

**Frei zirkulierende DNA-Fragmente im Serum als
diagnostischer und prognostischer Marker beim
Blasenkarzinom**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Hohen Medizinischen Fakultät
der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität
Bonn

vorgelegt von: Nadja Ellinger geb. El Kassem
aus: Siegburg

2008

Angefertigt mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: Priv.-Doz. Dr. med. Patrick J. Bastian
2. Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. Dr. med. Alexander A. von Rücker

Tag der Mündlichen Prüfung: 01.04.2008

Aus: Klinik und Poliklinik für Urologie
Direktor: Prof. Dr. med. Dr. h.c. Stefan C. Müller

Diese Dissertation ist auf dem Hochschulschriftenserver der ULB Bonn
http://hss.ulb.uni-bonn.de/diss_online elektronisch publiziert.

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis.....	6
Tabellenverzeichnis.....	7
Abkürzungsverzeichnis.....	8
1 Einleitung	10
1.1 Harnblasenkarzinom.....	10
1.1.1 Anatomie und Histologie der Harnblase	10
1.1.2 Epidemiologie	10
1.1.3 Risikofaktoren.....	11
1.1.4 Symptome und Diagnostik.....	12
1.1.5 Pathologische Klassifikation	13
1.1.6 Therapie, Nachsorge und Prognose	15
1.2 Zellfreie DNA im Blut.....	17
1.3 DNA-Hypermethylierung.....	18
1.3.1 Physiologische Bedeutung der DNA-Hypermethylierung.....	19
1.3.2 Hypermethylierung im Rahmen von Tumorerkrankungen	19
1.4 Promotorhypermethylierung beim Blasenkarzinom	21
1.5 Zielsetzung	23
2 Material und Methoden	25
2.1 Materialien	25
2.1.1 Geräte.....	25
2.1.2 Labormaterialien.....	25
2.1.3 Chemikalien	26
2.1.4 Kits.....	26
2.1.5 Enzyme.....	26
2.1.6 Primer	27
2.1.7 Software	28
2.1.8 Probenmaterial	28
2.2 Methoden.....	30
2.2.1 DNA-Isolation.....	30
2.2.2 Kontrollproben	31
2.2.3 Restriktionsenzymbehandlung.....	31

2.2.4	Primerdesign	32
2.2.5	Quantitative Polymerase-Kettenreaktion	34
2.2.6	Gelelektrophorese	37
2.2.7	Quantifizierung der zellfreien DNA und ihrer Methylierung	38
2.2.8	Statistische Auswertung	40
3	Ergebnisse	42
3.1	Nachweis zellfreier DNA-Fragmente im Serum	42
3.2	Berechnung des Apoptoseindex	43
3.3	DNA-Methylierung.....	44
3.4	Diagnostische Aussagekraft	47
3.4.1	ROC-Analysen von PTSG2, Reprimo und Apoptoseindex	47
3.4.2	ROC-Analysen der Methylierungslevel aller betrachteter Gene	49
3.4.3	Korrelation der Menge frei zirkulierender DNA mit klinischen und pathologischen Parametern	50
3.4.4	Korrelation der Methylierungslevel mit klinischen und pathologischen Parametern	52
4	Diskussion.....	56
4.1	Freie DNA im Serum.....	57
4.2	Promotorhypermethylierung.....	58
4.2.1	Methylierungsfrequenzen APC	58
4.2.2	Methylierungsfrequenzen DAPK.....	59
4.2.3	Methylierungsfrequenzen GSTP1.....	59
4.2.4	Methylierungsfrequenzen TIG1	60
4.2.5	Methylierungsfrequenzen PTGS2.....	61
4.2.6	Methylierungsfrequenzen Reprimo	61
4.3	Ursprung der freien DNA	61
4.4	Diagnostische Information	63
4.4.1	Dignität der betrachteten Probe	63
4.4.2	CpG-Insel-Hypermethylierung der betrachteten Gene.....	63
4.4.3	Vergleich mit anderen diagnostischen Verfahren	64
4.5	Prognostische Information	65
4.5.1	Tumorspezifisches Überleben	65

4.5.2	Korrelation mit klinisch-pathologischen Parametern	65
4.6	Perspektiven	66
5	Zusammenfassung	67
6	Literaturverzeichnis	69
7	Publikationsverzeichnis	81
7.1	Originalartikel:	81
7.2	Poster	81
8	Danksagung	80
9	Lebenslauf	Fehler! Textmarke nicht definiert.

