimhäute (MU) von 10 Patienten in der vergleichenden Expressionsanalyse mit den Cluster- und TreeView-Softwares. Die Spalten repräsentieren jeweils eine Gewebeprobe. Die Zeilen stellen jeweils ein Gen dar. Der Expressionswert eines Gens in einer Probe wird durch das entsprechende Farbfeld in dem Schema codiert. Grüne Quadrate entsprechen einem transkriptionellen Niveau oberhalb des Medians, graue Quadrate entsprechen einem transkriptionellen Niveau gleich dem Median, rote Quadrate zeigen ein transkriptionelles Niveau unterhalb des Medians und schwarze Quadrate entsprechen nicht exprimierten Genen. Die Farbintensität codiert die Größe des Unterschiedes relativ zum Median

für jedes Gen. Das Dendrogramm oberhalb der Abbildung zeigt die Ähnlichkeit der Gewebeproben in Bezug auf ihre Genexpressionsmuster— je kürzer die Äste desto größer die Ähnlichkeit. Gene, die in mehreren Proben ähnliche Regulations/Transkriptionsniveaus aufweisen, erscheinen in der Matrix dichter benachbart als solche mit heterogenen Transkriptionsniveaus. Die Daten sind so gefiltert, dass wenigstens 80 % aller Daten vorhanden sein müssen, um in die Analyse einzugehen. Daher verblieben von den 77 signifikanten Genen aus dem Student's t-Test 66 Gene.

Bei strikteren Kriterien für den t-Test ($p \leq 0,0101$) fanden sich die beiden Proben von Patient 21 im Tumorarm des Dendrogramms direkt benachbart in der letzten Verzweigungsebene (Abbildung 8).

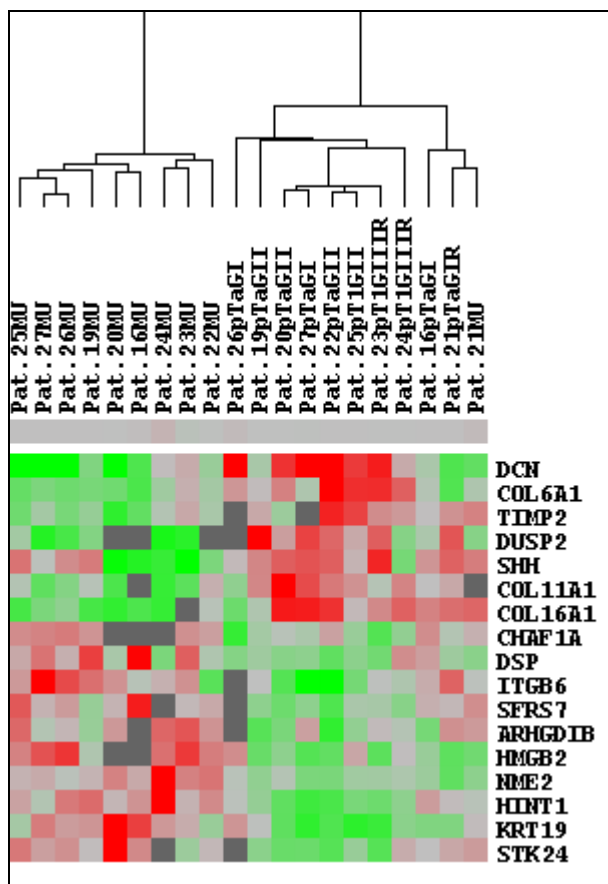


Abbildung 8: Clusteranalyse von 17 Genen mit stringenteren Signifikanzkriterien im t-Test ($p \leq 0,0101$). Nach Filterung auf 80% der Daten verblieben diese 17 Gene. Die Gewebeproben von Pat. 21 kommen dicht nebeneinander zur Darstellung, wurden jedoch beide dem Hauptverzweigungsarm der Tumore im Dendrogramm zugeordnet.

Bei einer Clusteranalyse basierend auf den 11 Genen die in SAM und t-Test übereinstimmend (siehe Abschnitt 3.1.6) gefunden wurden, wurden die Proben von Patient 21 richtig zugeordnet. Nunmehr wurde aber der Tumor von Patient 16 dem Mucosaarm zugeordnet (Abbildung 9). Die Gewebeproben der Patienten 16 und 21 wurden als einzige Proben den „falschen“ Dendrogrammarmen zugeordnet, außerdem zeigten nur sie keine Auffälligkeiten bezüglich der Mikrosatellitenmarker (Tabelle 9).

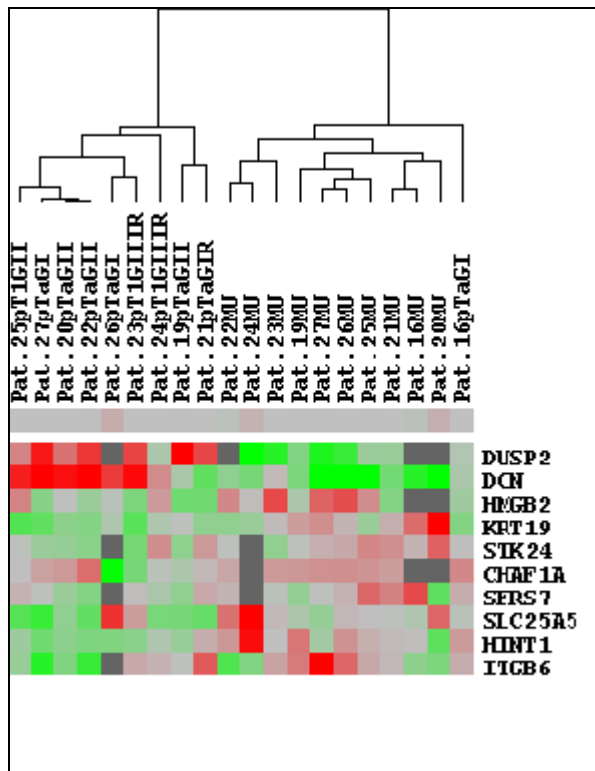


Abbildung 9: Clusteranalyse basierend auf den 11 Genen die in SAM und t-test übereinstimmend signifikant differentiell exprimiert identifiziert wurden. Nach Filterung auf 80% der Daten verblieben diese 10 Gene. Die Gewebeprobe von Pat. 21 wurden beide den jeweils entsprechenden Hauptverzweigungsarmen Tumor und Mucosa im Dendrogramm zugeordnet. Die Tumorprobe von Patient 16 wurde dem Mucosa-Ast zugeordnet.

3.1.5 Abgleich mit Online-Datenbanken

Die im t-Test als differentiell exprimiert postulierten Gene wurden mit den Online-Datenbanken LocusLink¹ UniGene/Sage² und GDB³ daraufhin untersucht, ob bei ihnen ein Zusammenhang mit bisher veröffentlichten Daten zur Genexpression beim Harnblasenkarzinom besteht. Hierbei konnte für 17 von 77 (= 21%) Genen ein entsprechender Eintrag gefunden werden. Hier überwogen vor allem Intermediärfilamente (n=4) und Proteine der Zelloberfläche bzw. des Extrazellulärraumes (n=4) (Tabelle 6). Die verbleibenden 60 Gene, zu denen kein Eintrag bezüglich Harnblasenkarzinom gefunden werden konnte, gehören u.a. zu den Proteinen des Zellzyklus (n=5), der Zelloberfläche bzw. des Extrazellulärraumes (n=8), der Signaltransduktion (n=14) sowie der Apoptose (n=5).

¹ <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/LocusLink/>

² <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/UniGene/>

³ <http://gdbwww.gdb.org>

Symbol	Gen	LocusLink No.	Funktion
<i>DCN</i>	Decorin/PGS2	1634	Zelloberflächen-Antigen
<i>ITGA3</i>	Integrin, alpha 3	3675	Zelladhäsionsrezeptor
<i>HMGB2</i>	High-mobility group box 2	3148	Chromatinprotein
<i>GAPDH</i>	Glyceraldehyde-3-phosphat Dehydrogenase	2597	Kohlenhydratmetabolismus
<i>COL6A1</i>	Kollagen, type VI, alpha 1	1291	Extrazellulärmatrixprotein
<i>NID</i>	Nidogen (enactin)	4811	Extrazellulärmatrixprotein
<i>HDGF</i>	Hepatoma-derived growth factor	3068	Wachstumsfaktoren, Zytokine
<i>TIMP2</i>	Tissue inhibitor of metalloproteinase 2	7077	Proteaseinhibitoren
<i>KRT7</i>	Keratin 7	3855	Intermediärfilamentprotein
<i>KRT19</i>	Keratin 19	3880	Intermediärfilamentprotein
<i>DSM</i>	Desmin	1674	Intermediärfilamentprotein
<i>KRT8</i>	Keratin 8	3856	Intermediärfilamentprotein
<i>PPK3</i>	PCTAIRE protein Kinase 3	5129	intrazelluläre Kinasen
<i>STRF</i>	Stratifin	2810	Kinaseaktivatoren und -inhibitoren
<i>FLA-2</i>	FOS-like antigen 2	2355	Onkogene und Tumorsuppressorgene
<i>SLC25A5</i>	SLC25A5	292	Energiemetabolismus
<i>MGL</i>	Monoglyceridlipase	11343	Lipidmetabolismus

Tabelle 6: Gene, die übereinstimmend einen UniGene-Eintrag für differentielle Expression beim Blasenkarzinom vorwiesen und laut dieser Studie signifikant differentiell exprimiert wurden.

3.1.6 Vergleich und Wertung der statistischen Analysen

Für eine Beurteilung der statistischen Ergebnisse wurden die Parameter und Vertrauensbereiche der Gene, die sowohl im Student's t-Test als auch in der SAM-Analyse als signifikant differentiell exprimiert identifiziert wurden, gegenübergestellt. Für den Student's t-Test galten p-Werte von $p < 0.05$, für die SAM-Analyse q-Werte von $q < 20\%$ als statistisch signifikant. Es fanden sich 11 Gene, die einen p-Wert von 0,00058 bis 0,021 und einen q-Wert von 15,9-17,4% aufwiesen (Tabelle 7).

Gen	p-Wert	q-Wert (%)	Regulation	UniGene ₁	Protein / Funktion
KRT7	0.0006	15.93	↑	ja	Keratin 7/ Intermediärfilamentprotein
DCN	0.0014	15.93	↓ ²	ja	Decorin/ Zelloberflächenproteoglycan
DUSP2	0.0017	15.93	↓	nein	Dual-specificity phosphatase 2/ MAP-Kinasenphosphatase
STK24	0.0028	17.38	↑	nein	Serine-Threonine-Proteinkinase 39/ aktiviert p38 MAP-Kinase
SFRS7	0.006	17.38	↑	nein	Arginine/Serine-rich splicing factor
HINT1	0.0061	15.93	↑	nein	Histidine triad nucleotide binding protein/ ProteinkinaseC-Inhibitor
CHAF1A	0.0065	17.38	↑	nein	Chromatin assembly factor 1, subunit A/ involviert in DNA-Replikation
ITGB6	0.0072	17.38	↑ ²	nein	β-6 integrin/ involviert in Zelladhäsion und TGFβ-Signalweg
KRT19	0.0092	15.93	↑ ²	ja	Keratin 19/Intermediärfilamentprotein
HMGB2	0.0105	15.93	↑	ja	High mobility group box 2/ entwindet ds-DNA
SLC25A5	0.021	17.38	↑	ja	ADP/ATP Translocase 2/ ADP/ATP-Austausch zwischen Cytosol und Mitochondrium

Tabelle 7: Darstellung der 11 Gene mit statistischen Parametern, die übereinstimmend von Student's t-Test (p-Wert) und SAM-Analyse (q-Wert) für signifikant erachtet wurden. Ein Eintrag des Gens in der Online-Datenbank UniGene für Blasenkrebs ist vermerkt.
¹<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/UniGene>. ² Gleichsinnige Veränderung der differentiellen Expression dieses Gens bei Dyrskjot et al. 2003.