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Sensitivität und Spezifität verschiedener Tumormarker des BCAs.....	13
Abbildung 2: Cytosin und 5-Methylcytosin.	19
Abbildung 3: Promotorhypermethylierung in Karzinomzellen.....	20
Abbildung 4: Funktionsweise der Restriktionsenzyme HpaII und HinP1I.....	32
Abbildung 5: Sequenzen der Promotorregion der untersuchten Gene.....	33
Abbildung 6: Amplifikationskurve.	35
Abbildung 7: Standardkurve.....	36
Abbildung 8: Polymerase-Kettenreaktion der PTGS2 und Reprimo DNA Fragmente. ...	37
Abbildung 9: Relative Effizienz der Detektion unterschiedlicher DNA-Fragmente.....	39
Abbildung 10: Konzentrationen kleinfragmentärer freier DNA im Blut.....	40
Abbildung 11: Konzentrationen freier DNA im Serum der Probanden.....	43
Abbildung 12: Apoptose-Indices der verschiedenen Probandengruppen.....	44
Abbildung 13: Methylierungsstatus der untersuchten Genorte.....	45
Abbildung 14: Methylierungsfrequenzen der untersuchten Genorte nach Subgruppen.	47
Abbildung 15: ROC-Analysen: Apoptoseindex, PTGS2- und Reprimo-Fragmente.....	48
Abbildung 16: ROC-Analyse: Methylierungslevel für einige der untersuchten Gene.....	49
Abbildung 17: BCA-spezifisches Überleben in Abhängigkeit vom Apoptoseindex.	51
Abbildung 18: Korrelation Methylierung mit klinisch-pathologischen Parametern.	53
Abbildung 19: Einfluss der Hypermethylierung von APC/GSTP1 auf das Überleben.....	54
Abbildung 20: Bedeutung einer Hämangiosis carcinomatosa	55
Abbildung 21: Hypothese zur Entstehung freier DNA im Serum	62

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: TNM-Klassifikation des Harnblasenkarzinoms.	14
Tabelle 2: WHO-Grading des Harnblasenkarzinoms 1973.	15
Tabelle 3: WHO/ISUP- Klassifikation des Harnblasenkarzinoms 2004	15
Tabelle 4: Methylierungsstatus einiger Gene beim Blasenkarzinom	21
Tabelle 5: Primersequenzen der untersuchten Gene.....	27
Tabelle 6: Klinisch-pathologische Parameter der Patienten	29
Tabelle 7: Methylierungsratio der untersuchten Gene.....	46
Tabelle 8: ROC-Analysen der DNA-Fragmente sowie des Apoptoseindex.....	48
Tabelle 9: ROC-Analysen der Methylierungslevel aller betrachteter Gene	50
Tabelle 10: Cox Proportional Hazard-Modell: DNA-Fragmente und Apoptoseindex.	52
Tabelle 11: Vergleich verschiedener Tests auf das Vorliegen eines Urothelkarzinoms.	64

Abkürzungsverzeichnis

<i>APC</i>	Adenomatosis poliposis coli
AUC	Area under curve
BCA	Blasenkarzinom
BCG	Bacille-Calmette-Guérin
bp	Basenpaar
BPH	Benigne Prostatahyperplasie
BTA	Blasentumorantigen
CpG	5'-Cytosin-Guanin-3'
Ct	Cycle Threshold
Cis	Carcinoma in situ
DAPK	Death associated proteine kinase
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNMT	DNA-Methyltransferase
EDTA	Ethylendinitrilotetraacetat
<i>FGFR3</i>	Fibroblast growth factor receptor 3
<i>GSTP1</i>	Glutathion-S-Transferase der Pi-Klasse1
HCl	Hydrochlorid
<i>HRAS</i>	Harvey rat sarcoma viral oncogene homolog
ISUP	International Society of Urological Pathology
NaOH	Natriumhydroxid
NIM	Normalized Index of Methylation
NMP 22	Nukleäres Matrixprotein 22
NPV	Negativer Vorhersagewert
PCA	Prostatakarzinom
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PPV	Positiver Vorhersagewert

<i>PTGS2</i>	Prostaglandin-Endoperoxid-Synthetase 2
<i>PUNLMP</i>	papillary urothelial neoplasms of low malignant potential
QMSP	Quantitative methylierungssensitive PCR
RASSF1A	Ras association domain superfamily 1A
ROC	Receiver operator curve
rt-PCR	Real-time-PCR
SAM	S-Adenosyl-Methionin
SCC	Plattmepithelkarzinom
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TCC	Urothelkarzinom
TIG1	Tazarotene-induced gene 1
Tris	(Hydroxymethyl)-aminomethan
TUR-B	Transurethrale Resektion der Blase
TUR-P	Transurethrale Resektion der Prostata
WHO	Weltgesundheitsorganisation

1 Einleitung

1.1 Harnblasenkarzinom

1.1.1 *Anatomie und Histologie der Harnblase*

Die menschliche Harnblase (*Vesica urinaria*) liegt beim Erwachsenen hinter der Symphyse auf dem Beckenboden und wird an der Oberseite von Bauchfell (*Peritoneum parietale*) bedeckt. Der durch die Nieren gebildete und konzentrierte Harn wird durch die beiden Harnleiter schubweise in die Harnblase abgeleitet, bevor er über die Harnröhre ausgeschieden wird. Abhängig vom Füllungszustand schwankt die Größe der Harnblase, wobei sie im Rahmen chronischer Abflussstörungen mehrere Liter Urin beinhalten kann.

Der Blasenkörper (*Corpus vesicae*) bildet das Dach der Harnblase, der Blasengrund (*Fundus vesicae*) ist gegen den Beckenboden gerichtet. An der Hinterwand des Fundus münden die beiden Harnleiter. Die Einmündungsstellen bilden zusammen mit dem Abgang der Harnröhre das sog. Blasendreieck (*Trigonum vesicae*). Die Schleimhautoberfläche ist im Bereich des Trigonums glatt, während sie im Bereich des Korpus abhängig vom Füllungszustand mehr oder weniger gefaltet ist (Frick, Leonhardt, Starck, 1992)

Die innerste Schicht der Blasenwand bildet das Übergangsepithel (*Urothel* oder *Transitionalzell-Epithel*), welches das komplette harnableitende System auskleidet und mit den Bestandteilen des Urins in direktem Kontakt steht. Das Urothel ist ein mehrschichtiges Epithel, das zwischen zwei und sechs Schichten aufweisen kann. Alle Zellen inserieren an der Basallamina. Die basalen und mittleren Zellen (*Basal- und Intermediärzellen*) sind platt bis kubisch, die oberste Zellreihe besteht aus großen, oft zweikernigen Deckzellen, von denen sich jede schirmartig über mehrere Zellen der tieferen Reihen legt (*Umbrella cells*). Ein weiterer wichtiger Bestandteil der Blasenwand ist der *Musculus detrusor vesicae*, der aus mehreren, parasymphatisch innervierten Schichten glatter Muskulatur besteht und für die Kontraktion der Blase während des Wasserlassens zuständig ist (Stevens, Lowe 1997).

1.1.2 *Epidemiologie*

Laut Robert-Koch-Institut erkrankten 2002 etwa 25950 Menschen in Deutschland an einer bösartigen Neubildung der Blase. Mehr als zwei Drittel der Betroffenen waren

Männer (Inzidenz: 18850 männliche, 7100 weibliche Patienten). Die Mortalität betrug 2002 für Männer 3432 und für Frauen 2019, also insgesamt 5451 Personen. Das mittlere Erkrankungsalter liegt für Männer bei 70, für Frauen bei 73 Jahren (Bertz J et al., 2006).

Weltweit wurden im Jahr 2002 357000 Neuerkrankungen und 145000 Todesfälle registriert (Parkin et al., 2005) Auch hier zeigt sich, dass Männer zwei bis vier Mal so häufig betroffen sind wie Frauen. Damit machen Krebserkrankungen der Harnblase bei Männern gut 8% (somit vierthäufigstes malignes Tumorleiden des Mannes), bei Frauen dagegen zwischen 2 und 3% aller bösartigen Tumoren aus. Aus bis jetzt noch ungeklärten Gründen scheint auch die ethnische Zugehörigkeit eine Rolle in der Epidemiologie des Harnblasenkarzinoms zu spielen. So erkrankten Afroamerikaner nur halb so oft wie Amerikaner mitteleuropäischer Herkunft (Kirkali et al., 2005). Auch genetische Faktoren scheinen auf die Tumorgenese Einfluss zu nehmen.

1.1.3 Risikofaktoren

Abgesehen vom Geschlecht und dem ethnischen Hintergrund spielen Umweltgifte eine außerordentlich wichtige Rolle bei der Entstehung des Urothelkarzinoms, da diese häufig über den Harn ausgeschieden werden.