Auffallend war eine sehr heterogene individuelle Zahl von differentiell exprimierten Genen. Basierend auf den Schwellenwerten für die Tumor/Mucosa-Relation von <0,5 für Herunterregulation und >2 für Heraufregulation variierte die Zahl der differentiell exprimierten Gene von 33 (Patient 21) bis zu 63 (Patient 23). Die Zahl der im Tumor heraufregulierten Gene rangierte zwischen 18-53 (Durchschnitt 32,6), die Zahl der herunterregulierten Gene von 10-33 (Durchschnitt 18,8). Keines der 77 Gene wurde konsistent in allen Tumoren herauf- oder herunterreguliert. Die Expression von 53 (69%) Genen war divergent, d.h. das jeweils betrachtete Gen wurde in Tumoren sowohl herauf- als auch herunterreguliert. Von den 24 übrigen Genen wurden 17 Gene in acht Tumoren konsistent heraufreguliert und sieben Gene in sieben Tumoren konsistent herunterreguliert. Von diesen 24 nichtdivergent exprimierten Genen wurden minimal fünf und maximal 19 Gene in jedem Tumor differentiell exprimiert. Sechs der 24 Gene waren unter den Genen, die sich aus der SAM-Analyse ergaben.

3.2 Mikrosatellitenanalysen

In dieser Arbeit wurden bei insgesamt 16 Patienten Mikrosatellitenmarker analysiert, darunter die 10 Patienten, bei denen die oben beschriebenen Daten zur Genexpression erhoben wurden. In 11 von 16 Patienten (69 %) wurde mit einem Satz von 10 Markern mindestens eine genetische Aberration nachgewiesen. Die vier Marker mit der höchsten

Detektionsfrequenz sind in Tabelle 8 genannt. In neun von 16 Patienten (56 %) konnte schon mit diesen vier Markern jeweils mindestens eine genetische Aberration detektiert werden. Diese Marker sind auf den Chromosomen 8 und 9 lokalisiert (Tabelle 9).

Mikrosatellitenmarker	Auffälligkeiten absolut	Auffälligkeiten in % vom Gesamtkollektiv(n=16)
D9S747	7	43%
IFNA	5	31%
D9S161	6	37%
NEFL	3	18%

Tabelle 8: Mikrosatellitenmarker mit der höchsten Detektionsrate

Tumore von drei Patienten (Patienten 20, 26, 27) zeigten LoH/AI mit den Markern für den kurzen Arm von Chromosom 9 (IFNA,9p21.3; D9S161,9p21.1). Dies könnte auf einen heterozygoten Verlust von chromosomalen Material in einem Intervall von ca. 6Mb, das von IFNA und D9S161 flankiert wird, hinweisen (Tabelle 9). In diesem Intervall finden sich fünf Gene die auf dem 1.2-Cancer-Array repräsentiert sind. Die Gene codieren für β -Interferon (*IFNB1*), Cyclindependent Kinaseinhibitoren 2A und 2 B (*CDKN2A*, *CDKN2B*), Embryonic lethal abnormal vision-like 2 (*ELAVL2*), sowie endotheliale Tyrosinkinase (*TEK*). Im Mittel waren 1,65 (33%) dieser fünf Gene in Tumoren mit LoH/AI auf Chromosom 9p21 herunterreguliert. Im Tumor von Patient 27 wiesen alle fünf Gene ein mittleres Expressionsniveau von 0,32 ($p=0.012$; Fischer Exakt-Test) auf. Diese Ergebnisse könnten auf eine Korrelation von genomischen Alterationen und veränderter Transkription in *cis* hinweisen (Tabelle 11).

In einem weitergehenden Ansatz wurden daher die chromosomalen Regionen, für die in den Expressionsanalysen eine Nachbarschaft von mehreren herunterregulierten Genen gefunden wurde, anhand von Mikrosatellitenmarkern auf etwaige chromosomale Veränderungen evaluiert. Diese Regionen waren 1p36.3, 12q13.2, 17q25 und 21q22.3. Die genomische DNA der 10 Patienten, von denen Expressionsdaten vorlagen, wurde mit 5 weiteren Mikrosatellitenmarkern (Tabelle 12) untersucht. Mit diesem neuen Ansatz fanden sich in vier (Patienten 19, 23, 24, 25) von 10 Patienten Hinweise für LoH und AI. Es wurde in zwei Patienten (Pat. 24 und 25) LoH/AI festgestellt, die bis dahin mit den ersten 10 Markern unauffällig waren. Die Detektion von LoH/AI deckte sich in drei Patienten (Patienten 19, 24 und 25) mit der Beobachtung einer Herunterregulation in der Genexpression der fraglichen Gene (Tabelle 11). Der Tumor von Patient 23 zeigte auf Chromosom 17q25 für alle verwendeten drei Marker genetische Alterationen. Im Kontrast zu der bei den Patienten 19, 24 und 25 mit LoH/AI assoziierten Herunterregulation von in der Nähe liegenden Genen waren bei Patient 23 die in der Nachbarschaft der typisierten Marker liegenden Gene jedoch im Verhältnis 1 zu 2 bzw. 1 zu 9 heraufreguliert (Tabelle 10, Tabelle 11). Alle anderen Gene ($n=9$) des Arrays zeigten in dieser Lokalisation bei Patient 23 ebenfalls eine signifikante Heraufregulation im Tumor verglichen mit den Genen der übrigen Tumorproben ($p=0,009$;

Fischer Exakt-Test). Die betroffenen Gene sind *EVPL* (epidermal protein envoplakin), *BIRC5* (apoptosis inhibitor survivin), *SOCS3* (cytokine-inducible SH2 protein (STAT-induced STAT inhibitor-3)), *PSCD1* (guanine nucleotide exchange factor cytohesin 1), *TIMP2* (type 2 tissue inhibitor of metalloproteinase), *HGS*(hepatocyte growth factor-regulated tyrosine kinase substrate), *ARHGDI1*(Rho GDP-dissociation inhibitor alpha), *MAFG*(V-maf oncoprotein G) und *FASN* (fatty acid synthase) (Tabelle 11, Tabelle 14). Dies könnten Hinweise auf eine genomische Amplifikation sein, die sich in der PCR wie ein LoH darstellen würde.

Pat.	TNM	Tumorstatus	Mikrosatellitenmarker (STRP) und chromosomale Lokalisation																			Σ					
			D2S164 2q35	D8S133 8p21.3	D8S136 8p21.3	NEFL 8p21.3	D8S137 8p21.2	D9S156 9p22.3	IFNA 9p21.3	D9S161 9p21.2	D9S747 9q31.3	D9S195 9q33.1	D1S468 1p36.3	D12S351 12q13.2	D17S802 17q25	c17tg22 17q25	c17ca24 17q25	c21tg30 21q22.3									
12	pTaGII	kein Rezidiv	ni			LoH		LoH	LoH	ni	LoH	ni	LoH	ni	LoH												5
13	pT1GIII	pT1GIII Rezidiv			ni					ni	LoH			LoH													2
14	pTaGI	pTaGI Rezidiv					ni				ni			ni													0
15	pTaGII	kein Rezidiv						ni		AI				LoH	AI												3
16	E pTaGI	kein Rezidiv																									0
17	pTaGI	pTaGI Rezidiv				AI																					1
18	pTaGII	pT2 GIII Rezidiv				ni				ni	LoH																1
19	E pTaGII	kein Rezidiv					ni							ni	LoH											AI	2
20	E pTaGII	kein Rezidiv									LoH				AI												3
21	E pTaGI	pTaG1 Rezidiv						ni						ni													0
22	E pTaGII	kein Rezidiv					AI							ni	LoH												2
23	E pT1 GIII	pT2GIII Rezidiv																							LoH	LoH	4
24	E pT1 GIII	pT2N2M1 Rezidiv								ni															LoH	AI	1
25	E pT1 GII	kein Rezidiv									ni																1
26	E pTa GI	kein Rezidiv									LoH				LoH												2
27	E pTaGI	kein Rezidiv					ni				LoH				LoH												3
Σ			0	0	0	0	3	0	0	2	5	6	7	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	2	2	1	30

Tabelle 9: Mikrosatellitenanalysen von 16 Patienten mit TNM-Befund und Tumorstatus. LoH, loss of heterozygosity; AI, allelic imbalance; ni, nicht informativ (homozygot); E, Expressionsdaten erhoben. Mikrosatellitenmarker mit Namen und physikalischer Lokalisation.

Locus	Patient																		
	16	19	20	21	22	23	24	25	26	27									
1p36.3	A/L	EXP	A/L	EXP	A/L	EXP	A/L	EXP	A/L	EXP	A/L	EXP	A/L	EXP	A/L	EXP			
	down	up	down	down	down	down	down	down	down	down	down	down	down	down	down	up			
12q21.3-q23			down	down	down	down	down	down	down	down	down	down	down	down	down	down			
	down	down	down	down	down	down	down	down	down	down	down	down	down	down	down	down			
17q25			down	down	down	LoH	up	down	down	down	down	down	down	down	down	down			
	down	down	down	down	down	down	up	down	down	down	down	down	down	down	down	down			
17q25			down	down	down	down	down	down	down	down	down	down	down	down	down	down			
	down	down	down	down	down	down	down	down	down	down	down	down	down	down	down	down			
21q22.3			down	down	down	down	down	down	down	down	down	down	down	down	down	down			
	down	AI	down	down	down	down	down	down	down	down	down	down	down	down	down	down			

Tabelle 10: Korrelation von genetischer Alteration und Genexpression. A/L, genetische Alteration; LoH, loss of heterozygosity; AI, allelic imbalance; EXP, Regulation der Genexpression, up/down: Herauf- Herunterregulation eines nicht spezifizierten Gens in der angegebenen Lokalisation.

Gen	Patient													Summe up / down / = ¹
	16	19	20	21	22	23	24	25	26	27				
EVPL	0.59	0.61	2.6	0.78	0.78	8.8	0.26	0.78	1.83	0.04				2 / 2 / 6
BIRC5	0.33	6.0	-	0.12	0.65	9.1	0.16	3.0	0.58	0.33				3 / 4 / 1
SOCS3	2.7	2.6	1.1	1.2	1.7	4.5	48.3	0.49	0.7	0.45				3 / 2 / 5
PSCD1	0.41	1.5	-	0.80	1.4	10.3	0.83	1.7	1.23	0.79				1 / 1 / 6
TIMP2	0.49	0.53	0.35	0.94	0.21	2.1	0.84	0.09	0.002	0.03				1 / 7 / 2
HGS	0.44	0.93	0.23	2.1	0.43	2.5	4.1	0.82	1.7	1.3				3 / 3 / 4
ARHGDI1	14.5	1.1	11.4	1.2	6.3	8.2	0.29	1.5	0.17	1.2				3 / 2 / 5
MAFG	4.7	3.5	0.16	0.59	1.02	5.0	0.11	0.73	2.7	4.9				5 / 2 / 3
FASN	0.36	1.1	3.3	3.2	4.1	7.5	209.5	1.7	0.63	3.3				6 / 0 / 3
Summe up / down / = ¹	3 / 5 / 1	3 / 0 / 6	3 / 3 / 1	2 / 1 / 6	2 / 2 / 5	9 / 0 / 0 ²	3 / 4 / 2	1 / 2 / 6	1 / 2 / 6	2 / 4 / 3				

Tabelle 11: Niveau der tumorassoziierten differentiellen Expression auf Chromosom 17q25. ¹Modus der Genregulation in Tumoren: Up, Hochregulation; down, Herunterregulation; =, nicht differentiell exprimiert; Grenzwerte sind 2.0 für „up“ und 0.5 für „down“; ²Die Zahl der hochregulierten Gene war für Patient 23 signifikant höher (n = 9) verglichen mit dem Maximalwert (n = 3), der in den Tumoren der übrigen Patienten beobachtet wurde (p = 0,009) ; - fehlende Daten.

4 Diskussion

Zielsetzung war die Identifikation differentiell exprimierter Gene und die Korrelation von Genexpressionsdaten mit Befunden zu genetischen Alterationen (Mikrosatellitenanalysen) in oberflächlichen Harnblasenkarzinomen sowie die Erfassung möglicher konsistenter Expressionssignaturen bei histopathologisch ähnlichen Tumoren. Der benutzte Array enthielt 1176 bekannte tumorassoziierte Gene, was ca. 3 % der Gene des humanen Genoms umfasst. Es wurden 16 Mikrosatellitenmarker verwendet.