Der häufigste Risikofaktor ist das Rauchen: Studien zufolge gehen 50-66% der Blasenkarzinome bei Männern und 25% bei Frauen auf die Inhalation von Karzinogenen im Zigarettenrauch zurück. Dabei scheinen sogenannte Schnellazetylierer unter den Rauchern seltener zu erkranken, da sie die im Rauch enthaltenen Karzinogene schneller in ungiftige Metabolite umwandeln (Marcus et al., 2000). Weiterhin sind bestimmte Polymorphismen der Zytochrom-p450-Enzyme und der Glutathion-S-Transferasen mit einer verlangsamten Detoxifikation assoziiert. (Cohen et al., 2000).

Die berufliche Exposition gegenüber aromatischen Aminen (insbesondere β -Naphthylamin und Benzidin) spielt eine wichtige Rolle in etwa 25% aller Blasenkarzinome (Sadetzki et al., 2000). Mittlerweile wurden die meisten der gefährlichen Chemikalien aus den Arbeitsprozessen der chemischen Industrie und auch der Gummi-, Textil- und Lederverarbeitung entfernt oder spezielle Schutzmaßnahmen ergriffen. Wegen der Latenzzeiten von bis zu 40 Jahren kommen berufsbedingte Blasenkarzinome jedoch noch gelegentlich vor. Zwischen 1978 und 2003 wurden über 1200 Fälle von Harnblasenkar-

zinom in Deutschland als Berufskrankheit anerkannt (Hauptverband der gewerblichen Berufsgenossenschaften, 2005).

Risikofaktoren mit einer geringeren Bedeutung in Mitteleuropa sind chronische Infekte des harnableitenden Systems, Strahlentherapie, bestimmte Chemotherapeutika oder eine Infektion mit *Schistosoma haematobium* (Kirkali et al., 2005).

1.1.4 Symptome und Diagnostik

Typisches Symptom des Blasenkarzinoms ist die schmerzlose Hämaturie, sowie bei fortgeschrittenem Tumorleiden Obstruktion, Dysurie oder Beckenschmerzen.

Neben der Anamnese und der klinischen Untersuchung (inklusive rektaler und vaginaler Palpation) stellen insbesondere die Sonografie, die Urografie, die Urinzytologie und die Zystoskopie geeignete diagnostische Verfahren dar. Besteht der Verdacht auf einen lokal fortgeschrittenen Tumor, kann eine Computertomografie des Beckens als Entscheidungshilfe für das weitere Vorgehen dienen, eine Röntgenuntersuchung des Thorax ist zur Suche nach Fernmetastasen geeignet.

In den letzten Jahren wurden Tests entwickelt, die karzinomspezifische Proteine im Urin nachweisen. Bei diesen Markern handelt es sich um das Blasentumorantigen, nukleäre Matrixproteine (NMP 22) und Fibrinabbauprodukte. Die Tests zeigen zwar gegenüber der Urinzytologie eine höhere Sensitivität, jedoch fehlt ihnen eine ausreichende Spezifität. Die Ergebnisse einer Metaanalyse fasst Abbildung 1 zusammen (Glas et al., 2003); der Nachweis von molekularen Markern ist derzeit im Rahmen einer Routineanwendung nicht empfehlenswert.

Zum Zeitpunkt der Erstdiagnose leiden 70-80% der Betroffenen an einem oberflächlichen Blasenkarzinom. Das Risiko eines Rezidivs nach TUR-B (transurethrale Resektion der Blase) liegt je nach Differenzierungsgrad der Tumorzellen zwischen 50 und 75%, das Risiko eines Progresses zu einem muskelinvasiven Tumor zwischen 2 und 50% (Pashos et al., 2002).

Die Prognose bei Harnblasenkrebs hängt stark vom Grad der Ausbreitung ab. Wird der Tumor in einem lokal begrenzten Stadium entdeckt, liegt die 5-Jahres-Überlebensrate bei 72% für Frauen und für Männer bei 78%. Betrachtet man nur die invasiven Karzinome der Harnblase, sinken die relativen 5-Jahres-Überlebensraten deutlich ab. Für Männer liegen sie dann bei 57 % und für Frauen bei 53 %. Ist bereits

eine Absiedlung in Lymphknoten eingetreten, bestehen nur noch geringe Aussichten auf Heilung (Bertz J et al., 2006)

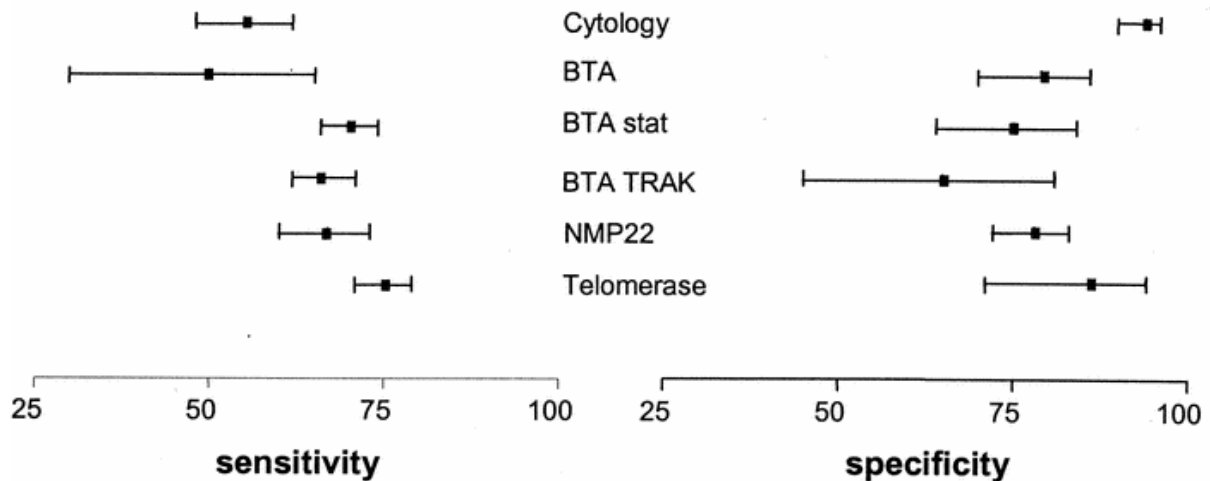


Abbildung 1: Sensitivität und Spezifität verschiedener Tumormarker des BCAs.

Metaanalyse der diagnostischen Güte molekularer Tumormarker (Blasentumorantigene=BTA, BTA stat, BTA trak; nukleäres Matrixprotein22=NMP22; Telomerase) im Urin im Vergleich zur Urinzytologie. Quelle: Glas et al., 2003.

1.1.5 Pathologische Klassifikation

Das von den Transitionalzellen ausgehende Urothelkarzinom hat mit etwa 90% den größten Anteil an den Blasenkreberkrankungen. Weitere seltene Tumortypen sind Plattenepithelkarzinome, Adenokarzinome und kleinzellige Karzinome.

Staging:

Die TNM-Klassifikation der Union Internationale Contre le Cancer von 2002 berücksichtigt nicht nur die Ausdehnung des Primärtumors, sondern auch das Vorhandensein von Lymphknoten- oder Fernmetastasen (s. Tabelle 1).

Grading:

Die Differenzierungsgrade der Weltgesundheitsorganisation (WHO) von 1973 für die Übergangszellkarzinome sind in Tabelle 2 dargestellt.

Tabelle 1: TNM-Klassifikation des Harnblasenkarzinoms.

T - Primärtumor

Tx	Primärtumor kann nicht beurteilt werden
T0	Kein Anhalt für Primärtumor
Ta	Nicht-invasives papilläres Karzinom
Tis	Carcinoma in situ, flaches Wachstum
T1	Tumor infiltriert subepitheliales Bindegewebe
T2	Tumor infiltriert Muskulatur
T2a	Tumor infiltriert oberflächliche Muskulatur (innere Hälfte)
T2b	Tumor infiltriert tiefere Muskulatur (äußere Hälfte)
T3	Tumor infiltriert perivesikales Gewebe
T3a	mikroskopisch
T3b	makroskopisch (extravesikale Masse)
T4	Tumor infiltriert Prostata, Uterus, Vagina, Beckenwand oder Bauchwand
T4a	Tumor infiltriert Prostata, Uterus oder Vagina
T4b	Tumor infiltriert Becken- oder Bauchwand

N – Regionäre Lymphknoten

Nx	regionäre Lymphknoten können nicht beurteilt werden
N0	Kein Anhalt für regionäre Lymphknotenmetastasen
N1	Metastase in solitärem Lymphknoten $\leq 2\text{cm}$ in größter Ausdehnung
N2	Metastase in solitärem Lymphknoten $> 2\text{cm}$, aber $\leq 5\text{cm}$ in größter Ausdehnung oder multiple LK $< 5\text{cm}$
N3	Metastasen in Lymphknoten $> 5\text{cm}$ in größter Ausdehnung

M - Fernmetastasen

Mx	Fernmetastasen können nicht beurteilt werden
M0	Kein Anhalt für das Vorhandensein von Fernmetastasen
M1	Fernmetastasen vorhanden

Tabelle 2: WHO-Grading des Harnblasenkarzinoms 1973.