4.1 Zusammenfassung der ermittelten Genexpressionsdaten

Der t-Test (p -Wert $<0,05$) ergab 77 statistisch signifikant differentiell exprimierte Gene. Aus der SAM-Analyse der 77 Gene gingen nur 11 Gene hervor, die überwiegend zur Gruppe mit der höchsten Signifikanz im t-Test gehörten. Dies sind Gene für DCN, ITGB6, KRT7, KRT19, HINT1, STK24, DUSP2, HMGB2, SFRS7, SLC25A5 und CHAF1A. In der SAM-Analyse wurde ein hoher q -Wert ($q < 20$ d.h. schwache Stringenz) verwendet, was auf eine hohe molekulare Heterogenität der Tumore schließen lässt. Sowohl in der Clusteranalyse von 77 Genen aus dem t-Test, als auch in der Clusteranalyse basierend auf den 11 Genen (aus t-Test und SAM) wurden die Tumore und die Schleimhäute weitgehend in die entsprechenden Arme der Dendrogramme eingeordnet.

Diese Daten sind anhand von statistischer Mittelung gewonnen, was bedeutet, dass nicht alle 11 Gene in allen Proben immer gleichsinnig differentiell exprimiert sind. Es wurde eine sehr heterogene individuelle Zahl von differentiell exprimierten Genen gefunden. Keines der 77 Gene wurde konsistent in allen Tumoren herauf- oder herunterreguliert. Nur 24 Gene wurden nicht-divergierend exprimiert. Diese Daten sind Hinweise darauf, dass verschiedene alternative molekulare Ereignisse in der Karzinogenese zu histopathologisch ähnlichen Tumoren führen können.

4.2 Bestätigte Expressionsdaten

Unter den 11 in dieser Studie gefundenen differentiell exprimierten Genen sind nur drei Gene, für die bisher in Expressionsstudien von oberflächlichen Harnblasenkarzinomen der gleiche Expressionsmodus gefunden wurde (Dyrskjot et al., 2003). Dies sind die Gene für Decorin (*DCN*), Integrin- $\beta 6$ (*ITGB6*) und Cytokeratin 19 (*KRT19*).

Nach den dieser Arbeit zugrunde liegenden Daten wurde Decorin (*DCN*) im Tumor auf einem geringeren Niveau im Vergleich zur Mucosa exprimiert. Zu den Proteoglycanen gehörend, spielt es eine wichtige Rolle sowohl für die Aufrechterhaltung der Zellform und der mechanischen Widerstandsfähigkeit des Gewebes als auch in Signaltransduktionskaskaden (Kresse und Schonherr, 2001). Decorindefiziente Knock-out-Tiere wiesen erhöhte

Tumorraten auf (Iozzo *et al.*, 1999). Durch p16 in einer Pankreaskarzinomzelllinie induzierte Apoptose war mit einer heraufregulierten Expression von *DCN* assoziiert (Blasco *et al.*, 2004). Auch in der vorliegenden Arbeit wurde für Decorin im Tumor eine ca. 85 % kleinere Signalstärke im Vergleich zur Mucosa gemessen. Diese Daten bestätigen die Angaben von Dyrskjot und Mitarbeitern sowie das erwähnte allgemeine Konzept der tumorprotektiven Funktion von *DCN*. Das transmembranäre Zelladhäsionsglycoprotein Integrin- β 6 ist unmittelbar in Karzinogenese involviert und wird in soliden Tumoren wie Lungen- und Darmtumoren auf hohem Niveau exprimiert (Niu *et al.*, 2002). Die vorliegenden Daten eines 3,5-fachen Anstiegs der Signalstärken in Tumoren bestätigten dies.

Die Cytokeratinfamilie umfasst 20 Mitglieder. Die Cytokeratine sind Intermediärfilamente und die Hauptkomponenten des Zytoskeletts. Sie erhalten die zelluläre Struktur und interagieren mit zellkonnektiven Strukturen, wie Desmosomen und Cadherin (Kausch und Bohle, 2001; Liebert *et al.*, 1999). Für Cytokeratin 19 ist die Persistenz seiner Expression bei Blasenkrebs beschrieben (Moll *et al.*, 1988). Sein Fragment im Urin (CYFRA 21-1) wird für die Detektion von Blasenkrebs verwendet (Sanchez-Carbayo *et al.*, 1999). Die vorliegenden Daten zeigen für Cytokeratin 19 einen 3,5-fachen Anstieg der Expressionsrate in Tumoren.

4.3 Neue Kandidatengene

Im Kontext von t-Test, SAM und Clusteranalyse wurden folgende 8 noch nicht zuvor im Zusammenhang mit TCC beschriebenen Gene als differentiell exprimiert interpretiert: *KRT7*, *DUSP2*, *SFRS7*, *CHAF1A*, *HMGB2*, *SLC25A5*, *HINT1* und *STK24*.

Cytokeratin 7 (*KRT7*) zeigte in Tumoren eine 2,8-fache Heraufregulation. Cytokeratine (CK) gehören zur Gruppe der Intermediärfilamente und sind die typischen strukturellen Bestandteile des Zytoskeletts normaler und maligner Epithelzellen. Sie wirken mit bei dem Erhalt der Zellstruktur und bei der Interaktion mit Nachbarzellen. Eine Korrelation von Cytokeratin 7 und Blasenkrebs wurde in Tiermodellen (Hund) beschrieben (Ramos-Vara *et al.*, 2003). Es ergaben sich Hinweise auf einen Zusammenhang mit urothelialen Karzinomen (Baars *et al.*, 1994; Bassily *et al.*, 2000; Fernandez-Flores *et al.*, 2003; Jiang *et al.*, 2001). Die Befunde zu Cytokeratin 19 wurden oben dargestellt. Andere Cytokeratine mit bekannter Assoziation zu Blasentumoren sind: CK 5, 8, 13 und 18.

DUSP2 gehört zu den Dual-Specificity-Phosphatasen, die mit der p53-Signalkaskade interagieren. *DUSP2* ist umgekehrt auch ein transkriptionelles Ziel von p53. Reduzierte Expression von *DUSP2* inhibiert die p53-induzierte Apoptose, während die Überexpression von *DUSP2* die Apoptoseeigung verstärkt und die Tumorbildung unterdrückt (Yin *et al.*, 2003). *DUSP2* und *STK24* sind Mitglieder der RAS/MAPK- Signaltransduktionskaskade. Die Signalübertragung im RAS/MAPK-Reaktionsweg führt u.a. nach der Bindung von Liganden an Rezeptortyrosinkinasen zur Aktivierung von RAS, woraus die Aktivierung verschiedener Tyrosin- oder Serin-Threoninkinasen (MAP-Kinasen MAPK = mitogenaktivierte Protein-

Kinasen) resultiert, die unter anderem die Expression von Transkriptionsfaktoren wie *JUN* und *FOS* induzieren. Dies hat weitreichenden Einfluss auf Proliferation und Differenzierung (Johnston *et al.*, 2000). Für *DUSP2* wurde hier eine 3,4-fache Herunterregulation gemessen. *HINT1* (histidine triad nucleotide binding protein) gehört zu der hochkonservierten HIT- (histidine triad) Familie und kann als Homodimer auftreten. (Lima *et al.*, 1996) Es ist als Kinaseregulatorprotein an Signaltransduktionskaskaden beteiligt, besitzt Homologien zu Tumorsuppressorgenen und ist in der SCLC-Zelllinie NCI-H522 heraufreguliert, wenn diese dem demethylierenden Agens 5-aza-2'-deoxycytidine (5-aza-dC) ausgesetzt wird (Yuan *et al.*, 2004). In dieser Arbeit wurde eine Heraufregulation im Tumor gefunden, die mit den zuvor beschriebenen Beobachtungen einer reduzierten Tumorigenität von 5-aza-dC-behandelten Zellen nicht in Einklang gebracht werden kann (Su *et al.*, 2003).

STK24 ist Teil der hochkonservierten STE-20-Proteinkinasefamilie. Sein Genprodukt MST3 kann den p38-Signaltransduktionsweg aktivieren und induziert Apoptose bei einer Aktivierung durch Caspase 8 (Huang *et al.*, 2002). Caspase 8 wurde in der vorliegenden Studie jedoch nicht differentiell exprimiert.

Das high-mobility-group Protein 2 (*HMGB2*) hat ein hohes, aber unspezifisches DNA-Bindungspotential, insbesondere für lineare ssDNA und kann dsDNA entwinden. Es fungiert als Strukturprotein in Nukleoproteinkomplexen, zum Beispiel bei V(D)J-Rekombination, der Initiation der Transkription und bei der DNA-Reparatur (Thomas, 2001). Es wurde in stromalen Tumoren des Gastrointestinaltraktes beschrieben (Koon *et al.*, 2004). Weiterhin ist es in die Regulation der transkriptionellen Aktivität der p53-Familie involviert und könnte das pro-apoptotische *BAX*-Gen herunterregulieren (Stros *et al.*, 2002). Eine Überexpression von *HMGB2* (2,5-fach heraufreguliert) könnte daher anti-apoptotisch wirken.

Der Splicing Faktor 7 (*SFRS7*) ist im Enzymnetzwerk des prä-mRNA-Spleißweges integriert (Cavaloc *et al.*, 1994). Es wurde eine Heraufregulation in Assoziation mit der Resistenz gegenüber CpG-Oligodesoxynukleotid-5mer-, Caspase-3- und p53-unabhängiger Apoptose in MOLT-4-Leukämiezellen beschrieben (Tidd *et al.*, 2003). In dieser Arbeit ist *SFRS7* um mittel 1,9-fach heraufreguliert, was einen Hinweis auf eine anti-apoptotische Wirkungsweise sein könnte.

SLC25A5 kodiert den mitochondrialen ADP/ATP-Carrier ANT2 (De Marcos Lousa *et al.*, 2002) und ist in den untersuchten Tumoren 3-fach heraufreguliert. Es wird bei Teilungsstimuli aktiviert und ist in teilungsarretierten Zellen reprimiert. Bcl-2 und Bax regulieren die Aktivität von ANT2 und interagieren miteinander bei der Regulation von Apoptose und Stoffwechsel. Überexprimiertes ANT2 könnte daher anti-apoptotisch durch die Blockade von Bax wirken und ist somit ein potentielles chemotherapeutisches Ziel (Belzacq und Brenner, 2003; Belzacq *et al.*, 2003; Luciakova *et al.*, 2003).

CHAF1A kodiert eine Untereinheit (p150) des Assembly-Faktor I (CAFI) für Histonoktamere und andere Chromatinkomponenten (Kaufman *et al.*, 1995). Mammakarzinomzellen sind immunhistochemisch positiv für CAFI und die Ausprägungstärke dieses Merkmals ist direkt mit Tumorgröße, -grad, -proliferationsindex und -ploidität korreliert (Polo *et al.*, 2004). Die ermittelte 4,1-fache Heraufregulation lässt *CHAF1A* als möglichen Marker zur Erkennung von präkanzerösen Zellen in makroskopisch unauffälliger Blasenschleimhaut denkbar erscheinen.

Kollagene sind generell am Aufbau der extrazellulären Matrix (ECM) beteiligt und weisen eine verminderte Genexpression in der Tumorgruppe auf. Im Verlauf der Karzinogenese migrieren Tumorzellen durch die extrazelluläre Matrix und bauen sie ab. Eine verminderte Expression der genannten Gene erleichtert den malignen Zellen das Verlassen des Gewebeverbandes. Hiermit ist eine Grundbedingung für Invasion und Metastasierung erfüllt. Die hier als konsistent in der Clusteranalyse im Tumor herunterreguliert gefundenen Kollagene 6,11 und 16 wurden bis jetzt nicht als mit TCC assoziiert beschrieben, wohl aber andere Kollagene wie Typ 4, 5,15 und 18, die ebenfalls als herunterreguliert beschrieben wurden (Dyrskjot *et al.*, 2003).

Zusammenfassend untermauern statistische Belege (t-Test und SAM) und theoretische, experimentelle sowie klinische Daten für 9 der 11 Gene die in dieser Arbeit postulierte differentielle Expression. Dies spricht für eine Validität der Expressionsstudien, so dass auf Verifikationsexperimente mit alternativen Methoden, wie quantitativer RT-PCR oder Northern Blot verzichtet werden kann. Interessanterweise sind 5 der 11 differentiell exprimierten Gene (*DCN*, *DUSP2*, *SFRS7*, *SLC25A5*, *HMGB2*) in den Apoptoseprozess involviert.