G1 - Geringster Grad zellulärer Anaplasie, die mit der Malignitätsdiagnose vereinbar ist
G2 - Grad der Anaplasie, der zwischen G1 und G3 liegt
G3 - Schwerster Grad zellulärer Anaplasie

2004 wurde von der WHO und der International Society of Urological Pathology (ISUP) eine neue Klassifikation der nichtinvasiven Urothelkarzinome vorgestellt (Sauter G, 2004). Ziel dieser neuen Einteilung ist es, die Klassifikation des Urothelkarzinoms für alle beteiligten Pathologen, Urologen und Onkologen zu vereinfachen und zu vereinheitlichen. Bis zur Sicherung der Validität der neuen Einteilung durch klinische Studien wird empfohlen, beide Klassifikationen im Rahmen des Gradings anzugeben (Lopez-Beltran und Montironi, 2004) Die WHO/ISUP- Klassifikation unterscheidet zwischen papillären Urothelkarzinomen niedrigen malignen Potentials (papillary urothelial neoplasms of low malignant potential, PUNLMP), sowie low- und high-grade-Karzinomen (s.Tabelle 3). PUNLMP-Läsionen verfügen nicht über die zellulären Merkmale der Malignität, jedoch ordnen sich in ihnen die Urothelzellen in papillärer Formation an. Sie gelten als nicht sicher benigne und neigen zu Rezidiven.

Tabelle 3: WHO/ISUP- Klassifikation des Harnblasenkarzinoms 2004

Papilläres urotheliales Neoplasma mit niedrigem malignem Potential (PUNLMP)
Papilläres Urothelkarzinom (low-grade)
Papilläres Urothelkarzinom (high-grade)

1.1.6 Therapie, Nachsorge und Prognose

Bei oberflächlichen Neoplasien der Stadien Ta, T1 und Tis hat die transurethrale Resektion (TUR) große therapeutische Bedeutung. Die einmalige adjuvante Instillation von Zytostatika in die Blase unmittelbar nach der TUR verhindert die Implantation flottieren-

der Tumorzellen und verlängert die Progressionszeit. Die Indikation zur Instillations-therapie wird in Abhängigkeit von der Tumorgröße und –differenzierung gestellt; sie ist insbesondere auch bei Rezidivtumoren gegeben. Zur intravesikalen Rezidivprophylaxe stehen Zytostatika (Doxorubicin, Mitomycin C) und der Immunmodulator BCG (Bacillus Calmette-Guérin) zur Verfügung. Während bei Patienten mit niedrigem Progressionsrisiko die Chemo- oder Immuntherapie als gleichwertig anzusehen ist, wird bei hohem Progressionsrisiko (G3-Tumoren, Rezidivtumoren) die intravesikale Behandlung mit BCG vorgezogen.

Neuere Studien haben gezeigt, dass im Falle von High-risk-Karzinomen im Stadium T1 die Durchführung einer kombinierten Radiochemotherapie im Anschluss an eine TUR-Blase eine weitere Therapiealternative darstellen kann (Weiss et al., 2006).

Die Standardbehandlung organbegrenzter, muskelinvasiver Harnblasenkarzinome ist die radikale Zystektomie in Kombination mit einer pelvinen Lymphadenektomie. Die Lymphknotendissektion erstreckt sich auf die Fossa obturatoria und die externen iliakalen Gefäße. Das operative Vorgehen der radikalen Zystektomie beim Mann beinhaltet die Entfernung von Harnblase, Prostata und Samenblasen. Die Indikation zur Urethrektomie ist bei positivem Harnröhrenabsetzungsrand oder Tumorbefall der Harnröhre gegeben. Die radikale Zystektomie bei der Frau beinhaltet die Entfernung von Harnblase, Uterus, Adnexen und vorderer Vaginalwand. In wenigen Fällen ist bei invasiven Blasenkarzinomen eine transurethrale Tumorsektion oder eine Blasenteilresektion indiziert. Bei Patienten, die eine radikale Zystektomie ablehnen, aufgrund anderer Erkrankungen nicht für eine Operation geeignet sind oder deren Tumorleiden zu weit fortgeschritten ist, ist auch eine Bestrahlungstherapie möglich.

Die systemische Chemotherapie wird häufig vor einer Zystektomie bei Tumoren der Stadien T2-T4a durchgeführt (neoadjuvante Therapie). Auch bei metastasierten Blasentumoren erfolgt oftmals eine neoadjuvante Chemotherapie. Das am häufigsten verwendete Therapieschema ist das Gemcitabine-Cisplatin-Schema.