4.4 Korrelation von Expressionsdaten und Mikrosatellitenanalysen

Es ist offensichtlich geworden, dass Tumore gleicher Histopathologie auf molekularer Ebene sehr heterogen sein können. Andererseits konnte in der Clusteranalyse ein überraschend hohes Maß an richtiger Zuordnung zu dem jeweiligen Hauptast (Tumor- bzw. Mucosaast) des Dendrogramms gefunden werden, was wiederum für eine hohe Vertrauenswürdigkeit der Daten sprechen könnte.

In dieser Arbeit wurden bei 16 Patienten, darunter die 10 Patienten, bei denen die hier beschriebenen Daten zur Genexpression erhoben wurden, Mikrosatellitenmarker analysiert. Mit einem Satz von 10 Markern (die in einer vorherigen Studie evaluiert wurden (Kommerau, nicht veröffentlichte Daten)) konnten in 69% der Fälle genetische Aberrationen festgestellt werden. Diese Marker sind vor allem auf den Chromosomen 8 und 9 lokalisiert. Dies entspricht nicht ganz den Daten früherer Studien in denen 77-81% der Patienten unter Verwendung eines Satzes von 17 Mikrosatellitenmarkern chromosomale Auffälligkeiten zeigten (Schneider *et al.*, 2000; Utting *et al.*, 2002).

Die Expressionsanalysen ergaben zunächst keine Indizien für mit den Markerdaten korrelierte Herunterregulationen benachbarter Gene auf den Chromosomen 8 und 9. In der Region 9p21 fanden sich jedoch signifikante Herunterregulationen von Genen, die von STRPs mit LoH/AI flankiert wurden. Homozygote Deletionen in Teilen von Chromosom 9p21 wurden in ca. 22% der Blasen Tumore gefunden (Veltman et al., 2003). Die Expressionsstudien lieferten auch Hinweise für gemeinsame Herunterregulation von physikalisch benachbarten Genen in 1p36.3, 12q13.2, 17q25 und 21q22.3.

Der in dieser Arbeit verfolgte Ansatz, Genexpressionsdaten mit den Daten von Mikrosatellitenanalysen zu korrelieren, wurde mit 6 zusätzlichen Markern näher untersucht. Bei 4 Patienten konnten insgesamt 6 genetische Alterationen gefunden werden. Dabei zeigte sich bei 2 Patienten (Patient 25 und 24), die in den zuerst verwendeten 10 Markern keine Auffälligkeiten zeigten, jeweils eine zusätzliche genetische Aberration, was die Detektionsrate von 60 auf 80 % erhöhte. Bei 3 Patienten (19, 24 und 25) korrelierten die genetischen Alterationen mit einer Herunterregulation der betroffenen Gene.

In den Clusteranalysen fielen die Gewebeproben von Patient 21 und 16 deutlich durch die Einreihung in die jeweils „falschen“ Arme des Dendrogramms auf. Interessanterweise waren dies die einzigen Tumorseiten, in denen keine DNA-Alterationen gefunden wurden. Diese beiden Tumore wären in einer alleinigen Clusteranalyse der Expression und in einer alleinigen Mikrosatellitenanalyse nicht als Tumore identifiziert worden. Legt man der Clusteranalyse nur die 17 Gene mit $p \leq 0,0101$ zugrunde, verändert sich das Ergebnis dahingehend, dass beide Gewebeproben von Patient 21 sehr ähnliche Genexpressionsmuster aufweisen und dicht beieinander im „Tumorarm“ des Dendrogramms angeordnet werden. Die Tumore zeigten mit Ausnahme von Pat. 23 bei der Mehrzahl der auf dem Array repräsentierten Gene auf Chromosom 17q25 keine Hochregulation oder gar eine Herunterregulation der Genexpression.

Bei Patient 23 wurden mit allen 3 Markern auf Chromosom 17 genetische Alterationen detektiert. Im Kontrast zu den übrigen Patienten waren die hier lokalisierten und untersuchten Gene jedoch deutlich 2-10-fach heraufreguliert (Tabelle 10 und Tabelle 11). Im Gegensatz zur Hypothese einer mit LoH/AI direkt korrelierten Herunterregulation in *cis* könnte dies auch für tumorassoziierte expressionsmodifizierende Faktoren in *trans* und/oder für eine genomische Amplifikation sprechen. Eine monoallelische Amplifikation könnte auch einen LoH in der PCR vortäuschen, was die LoH-Befunde bei Pat.23 erklären würde.

Unterstützt wird diese Hypothese durch Untersuchungen an Cyclin E, bei denen erstmals eine Genamplifikation mit einem LoH korreliert werden konnte (Cassia et al., 2003). Zudem wurde kürzlich eine Korrelation von LoH und einer Überexpression von mutierten K-ras-Onkogenen in nichtkleinzelligen Lungentumoren (NSCLC) beschrieben (Uchiyama et al., 2003). In Blasen Tumoren des Stadiums pTa/pT1 wurden in 30%, im Stadium pT3-4 in 70%

Genamplifikationen gefunden jedoch nicht in 17q25 (Veltman et al., 2003). Eines der bei Patient 17 heraufregulierten Gene, TIMP2, dem lange eine tumorprotektive Wirkung zugesprochen worden ist, hat möglicherweise in Prostatakarzinomen eine Rolle als Tumorpromotor (Ross et al., 2003). Die Herunterregulation in der Mehrzahl der untersuchten Tumore und die 2-fache Heraufregulation bei Patient 23 (mit der mutmaßlichen monoallelischen Amplifikation für die Region 17q25) könnten daher Indiz für unterschiedliche tumorassoziierte molekulare Mechanismen sein.

Prominenter war der Befund einer 9-fachen Heraufregulation bei BIRC5/Survivin in diesem Tumor (Tabelle 11). Es wird besonders in der G2/M-Phase des Zellzyklus exprimiert und könnte einer fehlerhaften Induktion der Apoptose in der G2/M-Phase entgegenwirken (Li et al., 1998). Weiterhin reprimiert p53 die BIRC5/Survivin-Expression auf mRNA- und Proteinebene und die Überexpression von exogenem Survivin schützt Zellen vor p53-induzierter Apoptose (Mirza et al., 2002). Erhöhte Werte von Survivin sind mit Neuauftreten oder Rezidivieren eines TCC assoziiert (Smith et al., 2001). Tatsächlich erlitt Patient 23 ein Tumorrezidiv. Dieses Rezidiv könnte für eine mikroskopisch und histopathologisch nicht identifizierbare „prämaligne“ Veränderung in der Mucosa sowie für biologische Differenzen bei ähnlicher Histopathologie der Tumore sprechen.

Die vorgestellten Daten könnten auf eine insuffiziente Auswahl der molekularen Marker, methodisch-interpretatorische Grenzen der Clusteranalyse oder aber auch auf eine molekulare Diversität von TCC hinweisen, was zur Entwicklung alternativer Strategien bei der Klassifikation von Tumoren zwingen würde.

In allen Tumoren waren tumorigene Expressionsmuster in wenigstens 3 von 10 Genen, die in die Apoptose verwickelt sind, zu finden. So fanden sich ein oder mehrere herunterregulierte pro-apoptotische (*DCN*, *DUSP2*, *TP73*, und *FOSL2*) bzw. heraufregulierte anti-apoptotische (*SLC25A5*, *HMGB2*, *EDG4*, und *BIRC5*) Gene (Tabelle 16). Sieben dieser Gene gehörten zu den 24 Genen, die in Tumoren nicht-divergent exprimiert waren.

Überdies zeigte jeder Tumor offensichtlich ein tumorsupprimierendes Expressionsmuster von herunterregulierten anti-apoptotischen (*PCTK3* und *FGF7*) und/oder heraufregulierten pro-apoptotischen Genen (*VHL*, *NF2* und *NME1*). *VHL*, das beim von Hippel-Lindau-Tumorsyndrom mutiert und dominant vererbt wird, und *NF2*, das Gen, das bei Neurofibromatose II mutiert, fungieren als rezessive Tumorsuppressorgene. Fraglich bleibt, ob eine Heraufregulation einen tumorprotektiven Effekt bei TCC hat. Die Expression von *NME1* wurde als korreliert mit Tumorgröße und –staging beschrieben (Chow et al., 2000). In Anbetracht des Tumorkollektivs bestehend aus oberflächlichen nichtinvasiven Tumoren der Stadien pTa/pT1, entspricht die für *NME1* (metastasierungsinhibierender Faktor NM23) gefundene Heraufregulation den Erwartungen. Die Daten sprechen für eine Dysregulation der Apoptose in TCC, was sich in unterschiedlichen Expressionsmustern tumoraktivierender

und –inhibierender Gene, die in dem komplexen Vorgang der Apoptose interagieren, äußert. Möglicherweise könnten diese Marker ein geeignetes diagnostisch-prognostisches Werkzeug im klinischen Management von TCC sein.

4.5 Kritikpunkte und Zuverlässigkeit der Daten

Unerwarteterweise fanden sich keine Gene, die in allen Tumoren den gleichen Expressionsmodus hatten. Es zeigte sich jedoch, dass alle Tumore bezüglich der Apoptosegene gleichartige Regulationsmuster aufwiesen, was auf unterschiedliche molekulare Signaturen bei klinisch ähnlichen Tumoren hinweist.

Die Befunde bei Patient 23 widersprechen der Ausgangshypothese, wonach ein Verlust eines Allels zu einer Verminderung der Genexpression führen sollte. Mit der erwähnten möglichen monoallelischen Amplifikation kann der Befund jedoch hinreichend erklärt werden. Möglicherweise sind die Ursachen für die vordergründig uneinheitlichen Ergebnisse in einem zu kleinen Satz an verwendeten Markern zu sehen. Das Screeningraster, mit dem chromosomale Veränderungen gesucht wurden, könnte daher zu weitmaschig gewesen sein.

Andererseits könnten die beobachteten herunterregulierenden Effekte aber auch völlig anderer Genese als dem hier postulierten Verlust oder der Amplifikation eines Allels unterliegen. Hier kommen eine Vielzahl von Faktoren, die in *trans* wirken, in Frage. So könnte eine Punktmutation in einem regulierenden Element (z.B. Promotor, Enhancer und andere upstream regulierende Elemente) zu einer Dysregulation der Expression einer chromosomalen Region führen, ohne dass diese selber physisch von Deletionen betroffen wäre. Anzunehmen sind auch massive Sekundäreffekte, die die Expression beeinflussen können. Die Expressionsveränderung eines zentralen Elementes, z.B. eines Rezeptors, einer Signaltransduktionskinase oder aber eines Transkriptionsfaktors, kann weitreichende Folgen auf die Expression von Genen haben, die selber nicht durch Mutationen oder größere Alterationen affiziert sind.

Die Signifikanzgrenzwerte p und q für den t-Test bzw. für die SAM-Analyse sind in dieser Studie mit relativ schwacher Stringenz gewählt worden. Dieses Vorgehen ist in Studien mit der Arraytechnologie zur gängigen Praxis geworden. Ein heterogenes Biomaterial, wie die hier verwendeten Biopsien von Patienten, erfordert aber hier wohl eine größere Toleranz als dies z.B. der Fall bei Untersuchungen an Material aus Zelllinien wäre.

Keines der in den Expressionsstudien dieser Arbeit verwendeten statistischen Verfahren und Analyseprogramme ist optimal geeignet, um der Realität entsprechende Aussagen zu treffen. Diese Programme sind aber sicherlich geeignet, um Tendenzen zu analysieren. Der Realität entsprechende Einzelbefunde können jedoch unerwünschterweise durch die Mittelungsverfahren verwischt werden, wie auch gewünschterweise zufällige oder falsche Daten.

In dieser Arbeit wurden Expressionsdaten von 10 Patienten erhoben. Für definitive Aussagen zu Genexpressionsmustern oder zur Wirkung in Regulationskaskaden ist diese Anzahl sicherlich nicht ausreichend. Die in dieser Arbeit verwendete radioaktive Markierung ist weitaus sensitiver, als die in anderen Studien verwendeten fluoreszenzbasierten Methoden, was möglicherweise zum Auffinden zusätzlicher differentiell exprimierter Gene geführt hat, gleichwohl in den genannten Studien eine wesentlich größere Zahl (aufgrund größerer Arrays) an Genen untersucht worden ist. Bislang wurde noch keine arraybasierte Expressionsstudie an oberflächlichen Harnblasenkarzinomen mithilfe von radioaktiver Markierung durchgeführt. Dass einige Expressionsdaten anderer Arbeitsgruppen bestätigt wurden, könnte als Indiz für die Zuverlässigkeit der Daten herangezogen werden.

Grundlegend für die Datenverlässlichkeit ist die Qualität des Arrays. Unterschiedliche Hybridisierungskinetiken der einzelnen gespotteten cDNAs etwa könnten die Daten extrem verfälschen, daher ist die Transparenz und Qualitätskontrolle bei dem Entwurf und der Herstellung von Arrays von entscheidender Bedeutung. Die Clontech Atlas-Arrays sind aufgrund der Nachvollziehbarkeit der zugrundeliegenden Sequenzdaten geeignet gewesen in dieser Studie verwendet zu werden. Die Arrayanalytik selber impliziert sehr viele Einzelfaktoren, die eine Replikation oder gar eine Übertragbarkeit der Daten aus unterschiedlichen Studien mit verschiedenen Produkten stark erschweren und sogar unmöglich machen können (Hersteller, cDNA-Qualität, cDNA-Quelle, Spotting- und letztlich Hybridisierungsbedingungen). Der Versuch Standards einzuführen, ist gleichermaßen dringend geboten wie schwierig. Brazma und Mitarbeiter haben erste Schritte dahingehend unternommen (Brazma et al., 2001). Regulationsveränderungen in so zentralen zellulären Einrichtungen wie Signaltransduktion können vielseitige Folgen und Sekundäreffekte nach sich ziehen. Eine Trennung von Primäreffekten von solchen Sekundäreffekten ist auch mit der Arraytechnologie nicht detektierbar, was ein weiterer Grund für die vordergründig widersprüchlichen Ergebnisse der hier vorgestellten Mikrosatellitenanalysen sein könnte.

4.6 Ausblick

Die Zukunft der Arraytechnologie dürfte weiterhin in der Verwendung als primäres Screeningverfahren für die Detektion differentieller Expression von Genen in Zellen und Geweben aller Art liegen. Die Arraytechnologie kann diese Kandidaten zur Diskussion stellen. Diese Gene stellen potentielle Ziele für spezifische Zytostatika (drug design) oder genterapeutische Ansätze dar. Die so identifizierten Gene und ihre jeweiligen Expressionslevel könnten mit anderen Methoden wie Northern Blot und realtime RT-PCR auf RNA-Ebene oder Immunhistochemie und Western-Blot auf Proteinebene reevaluiert werden. Dies ist bis vor kurzem Standardforderung bei Arraystudien gewesen. Diese Techniken ändern an der Tendenzaussage zur Expression eines Gens jedoch nichts Grundsätzliches,

sondern replizieren die Daten nur (Sanchez-Carbayo et al., 2003). Dies ist mit vertretbarem Aufwand jedoch nur für einige wenige Gene durchführbar.

Als Konsequenz für die Klinik könnten prognostische Arrays („Genchips“) zur Alltagstauglichkeit weiterentwickelt werden, die wenige solcher Kandidatengene (z.B. 100) enthalten. Deren Wert in prädiktiver, prognostischer, diagnostischer und therapeutischer Hinsicht müsste dann in großen klinischen Studien evaluiert werden. Eine Automatisierung der Verfahren, etwa mit Fluoreszenzmarkierungen wird die Kosten und den Zeitaufwand langfristig senken und damit eine schnelle Einführung in den klinischen Alltag ermöglichen.

5 Zusammenfassung

Das Harnblasenkarzinom der Stadien pTa und pT1 zeichnet sich durch eine charakteristisch hohe Rezidivquote von bis zu 70% und einen Mangel an verlässlichen prognostisch-prädiktiven Labormarkern aus. Daher wurden in dieser Arbeit die differentielle Genexpression und genetische Aberrationen von 10 Patienten, die sich einer transurethralen Resektion eines solchen Tumors unterziehen mussten, untersucht. Die Analysen wurden im direkten Vergleich von Tumor versus makroskopisch unauffälliger Blasenmucosa jeweils eines Individuums vorgenommen. Die Untersuchung der Genexpression erfolgte mit cDNA-Mikroarrays, auf denen die cDNA von 1176 tumorassoziierten Genen aufgetragen ist. Durch Reverse Transkription wurde radioaktive cDNA aus der total-RNA der Gewebe synthetisiert und mit den Arrays hybridisiert. Die Daten wurden hinsichtlich der up/down-Regulation der Expression der verschiedenen Gene und deren biologischer Funktion analysiert und interpretiert. Mit Hilfe der Signifikanzanalysen mit t-Test und der SAM-Software konnten für 11 Gene signifikant differentielle Expressionsmuster identifiziert werden. Dies waren die Gene für DCN, ITGB6, KRT7, KRT19, HINT1, STK24, DUSP2, HMGB2, SFRS7, SLC25A5 und CHAF1A. Die Expressionsstudien lieferten Hinweise für gemeinsame Herunterregulation von physikalisch benachbarten Genen in den Lokalisationen 1p36.3, 12q13.2, 17q25 und 21q22.3. Mikrosatellitenanalysen dienen der indirekten Detektion chromosomaler Abberationen an Hand LoH, einem häufigen Phänomen in Tumoren. Mit einem Satz von 10 Mikrosatellitenmarkern, hauptsächlich auf den Chromosomen 8 und 9 lokalisiert, gelang in 69 % der Fälle der Nachweis mindestens einer genetischen Alteration. Tumore von drei Patienten zeigten LoH/AI mit den Marker für den kurzen Arm von Chromosom 9. Dies könnte auf einen heterozygoten Verlust von chromosomalen Material in einem Intervall von ca. 6Mb hinweisen. In einem weiterführenden Ansatz wurde die Korrelation der Daten aus den Genexpressionsanalysen und den Mikrosatellitenanalysen untersucht. Für die detailliert untersuchten Lokalisationen 1p36.3, 12q13.2, 17q25 und 21q22.3 wurden in drei von 10 Patienten Mikrosatellitenalterationen gefunden. Für das untersuchte Intervall in Region 17q25 wurde trotz 9-facher Heraufregulation ein LoH detektiert. Ursachen für diese Ergebnisse können Sekundäreffekte aber auch monoallelische Amplifikationen sein. Unerwarteterweise fanden sich keine Gene, die in allen Tumoren den gleichen Expressionsmodus hatten, was auf individuell unterschiedliche molekulare Signaturen bei klinisch und histopathologisch verwandten Tumoren hinweist. Es zeigte sich jedoch, dass alle Tumore bezüglich der Apoptosegene gleichartige Regulationsmuster aufwiesen. Diese Erkenntnisse könnten im klinischen Management von Blasenkrebs wertvoll sein.

6 Anhang

6.1 Material

Verbrauchsmaterial und Chemikalien

Desoxynukleosidtriphosphat-Set	Roche, Mannheim
Diethylprocarbonate (DEPC)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Ethanol, Isopropanol	Merck Eurolab, Darmstadt
ExpressHyb Solution	Clontech, Heidelberg
Formamid, deionisiert	Gibco BRL, Life Technologies, Eggenstein
Kaliumchlorid (KCl)	Merck Eurolab, Darmstadt
Kaliumhydrogenphosphat (K ₂ HPO ₄)	Merck Eurolab, Darmstadt
Molecular Weight Marker 100bp ladder	Gibco BRL, Life Technologies, Eggenstein
Natriumchlorid (NaCl)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Natriumdihydrogenphosphatdihydrat (NaH ₂ PO ₄ x 2H ₂ O)	Merck Eurolab, Darmstadt
Natriumacetat	Merck Eurolab, Darmstadt
Natriumhydroxid (NaOH)	Merck Eurolab, Darmstadt
Nuklease-freies Wasser	Promega GmbH, Mannheim
PeqGold TriFast®	Peqlab, Erlangen
RNAlater®	Ambion, Cambridgeshire, GB
Salmon Testis DNA	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Salzsäure (HCl)	Merck Eurolab, Darmstadt
Seakem® LE Agarose	FMC-Bioproducts, Rockland, USA
Sodiumdodecylsulfat (SDS)	Amersham Pharmacia Biotech GmbH, Freiburg
Szintillations-Cocktail-Ready-Protein	Beckman Instrument GmbH, München
Tri-Natriumcitrat-Dihydrat	Merck Eurolab, Darmstadt
Tamra500® Size-Standard	PE-Applied Biosystems, Weiterstadt

Enzyme

AmpliTaq®DNA Polymerase	Qiagen GmbH, Hilden
DNase	Promega, Mannheim
Proteinase K	Qiagen GmbH, Hilden
SUPERaseIn® RNase Inhibitor	Ambion, Cambridgeshire, GB
SUPERSCRIPTII® Reverse Transcriptase	Gibco BRL, Life Technologies, Eggenstein
PCR-Primer	MWG, Ebersberg

Kits

Atlas® Human Cancer 1.2 Arrays	Clontech, Heidelberg
QIAamp® DNA Mini Kit	Quiagen, Hilden
DNAfree®	Promega, Mannheim
Nucleotide Removal Kit	Clontech, Heidelberg

Radioaktives Material

[α - ^{33}P]dATP (10 $\mu\text{Ci}/\mu\text{l}$; 3.000 Ci/mmol)	Amersham Pharmacia Biotech GmbH, Freiburg
--	---

Puffer und Lösungen

20x SSC (Standard saline citrate):

3 M NaCl	175,3 g/l
300 mM Tri-Natriumcitrate-dihydrat	88,2 g/l
auf pH 7,0 titrieren	
20% SDS	200g/l

Sonstiges Material

Frischhaltefolie	Paclan, Henfenfeld
Gefrierfolien	Krups, Stuttgart
Hybond-N	Amersham Pharmacia Biotech GmbH, Freiburg
Phosphoimagerplatte	Raytest Isotopengeräte GmbH, Straubenhardt

Geräte

Gel-Dokumentationssystem	
HerolabEASY®	Herolab, Göttingen
Gelelektrophorese-Anlagen	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Mikrowelle	Promicro, München
Phosphoimager FujiBas	Raytest, Isotopengeräte GmbH, Straubenhardt
Schüttelwasserbad	Gesellschaft für Labortechnik GmbH, Burgwedel
Szintillationszähler	Beckman Instrument GmbH, München
PCR-Cycler GenAmp 900	PE-Applied Biosystems, Weiterstadt
Zytozentrifuge	Hettich, Villingen-Schwenningen
ABI Prism 310 GeneticAnalyzer	PE-Applied Biosystems, Weiterstadt

Softwareprogramme

Imagene 4.2	Biodiscovery (Vertrieb: MWG, Ebersberg)
Excel	Microsoft Office 97
Img2tiff	Raytest, Isotopengeräte GmbH, Straubenhardt
Cluster und Tree View Software	http://www.rana.lbl.gov
OMIM- und SAGE-Datenbanken	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/UniGene/
SPSS for PC	SPSS Inc., Chigago, USA
Significant Analysis of Microarrays SAM	http://www.stanford.edu

6.2 Tabellen Mikrosatellitenanalysen

Marker	Lokalisation	Start	Ende	Fluoreszenz	Farbe	Element	
D1S468	1p36.3	3526460	3607188	HEX	gelb	Dinuc	
D2S164	2q35	215956946	216157289	HEX	gelb	Dinuc	
D8S133	8p21.3	21726960	21727071	HEX	gelb	Dinuc	
D8S136	8p21.3	22175933	22176003	FAM	blau	Dinuc	
NEFL	8p21.2	25226092	25226238	TET	grün	Dinuc	
D8S137	8p21.1	27443725	27444095	FAM	blau	Dinuc	
D9S156	9p22.3	16409790	16410020	TET	grün	Dinuc	
IFNA	9p21.3	21711843	21712985	FAM	blau	Dinuc	
D9S161	9p21.2	27944560	27944698	FAM	blau	Dinuc	
D9S747	9q31.3	104110909	104111102	FAM	blau	Tetra	
D9S195	9q33.1	113233923	113234251	TET	grün	Dinuc	
D12S351	12q13.2	91987135	92023886	FAM	blau	Dinuc	
D17S802	17q25	76671440	76681855	TET	grün	Dinuc	
Marker	Lokalisation	Start	Ende	Fluoreszenz	Farbe	Element	Contig
c17tg22	17q25	76458538	76458560	FAM	blau	Dinuc	NT_010641
c17ca24	17q25	77307994	77308018	FAM	blau	Dinuc	NT_010641
c21tg30	21q22.3	44301907	44301965	FAM	blau	Dinuc	NT_011515

Tabelle 12: Für Mikrosatellitenanalysen verwendete Mikrosatellitenmarker (Quelle: Steiner et al. 1997 und Schneider et al. 2000 sowie aus dem Linkage Mapping Set von ABI Prism) mit Namen, genauer Lokalisation, Start und Ende, Angaben zu der Fluoreszenzmarkierung, Art des repeat-Elementes (Dinuc, Dinukleotide; Tetra, Tetranukleotide) und die mithilfe von Human Genome Browser Gateway neu entworfenen Marker (<http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgGateway>) unter Angabe des Quell-Contigs.