Insbesondere nach Zystektomie ist eine lebenslange Nachsorge notwendig. So sollten sich in den ersten zwei Jahren nach der Operation die Patienten alle drei Monate zur Untersuchung wieder vorstellen, im dritten und vierten Jahr alle sechs Monate und in den darauffolgenden Jahren jeweils einmal im Jahr.

Wichtige Prognosefaktoren sind Infiltrationstiefe, Differenzierungsgrad, Größe und Rezidivstatus des Tumors. Die 5-Jahres-Überlebensrate für Patienten mit pT2 Harnblasenkarzinom beträgt etwa 90%. Bei die Blasenwand überschreitenden Tumoren (\geq pT3b) ist die Langzeitüberlebensrate erheblich eingeschränkt: Für Patienten mit lokal fortgeschrittenen Tumoren ohne Lymphknotenbefall (pT3b, pN0, pM0) ist eine Heilungsrate von 60% zu erwarten; diese sinkt bei Lymphknotenbefall auf 20% (Goebell et al., 2006).

1.2 Zellfreie DNA im Blut

Zellfreie, im Plasma zirkulierende DNA (Desoxyribonukleinsäure) wurde erstmals vor etwa dreißig Jahren nachgewiesen (Leon et al., 1977). Es zeigte sich, dass diese frei zirkulierende DNA tumorspezifische genetische und epigenetische Veränderungen enthält. Zu diesen Veränderungen gehören Mutationen, Translokationen, Mikrosatelliten-Alterationen und CpG-Insel-Hypermethylierungen (Anker et al., 1999; Lo, 2001). Es wird daher angenommen, dass die frei zirkulierende DNA im Serum/Plasma zumindest teilweise aus Tumorzellen in die Blutbahn gelangt. Die genauen Ursachen hierfür sind unbekannt. Es wird vermutet, dass das Tumorstadium zur Hypoxie in gefäßfernen Abschnitten des Tumors führt. Vermutlich kommt es zu Apoptose und/oder Nekrose von Tumorzellen, und in der Folge zur Freisetzung von DNA in die Blutzirkulation (Jahr et al., 2001). Im Blut werden frei zirkulierende DNA-Fragmente durch Desoxyribonukleasen abgebaut (Wang et al., 2003), so dass die im Serum zirkulierende DNA stark fragmentiert ist. Gelelektrophorese-Muster zeigen, dass im Serum/Plasma von Tumorpatienten insbesondere kleine DNA-Fragmente von ca. 100-200bp Größe häufiger vorkommen als bei gesunden Kontrollprobanden. In beiden Gruppen wurden größere DNA-Fragmente in annähernd gleicher Menge detektiert. Die DNA-Intaktheit bezeichnet das Verhältnis zwischen großem und kleinem Fragment und ist also im Serum von Tumorpatienten vermindert (Wu et al., 2002).

Neben diesen qualitativen Veränderungen der frei zirkulierenden DNA sind auch quantitative Unterschiede zwischen Tumorpatienten und Gesunden bzw. Patienten mit nicht-malignen Erkrankungen nachweisbar: Patienten mit Tumorerkrankungen haben ca. 4-10fach erhöhte Mengen freier DNA im Serum/Plasma (Wu et al., 2002).

1.3 DNA-Hypermethylierung

DNA kann durch natürlich vorkommende chemische Reaktionen verändert werden, indem eine Methylgruppe an das Ringsystem der Base Cytosin in C-5-Position kovalent gebunden wird. Da die DNA-Sequenz durch diese Alterationen bestehen bleibt, ist die DNA-Methylierung keine Mutation, sondern zählt zu den epigenetischen Veränderungen. Bei Säugetieren tritt diese Modifikation nur an CpG-Dinukleotiden auf. Dieser Begriff beschreibt eine aus zwei Nukleotiden bestehende Gensequenz, bei der eine Guaninbase unmittelbar auf eine Cytosinbase folgt. Rein statistisch beträgt die Wahrscheinlichkeit, eine solche Frequenz in einem DNA-Abschnitt zu finden etwa sechs Prozent, tatsächlich ist die Häufigkeit von CpG-Dinukleotiden jedoch wesentlich geringer. Hiervon ausgenommen sind der Promotorbereich und die ersten Exons eines Genes. Hier entspricht die Anzahl der CpG-Dinukleotiden der zu erwartenden Häufigkeit oder übertrifft diese sogar. Diese Abschnitte werden als CpG-Inseln bezeichnet und sind charakteristischerweise meist nicht methyliert. Im Gegensatz dazu sind die CpG-Nukleotide außerhalb einer CpG-Insel meist methyliert (Robertson und Wolffe, 2000).