Marker	forward	Reverse
c17tg22	5'-TCGGTGGTGGCCTGACCCCA-3'	5'-AGAGCTCCACTCTGCCCTA-3'
c17ca24	5'-TCCTGCTAATCACGGCCACA-3'	5'-AGCCAGTTGTTCTCCTCTGA-3'
c21tg30	5'-CCACAGTAGGAAACTTGATGA-3'	5'-CCGGCTTAACGTTATACCCA-3'

Tabelle 13: Sequenzen der neu entworfenen Primer

Lokalisation	Gen / STRP	~ Abstand (Mb) vom p-telomer)
12q21.33	<i>PGS2</i>	90.0
	D12S351	90.3
17q25.1	<i>EVPL</i>	74.6
17q25.3	c17tg22	76.5
	D17S802	76.7
	<i>BIRC5</i>	76.8
	<i>SOCS3</i>	77.0
	<i>PSCD1</i>	77.3
	c17ca24	77.3
	<i>TIMP2</i>	77.5
	<i>HGS</i>	80.3
	<i>ARHGDI1A</i>	80.5
	<i>MAFG</i>	80.6
<i>FASN</i>	80.7	
21q22.3	c21tg30	44.3
	<i>COL18A1</i>	45.7
	<i>COL6A2</i>	46.4

Tabelle 14: Chromosomale und physische Lokalisation von Mikrosatellitenmarkern (STRP) und benachbarten Genen, die auf dem Atlas Array repräsentiert sind. Daten ermittelt mithilfe des

Human Genome Browser Gateway (<http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgGateway>; UCSC version hg16; NCBI Build 34; International Human Genome Sequencing Consortium)

6.3 Tabellen Genexpression

GEN	GenBank Accession#	Intensität TU	Intensität MU	Ratio TU/MU	t-Test p-Wert	Lokalisation
Metabolismus						
DCT	D17547	4.309625	7.87388	0.5473	0.0478	13q32
S100A4	M80563	346.2813	64.2351	5.3908	0.0289	1q21
GAPD	X01677	792.5867	327.239	2.422	0.0404	12p13
MGLL	U67963	5.67516	33.8722	0.1675	0.0427	3q21.3
MTHFD1	J04031	20.34658	11.9927	1.6966	0.0486	14q24
HPRT1	V00530	14.09847	3.59197	3.925	0.0122	Xq26.1
NP	X00737	18.49893	10.1296	1.8262	0.0302	14q13.1
AK1	J04809	16.46526	10.054	1.6377	0.043	9q34.1-q34.2
DHODH	M94065	9.135835	3.09248	2.9542	0.0507	16q22
SLC25A5	J02683	163.8915	54.1165	3.0285	0.0214	Xq24-q26
RPL13A	X56932	758.716	486.252	1.5603	0.0241	19q13.3
extrazelluläre Matrix						
NID	M30269	12.08796	21.2269	0.5695	0.0116	1q43
COL16A1	M92642	8.700192	25.9004	0.3359	0.001	1p35-p34
COL6A1	X15879	31.0722	65.0093	0.478	0.0084	21q22.3
COL11A1	J04177	5.963605	10.5516	0.5652	0.0101	1p21
COL8A1	X57527	7.420577	35.057	0.2117	0.0407	3q12.3
COL18A1	L22548	50.9394	88.4738	0.5758	0.0444	21q22.3
Adhäsion						
DCN	M14219	81.17845	526.361	0.1542	0.0014	12q21.3-12q23
ITGB6	M35198	69.90725	19.4405	3.596	0.0072	2q24.2
DSP	M77830	53.75182	24.859	2.1623	0.009	6p24
ITGA3	M59911	94.98516	27.1114	3.5035	0.0147	17q21.32
CTNNA2	M94151	38.22055	73.2951	0.5215	0.0301	2p12-p11.1
PSME1	L07633	51.94351	24.4206	2.127	0.0437	14q11.2
PSCD2L	U59752	99.80008	58.9272	1.6936	0.0229	19q13.3
Apoptose						
ADAM17	U69611	28.32953	11.9501	2.3707	0.0317	2p25
HTATIP2	U69161	11.43652	6.52656	1.7523	0.0255	11p15.1
UBL1	U83117	137.2537	63.7972	2.1514	0.0402	2q33
BIRC5	U75285	4.47889	11.2185	0.3992	0.0425	17q25
PCTK3	X66362	95.80481	274.221	0.3494	0.0303	1q31-q32
PCTK1	X66363	31.688	12.1181	2.6149	0.0337	Xp11.3-p11.23
AKT1	M63167	0.674386	11.4864	0.0587	0.0465	14q32.32
SFRP2	AF017986	13.18744	24.8795	0.5301	0.038	4q31.3
GSS	U34683	22.58449	13.4417	1.6802	0.0112	20q11.2
Immunsystem						
EDG4	AF011466	17.97337	7.27574	2.4703	0.0214	19p12

GEN	GenBank Accession#	Intensität TU	Intensität MU	Ratio TU/MU	t-Test p-Wert	Lokalisation
Cytokine						
SHH	L38518	54.72396	251.344	0.2177	0.0076	7q36
HDGF	D16431	44.86386	20.0451	2.2382	0.0308	Xq25/CHR. 1
FGF7	M60828	13.35001	45.6482	0.2925	0.042	15q15-q21.1
Protease-Inhibitoren						
TIMP2	J05593	10.56264	34.5306	0.3059	0.0069	17q25
A2M	M11313	58.15984	178.896	0.3251	0.0297	12p13.3-p12.3
Cytoskelett						
KRT7	X03212	797.7667	287.054	2.7792	0.0006	12q12-q21
KRT19	Y00503	355.1452	100.174	3.5453	0.0092	17q21.2
DES	U59167	154.8664	485.229	0.3192	0.025	2q35
KRT18	M26326	86.79263	33.8799	2.5618	0.0294	12q13
KRT8	M34225	140.2579	79.4559	1.7652	0.0428	12q13
Signaltransduktion/Onkogene						
SFN	AF029082	79.20866	31.8912	2.4837	0.0392	1p35.3
ARHGDI B	L20688	66.43594	26.8823	2.4714	0.0058	12p12.3
NME2	L16785	440.6056	229.478	1.92	0.0079	17q21.3
FOSL2	X16706	0.570727	3.96539	0.1439	0.0111	2p23-p22
NME1	X17620	98.94474	52.3036	1.8917	0.0125	17q21.3
NOTCH4	U95299	25.66664	152.523	0.1683	0.0165	6p21.3
NF2	L11353	20.42983	6.54295	3.1224	0.0284	22q12.2
VHL	L15409	35.03921	15.8174	2.2152	0.0321	2p25
ARHQ	M31470	52.77223	30.3613	1.7381	0.0395	2p21
MERTK	U08023	9.535128	4.46408	2.136	0.0461	2q14.1
RFX5	X85786	14.31208	2.79452	5.1215	0.0351	1q21
WNT2B	Z71621	38.61951	203.272	0.19	0.0418	1p13
RANBP2	L41840	16.34281	9.08709	1.7985	0.0482	2
STK39	AF017635	41.39058	12.7739	3.2403	0.0028	2q31.1
ARHG	X69117	2.862937	9.03116	0.317	0.0225	22q12.1
TEC	D29767	2.102242	3.86746	0.5436	0.0464	4p12
MYLK	U48959	27.89418	73.8101	0.3779	0.0482	3q21
PTPN6	X62055	42.26791	23.5147	1.7975	0.033	12p13
HINT1	U51004	108.5826	45.8639	2.3675	0.0061	5q31.2
Replikation/Reparatur/Transkription						
DUSP2	L11329	1.655257	5.70063	0.2904	0.0017	2q11
CHC1	X12654	14.38285	5.60648	2.5654	0.0382	1p36.1
GAS1	L13698	22.85905	55.127	0.4147	0.0399	9q21.3-q22
GSPT1	X17644	59.05653	34.5905	1.7073	0.0479	16p13.1
STK6	D84212	3.691397	8.77165	0.4208	0.0347	20q13.2-q13.3
CHEK1	AF016582	7.699074	2.53543	3.0366	0.0465	11q24-q24
CHAF1A	U20979	37.04642	9.0597	4.0891	0.0065	19p13.3
HMGB2	X62534	52.28714	20.8948	2.5024	0.0105	4q31
SFRS7	L22253	38.30244	20.0988	1.9057	0.006	2p22-p21
MELK	D79997	17.26499	5.11215	3.3772	0.0275	9p13.1

GEN	GenBank Accession#	Intensität TU	Intensität MU	Ratio TU/MU	t-Test p-Wert	Lokalisation
NTHL1	U79718	3628.791	2112.68	1.7176	0.0384	16p13.3
TOP2A	J04088	21.89598	15.438	1.4183	0.0252	17q21-q22
TP73	Y11416	52.25572	123.412	0.4234	0.0376	1p36.3
KHSRP	U69126	53.10007	37.8044	1.4046	0.039	19p13.3

Tabelle 15: Differentielle Genexpression von Tumor im Vergleich zu Schleimhaut. Aufgeführt sind alle (nach Student's t-Test) 77 differentiell exprimierten Gene mit gemittelten Intensitäten der Tumore und Mucosae (Intensität TU/ MU) und deren Quotient (Ratio). Die GenBank-Codierung (Accession#) und die physikalische Position ist vermerkt. Ordnungskriterium der Tabelle ist die generelle Genfunktion.

Gen ¹	Funktion in der Apoptose	Patient ²									
		16	19	20	21	22	23	24	25	26	27
<i>DCN</i>	pro	↔	↔	↓↓	↔	↓↓	↔	↔	↓↓	↓↓	↓↓
<i>DUSP2</i>	pro	↑	↓↓	↔	↓↓	↔	↓↓	↓	↓	↓↓	↓↓
<i>SFRS7</i>	anti	↑↑	↔	↑	↔	↑↑	↑↑	↑↑	↑	↓↓	↔
<i>SLC25A5</i>	anti	↑	↑	↑↑	↑	↑↑	↑	↑↑	↑↑	↓↓	↑↑
<i>HMGB2</i>	anti	↑↑	↑	↑↑	↔	↑↑	↑↑	↑	↔	↑	↑↑
<i>NP</i>	anti	↑↑	↑	↑	↔	↑↑	↑	↑↑	↔	↔	↔
<i>EDG4</i>	anti	↑↑	↑	↑↑	↔	↑↑	↑↑	↔	↑↑	↑↑	↔
<i>TP73</i>	pro	↓↓	↔	↓↓	↔	↔	↓↓	↔	↔	↔	↔
<i>FOSL2</i>	pro	-	-	-	↓↓	↓↓	-	↓↓	-	↓↓	-
<i>BIRC5</i>	anti	↓	↑↑	-	↓↓	↔	↑↑ ³	↓↓	↑	↔	↓

Tabelle 16: Expressionsregulation von Genen, die in Apoptose involviert sind, bei 10 Patienten mit TCC.^{1,*}, SAM-Test q<20%; ² fette Pfeile: vermuteter tumoraktivierender Effekt; ↑, 2-4-fache Herauf-; ↑↑, > 4-fache Herauf-; ↓↓, < 0.25-fache Herunter-; ↓, 0.25-0.5-fache Herunterregulation; ↔, keine differentielle Expression; -, keine Expression detektierbar in Tumor und Mucosa;³ LoH-Daten deuten auf genomische Amplifikation hin

Folgeseite:

Tabelle 17: Statistische Analyse der 1176 untersuchten Gene durch die SAM-Software. Neun herauf- und 2 herunterregulierte Gene sind mit q-Werten von unter 20% vertrauenswürdig signifikant.

7 Abkürzungen

AI	Allelic Imbalance, genomische Instabilität
bp	Basenpaare
Cis /Tis	Carcinoma/Tumor in situ
cDNA	copy DNA, revers transkribierte DNA
CDS	cDNA-Synthese Primer in der Reversen Transkription
G	Grading, Differenzierungsgrad des Tumorgewebes
ICD	International classification of disease
LoH	Loss of Heterozygosity, Verlust eines Allels
MIAME	Minimum Information About a Microarray Experiment
MU	Mucosa, Schleimhaut, Urothel
pTa	Tumor der Klassifikation pTa: nichtinvasiver papillärer Tumor
pT1	Tumor der Klassifikation pT1: Tumor infiltriert subepitheliales Bindegewebe
R	Rezidiv
RT	Reverse Transkription
SAM	Significance Analysis of Microarrays; Software zur Signifikanzanalyse
STRP	short tandem repeat polymorphism, Mikrosatellitenmarker
t-Test	Student's t-Test, statistische Methode zur Signifikanzanalyse
TCC	transitional cell carcinoma, Übergangsepithelkarzinome, Karzinome des Urothels
TNM-Staging	Tumorklassifikation nach Tumorgroße Befall der lokalen Lymphknoten und Fernmetastasen
TUR-B	transurethrale Resektion eines oberflächlichen Blasentumors
TU	Tumor

8 Literaturverzeichnis

- Adshead, J.M., Kessling, A.M. and Ogden, C.W. (1998) Genetic initiation, progression and prognostic markers in transitional cell carcinoma of the bladder: a summary of the structural and transcriptional changes, and the role of developmental genes. *Br J Urol*, **82**, 503-512.
- Baars, J.H., De Ruijter, J.L., Smedts, F., Van Niekerk, C.C., Poels, L.G., Seldenrijk, C.A. and Ramaekers, F.C. (1994) The applicability of a keratin 7 monoclonal antibody in routinely Papanicolaou-stained cytologic specimens for the differential diagnosis of carcinomas. *Am J Clin Pathol*, **101**, 257-261.
- Bassily, N.H., Vallorosi, C.J., Akdas, G., Montie, J.E. and Rubin, M.A. (2000) Coordinate expression of cytokeratins 7 and 20 in prostate adenocarcinoma and bladder urothelial carcinoma. *Am J Clin Pathol*, **113**, 383-388.
- Belzacq, A.S. and Brenner, C. (2003) The adenine nucleotide translocator: a new potential chemotherapeutic target. *Curr Drug Targets*, **4**, 517-524.
- Belzacq, A.S., Vieira, H.L., Verrier, F., Vandecasteele, G., Cohen, I., Prevost, M.C., Larquet, E., Pariselli, F., Petit, P.X., Kahn, A., Rizzuto, R., Brenner, C. and Kroemer, G. (2003) Bcl-2 and Bax modulate adenine nucleotide translocase activity. *Cancer Res*, **63**, 541-546.
- Blasco, F., Penuelas, S., Cascallo, M., Hernandez, J.L., Alemany, C., Masa, M., Calbo, J., Soler, M., Nicolas, M., Perez-Torras, S., Gomez, A., Tarrason, G., Noe, V., Mazo, A., Ciudad, C.J. and Piulats, J. (2004) Expression profiles of a human pancreatic cancer cell line upon induction of apoptosis search for modulators in cancer therapy. *Oncology*, **67**, 277-290.
- Brandau, S. and Bohle, A. (2001) Bladder cancer. I. Molecular and genetic basis of carcinogenesis. *Eur Urol*, **39**, 491-497.
- Brazma, A., Hingamp, P., Quackenbush, J., Sherlock, G., Spellman, P., Stoeckert, C., Aach, J., Ansorge, W., Ball, C.A., Causton, H.C., Gaasterland, T., Glenisson, P., Holstege, F.C., Kim, I.F., Markowitz, V., Matese, J.C., Parkinson, H., Robinson, A., Sarkans, U., Schulze-Kremer, S., Stewart, J., Taylor, R., Vilo, J. and Vingron, M. (2001) Minimum information about a microarray experiment (MIAME)-toward standards for microarray data. *Nat Genet*, **29**, 365-371.
- Cassia, R., Moreno-Bueno, G., Rodriguez-Perales, S., Hardisson, D., Cigudosa, J.C. and Palacios, J. (2003) Cyclin E gene (CCNE) amplification and hCDC4 mutations in endometrial carcinoma. *J Pathol*, **201**, 589-595.
- Cavaloc, Y., Popielarz, M., Fuchs, J.P., Gattoni, R. and Stevenin, J. (1994) Characterization and cloning of the human splicing factor 9G8: a novel 35 kDa factor of the serine/arginine protein family. *Embo J*, **13**, 2639-2649.
- Chopin, D.K. and Gattegno, B. (2002) Superficial bladder tumors. *Eur Urol*, **42**, 533-541.
- Chow, N.H., Liu, H.S. and Chan, S.H. (2000) The role of nm23-H1 in the progression of transitional cell bladder cancer. *Clin Cancer Res*, **6**, 3595-3599.
- Cookson, M.S., Herr, H.W., Zhang, Z.F., Soloway, S., Sogani, P.C. and Fair, W.R. (1997) The treated natural history of high risk superficial bladder cancer: 15-year outcome. *J Urol*, **158**, 62-67.
- Cordon-Cardo, C., Cote, R.J. and Sauter, G. (2000) Genetic and molecular markers of urothelial premalignancy and malignancy. *Scand J Urol Nephrol Suppl*, **205**, 82-93.
- De Marcos Lousa, C., Trezeguet, V., Dianoux, A.C., Brandolin, G. and Lauquin, G.J. (2002) The human mitochondrial ADP/ATP carriers: kinetic properties and biogenesis of

- wild-type and mutant proteins in the yeast *S. cerevisiae*. *Biochemistry*, **41**, 14412-14420.
- de Wit, N.J., Weidle, U.H., Ruiter, D.J. and van Muijen, G.N. (2002) Expression profiling of MMA-1a and splice variant MMA-1b: new cancer/testis antigens identified in human melanoma. *Int J Cancer*, **98**, 547-553.
- Dyrskjot, L., Thykjaer, T., Kruhoffer, M., Jensen, J.L., Marcussen, N., Hamilton-Dutoit, S., Wolf, H. and Orntoft, T.F. (2003) Identifying distinct classes of bladder carcinoma using microarrays. *Nat Genet*, **33**, 90-96.
- EAU. (2002).
- Eisen, M.B., Spellman, P.T., Brown, P.O. and Botstein, D. (1998) Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 14863-14868.
- Epstein, J.I., Amin, M.B., Reuter, V.R. and Mostofi, F.K. (1998) The World Health Organization/International Society of Urological Pathology consensus classification of urothelial (transitional cell) neoplasms of the urinary bladder. Bladder Consensus Conference Committee. *Am J Surg Pathol*, **22**, 1435-1448.
- Fernandez-Flores, A., Manzarbeitia, F. and Alonso, J.G. (2003) Expression of c-erbB-2 and cytokeratins 7 and 20 in urothelial carcinoma with gland-like lumina. *Ann Diagn Pathol*, **7**, 281-284.
- Fitzpatrick, J.M., West, A.B., Butler, M.R., Lane, V. and O'Flynn, J.D. (1986) Superficial bladder tumors (stage pTa, grades 1 and 2): the importance of recurrence pattern following initial resection. *J Urol*, **135**, 920-922.
- Gonzalez-Zulueta, M., Ruppert, J.M., Tokino, K., Tsai, Y.C., Spruck, C.H., 3rd, Miyao, N., Nichols, P.W., Hermann, G.G., Horn, T., Steven, K. and et al. (1993) Microsatellite instability in bladder cancer. *Cancer Res*, **53**, 5620-5623.
- Holmang, S., Hedelin, H., Anderstrom, C., Holmberg, E., Busch, C. and Johansson, S.L. (1999) Recurrence and progression in low grade papillary urothelial tumors. *J Urol*, **162**, 702-707.
- Huang, C.Y., Wu, Y.M., Hsu, C.Y., Lee, W.S., Lai, M.D., Lu, T.J., Huang, C.L., Leu, T.H., Shih, H.M., Fang, H.I., Robinson, D.R., Kung, H.J. and Yuan, C.J. (2002) Caspase activation of mammalian sterile 20-like kinase 3 (Mst3). Nuclear translocation and induction of apoptosis. *J Biol Chem*, **277**, 34367-34374.
- Iozzo, R.V., Chakrani, F., Perrotti, D., McQuillan, D.J., Skorski, T., Calabretta, B. and Eichstetter, I. (1999) Cooperative action of germ-line mutations in decorin and p53 accelerates lymphoma tumorigenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**, 3092-3097.
- Jiang, J., Ulbright, T.M., Younger, C., Sanchez, K., Bostwick, D.G., Koch, M.O., Eble, J.N. and Cheng, L. (2001) Cytokeratin 7 and cytokeratin 20 in primary urinary bladder carcinoma and matched lymph node metastasis. *Arch Pathol Lab Med*, **125**, 921-923.
- Johnston, A.M., Naselli, G., Gonez, L.J., Martin, R.M., Harrison, L.C. and DeAizpurua, H.J. (2000) SPAK, a STE20/SPS1-related kinase that activates the p38 pathway. *Oncogene*, **19**, 4290-4297.
- Kaufman, P.D., Kobayashi, R., Kessler, N. and Stillman, B. (1995) The p150 and p60 subunits of chromatin assembly factor I: a molecular link between newly synthesized histones and DNA replication. *Cell*, **81**, 1105-1114.
- Kausch, I. and Bohle, A. (2001) Bladder cancer. II. Molecular aspects and diagnosis. *Eur Urol*, **39**, 498-506.
- Kausch, I. and Bohle, A. (2002) Molecular aspects of bladder cancer III. Prognostic markers of bladder cancer. *Eur Urol*, **41**, 15-29.
- Khan, J., Wei, J.S., Ringner, M., Saal, L.H., Ladanyi, M., Westermann, F., Berthold, F., Schwab, M., Antonescu, C.R., Peterson, C. and Meltzer, P.S. (2001) Classification

- and diagnostic prediction of cancers using gene expression profiling and artificial neural networks. *Nat Med*, **7**, 673-679.
- Knowles, M.A. (1995) Molecular genetics of bladder cancer. *Br J Urol*, **75 Suppl 1**, 57-66.
- Knowles, M.A. (1999a) The genetics of transitional cell carcinoma: progress and potential clinical application. *BJU Int*, **84**, 412-427.
- Knowles, M.A. (1999b) Identification of novel bladder tumour suppressor genes. *Electrophoresis*, **20**, 269-279.
- Knowles, M.A., Elder, P.A., Williamson, M., Cairns, J.P., Shaw, M.E. and Law, M.G. (1994) Allelotype of human bladder cancer. *Cancer Res*, **54**, 531-538.
- Kommerau, M. (nicht veröffentlichte Daten).
- Koon, N., Schneider-Stock, R., Sarlomo-Rikala, M., Lasota, J., Smolkin, M., Petroni, G., Zaika, A., Boltze, C., Meyer, F., Andersson, L., Knuutila, S., Miettinen, M. and El-Rifai, W. (2004) Molecular targets for tumour progression in gastrointestinal stromal tumours. *Gut*, **53**, 235-240.
- Kresse, H. and Schonherr, E. (2001) Proteoglycans of the extracellular matrix and growth control. *J Cell Physiol*, **189**, 266-274.
- Kroft, S.H. and Oyasu, R. (1994) Urinary bladder cancer: mechanisms of development and progression. *Lab Invest*, **71**, 158-174.
- Kurth, K.H., Bouffieux, C., Sylvester, R., van der Meijden, A.P., Oosterlinck, W. and Brausi, M. (2000) Treatment of superficial bladder tumors: achievements and needs. The EORTC Genitourinary Group. *Eur Urol*, **37 Suppl 3**, 1-9.
- Kurth, K.H., Denis, L., Bouffieux, C., Sylvester, R., Debruyne, F.M., Pavone-Macaluso, M. and Oosterlinck, W. (1995) Factors affecting recurrence and progression in superficial bladder tumours. *Eur J Cancer*, **31A**, 1840-1846.
- Landis, S.H., Murray, T., Bolden, S. and Wingo, P.A. (1999) Cancer statistics, 1999. *CA Cancer J Clin*, **49**, 8-31, 31.
- Li, F., Ambrosini, G., Chu, E.Y., Plescia, J., Tognin, S., Marchisio, P.C. and Altieri, D.C. (1998) Control of apoptosis and mitotic spindle checkpoint by survivin. *Nature*, **396**, 580-584.
- Liebert, M., Gebhardt, D., Wood, C., Chen, I.L., Ellard, J., Amancio, D. and Grossman, H.B. (1999) Urothelial differentiation and bladder cancer. *Adv Exp Med Biol*, **462**, 437-448.
- Lima, C.D., Klein, M.G., Weinstein, I.B. and Hendrickson, W.A. (1996) Three-dimensional structure of human protein kinase C interacting protein 1, a member of the HIT family of proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**, 5357-5362.
- Luciakova, K., Barath, P., Poliakova, D., Persson, A. and Nelson, B.D. (2003) Repression of the human adenine nucleotide translocase-2 gene in growth-arrested human diploid cells: the role of nuclear factor-1. *J Biol Chem*, **278**, 30624-30633.
- Messing, E.M. (1990) Clinical implications of the expression of epidermal growth factor receptors in human transitional cell carcinoma. *Cancer Res*, **50**, 2530-2537.
- Millan-Rodriguez, F., Chechile-Toniolo, G., Salvador-Bayarri, J., Palou, J. and Vicente-Rodriguez, J. (2000) Multivariate analysis of the prognostic factors of primary superficial bladder cancer. *J Urol*, **163**, 73-78.
- Mirza, A., McGuirk, M., Hockenberry, T.N., Wu, Q., Ashar, H., Black, S., Wen, S.F., Wang, L., Kirschmeier, P., Bishop, W.R., Nielsen, L.L., Pickett, C.B. and Liu, S. (2002) Human survivin is negatively regulated by wild-type p53 and participates in p53-dependent apoptotic pathway. *Oncogene*, **21**, 2613-2622.
- Miyao, N., Tsai, Y.C., Lerner, S.P., Olumi, A.F., Spruck, C.H., 3rd, Gonzalez-Zulueta, M., Nichols, P.W., Skinner, D.G. and Jones, P.A. (1993) Role of chromosome 9 in human bladder cancer. *Cancer Res*, **53**, 4066-4070.
- Moll, R., Achtstatter, T., Becht, E., Balcarova-Stander, J., Itensohn, M. and Franke, W.W. (1988) Cytokeratins in normal and malignant transitional epithelium. Maintenance of

- expression of urothelial differentiation features in transitional cell carcinomas and bladder carcinoma cell culture lines. *Am J Pathol*, **132**, 123-144.
- Momose, H., Kakinuma, H., Shariff, S.Y., Mitchell, G.B., Rademaker, A. and Oyasu, R. (1991) Tumor-promoting effect of urinary epidermal growth factor in rat urinary bladder carcinogenesis. *Cancer Res*, **51**, 5487-5490.
- Niu, J., Dorahy, D.J., Gu, X., Scott, R.J., Draganic, B., Ahmed, N. and Agrez, M.V. (2002) Integrin expression in colon cancer cells is regulated by the cytoplasmic domain of the beta6 integrin subunit. *Int J Cancer*, **99**, 529-537.
- Oosterlinck, W., Lobel, B., Jakse, G., Malmstrom, P.U., Stockle, M. and Sternberg, C. (2002) Guidelines on bladder cancer. *Eur Urol*, **41**, 105-112.
- Orntoft, T.F. and Wolf, H. (1998) Molecular alterations in bladder cancer. *Urol Res*, **26**, 223-233.
- Pawinski, A., Sylvester, R., Kurth, K.H., Bouffloux, C., van der Meijden, A., Parmar, M.K. and Bijnens, L. (1996) A combined analysis of European Organization for Research and Treatment of Cancer, and Medical Research Council randomized clinical trials for the prophylactic treatment of stage TaT1 bladder cancer. European Organization for Research and Treatment of Cancer Genitourinary Tract Cancer Cooperative Group and the Medical Research Council Working Party on Superficial Bladder Cancer. *J Urol*, **156**, 1934-1940, discussion 1940-1931.
- Polo, S.E., Theocharis, S.E., Kljanienco, J., Savignoni, A., Asselain, B., Vielh, P. and Almouzni, G. (2004) Chromatin assembly factor-1, a marker of clinical value to distinguish quiescent from proliferating cells. *Cancer Res*, **64**, 2371-2381.
- Ramos-Vara, J.A., Miller, M.A., Boucher, M., Roudabush, A. and Johnson, G.C. (2003) Immunohistochemical detection of uroplakin III, cytokeratin 7, and cytokeratin 20 in canine urothelial tumors. *Vet Pathol*, **40**, 55-62.
- Reznikoff, C.A., Belair, C.D., Yeager, T.R., Savelieva, E., Blesloch, R.H., Puthenveetil, J.A. and Cuthill, S. (1996) A molecular genetic model of human bladder cancer pathogenesis. *Semin Oncol*, **23**, 571-584.
- Richter, J., Beffa, L., Wagner, U., Schraml, P., Gasser, T.C., Moch, H., Mihatsch, M.J. and Sauter, G. (1998) Patterns of chromosomal imbalances in advanced urinary bladder cancer detected by comparative genomic hybridization. *Am J Pathol*, **153**, 1615-1621.
- Ross, J.S., Kaur, P., Sheehan, C.E., Fisher, H.A., Kaufman, R.A., Jr. and Kallakuri, B.V. (2003) Prognostic significance of matrix metalloproteinase 2 and tissue inhibitor of metalloproteinase 2 expression in prostate cancer. *Mod Pathol*, **16**, 198-205.
- Sanchez-Carbayo, M., Herrero, E., Megias, J., Mira, A. and Soria, F. (1999) Comparative sensitivity of urinary CYFRA 21-1, urinary bladder cancer antigen, tissue polypeptide antigen, tissue polypeptide antigen and NMP22 to detect bladder cancer. *J Urol*, **162**, 1951-1956.
- Sanchez-Carbayo, M., Socci, N.D., Charytonowicz, E., Lu, M., Prystowsky, M., Childs, G. and Cordon-Cardo, C. (2002) Molecular profiling of bladder cancer using cDNA microarrays: defining histogenesis and biological phenotypes. *Cancer Res*, **62**, 6973-6980.
- Sanchez-Carbayo, M., Socci, N.D., Lozano, J.J., Li, W., Charytonowicz, E., Belbin, T.J., Prystowsky, M.B., Ortiz, A.R., Childs, G. and Cordon-Cardo, C. (2003) Gene discovery in bladder cancer progression using cDNA microarrays. *Am J Pathol*, **163**, 505-516.
- Sauter, G., Gasser, T.C., Moch, H., Richter, J., Jiang, F., Albrecht, R., Novotny, H., Wagner, U., Bubendorf, L. and Mihatsch, M.J. (1997) DNA aberrations in urinary bladder cancer detected by flow cytometry and FISH. *Urol Res*, **25 Suppl 1**, S37-43.

- Schneider, A., Borgnat, S., Lang, H., Regine, O., Lindner, V., Kassem, M., Saussine, C., Oudet, P., Jacqmin, D. and Gaub, M.P. (2000) Evaluation of microsatellite analysis in urine sediment for diagnosis of bladder cancer. *Cancer Res*, **60**, 4617-4622.
- Sidransky, D., Von Eschenbach, A., Tsai, Y.C., Jones, P., Summerhayes, I., Marshall, F., Paul, M., Green, P., Hamilton, S.R., Frost, P. and et al. (1991) Identification of p53 gene mutations in bladder cancers and urine samples. *Science*, **252**, 706-709.
- Smith, S.D., Wheeler, M.A., Plesica, J., Colberg, J.W., Weiss, R.M. and Altieri, D.C. (2001) Urine detection of survivin and diagnosis of bladder cancer. *Jama*, **285**, 324-328.
- Steiner, G., Schoenberg, M.P., Linn, J.F., Mao, L. and Sidransky, D. (1997) Detection of bladder cancer recurrence by microsatellite analysis of urine. *Nat Med*, **3**, 621-624.
- Stros, M., Ozaki, T., Bacikova, A., Kageyama, H. and Nakagawara, A. (2002) HMGB1 and HMGB2 cell-specifically down-regulate the p53- and p73-dependent sequence-specific transactivation from the human Bax gene promoter. *J Biol Chem*, **277**, 7157-7164.
- Su, T., Suzui, M., Wang, L., Lin, C.S., Xing, W.Q. and Weinstein, I.B. (2003) Deletion of histidine triad nucleotide-binding protein 1/PKC-interacting protein in mice enhances cell growth and carcinogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **100**, 7824-7829.
- Thomas, J.O. (2001) HMG1 and 2: architectural DNA-binding proteins. *Biochem Soc Trans*, **29**, 395-401.
- Thykjaer, T., Workman, C., Kruhoffer, M., Demtroder, K., Wolf, H., Andersen, L.D., Frederiksen, C.M., Knudsen, S. and Orntoft, T.F. (2001) Identification of gene expression patterns in superficial and invasive human bladder cancer. *Cancer Res*, **61**, 2492-2499.
- Tidd, D.M., Broughton, C.M. and Clark, R.E. (2003) CpG oligodeoxynucleotide 5mer-induced apoptosis in MOLT-4 leukaemia cells does not require caspase 3 or new protein synthesis. *Nucleic Acids Res*, **31**, 2297-2304.
- Tiguert, R. and Fradet, Y. (2002) New diagnostic and prognostic tools in bladder cancer. *Curr Opin Urol*, **12**, 239-243.
- Tusher, V.G., Tibshirani, R. and Chu, G. (2001) Significance analysis of microarrays applied to the ionizing radiation response. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 5116-5121.
- Uchiyama, M., Usami, N., Kondo, M., Mori, S., Ito, M., Ito, G., Yoshioka, H., Imaizumi, M., Ueda, Y., Takahashi, M., Minna, J.D., Shimokata, K. and Sekido, Y. (2003) Loss of heterozygosity of chromosome 12p does not correlate with KRAS mutation in non-small cell lung cancer. *Int J Cancer*, **107**, 962-969.
- Utting, M., Werner, W., Dahse, R., Schubert, J. and Junker, K. (2002) Microsatellite analysis of free tumor DNA in urine, serum, and plasma of patients: a minimally invasive method for the detection of bladder cancer. *Clin Cancer Res*, **8**, 35-40.
- Veltman, J.A., Fridlyand, J., Pejavar, S., Olshen, A.B., Korkola, J.E., DeVries, S., Carroll, P., Kuo, W.L., Pinkel, D., Albertson, D., Cordon-Cardo, C., Jain, A.N. and Waldman, F.M. (2003) Array-based comparative genomic hybridization for genome-wide screening of DNA copy number in bladder tumors. *Cancer Res*, **63**, 2872-2880.
- Williams, S.V., Sibley, K.D., Davies, A.M., Nishiyama, H., Hornigold, N., Coulter, J., Kennedy, W.J., Skilleter, A., Habuchi, T. and Knowles, M.A. (2002) Molecular genetic analysis of chromosome 9 candidate tumor-suppressor loci in bladder cancer cell lines. *Genes Chromosomes Cancer*, **34**, 86-96.
- Yin, Y., Liu, Y.X., Jin, Y.J., Hall, E.J. and Barrett, J.C. (2003) PAC1 phosphatase is a transcription target of p53 in signalling apoptosis and growth suppression. *Nature*, **422**, 527-531.
- Yuan, B.Z., Jefferson, A.M., Popescu, N.C. and Reynolds, S.H. (2004) Aberrant gene expression in human non small cell lung carcinoma cells exposed to demethylating agent 5-aza-2'-deoxycytidine. *Neoplasia*, **6**, 412-419.