Die DNA-Methylierung wird durch drei DNA-Methyltransferasen (DNMT 1, 3a und 3b) reguliert, indem die Methylgruppen von S-Adenosyl-Methionin (SAM) auf die DNA übertragen werden (s. Abbildung 2). Dabei ist die DNMT 1 vor allem für die Beibehaltung bereits vorhandener Methylierungsmuster nach der DNA-Replikation verantwortlich (Maintenance-Methyltransferasen). Der DNMT 3a und 3b wird eine De-novo-Methylierungsfunktion zugeschrieben. Die beiden Isoenzyme bauen in der frühen Embryonalentwicklung ein spezifisches Methylierungsmuster auf. Dieser Vorgang wird als genomisches Imprinting bezeichnet.

Als Folge der Methylierung kommt es zu einer Veränderung der Packungsdichte der DNA, durch die die Transkription der DNA-Sequenz verhindert werden kann (epigenetisches Silencing). Vermittelt wird dieser Vorgang durch Methylcytosin-bindende Proteine, die durch Interaktion mit Histon-modifizierenden Enzymen (z.B. Histondeacetylasen, Histon-Lysin-Methylasen) die Chromatinstruktur verändern (Herman und Baylin, 2003; Lachner et al., 2003).

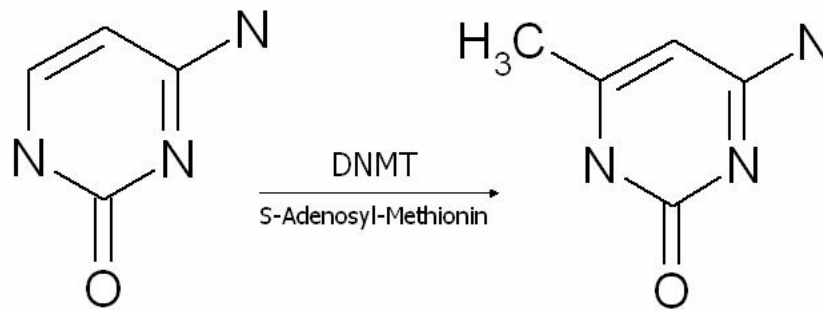


Abbildung 2: Cytosin und 5-Methylcytosin.

Die DNA-Methyl-Transferase (DNMT) überträgt einen Methylrest von S-Adenosyl-Methionin auf die C-5-Position einer Cytosinbase.

1.3.1 Physiologische Bedeutung der DNA-Hypermethylierung

Die DNA-Hypermethylierung hat physiologischerweise die Aufgabe, das Genom vor fremder DNA zu schützen. Die Methyltransferasen erstellen ein typisches Methylierungsmuster und halten es auch nach Replikation von DNA-Strängen aufrecht. Restriktionsenzyme und andere Nukleasen erkennen fremde DNA, da sie ein anderes Methylierungsmuster enthält, entfernen und verdauen sie.

Die Promotorhypermethylierung als Ursache der Transkriptionshemmung eines Gens kommt zum Einsatz im Rahmen des genomischen Imprintings. Dieses stellt ein Vererbungsprinzip dar, welches nicht den Mendelschen Gesetzen gehorcht. Durch diese epigenetische Prägung ist eines der zwei elterlichen Allele imprinteter Gene aktiv und das andere inaktiv. Diese elterlichen Prägungen werden in den frühen Keimzellen jedes Menschen gelöscht und wieder geschlechtsspezifisch etabliert - die epigenetische Kodierung imprinteter Gene ist also reversibel. Sie kommt jedoch nur bei weniger als einem Prozent der menschlichen Gene vor.

1.3.2 Hypermethylierung im Rahmen von Tumorerkrankungen

Abweichende De-Novo-Methylierung von CpG-Inseln in Promotorbereichen regulatorischer Genabschnitte durch DNA-Methyltransferasen 3a/b ist ein Kennzeichen maligner Tumoren (s. Abbildung 3). Sie findet sich oft schon früh im Rahmen der Karzinogenese (Jones und Baylin, 2002). Dadurch kommt es häufig zur Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen und zu einem unkontrollierten Wachstum der auf diese Weise verän-

dernten Zellen. Die Ursachen der aberranten CpG-Insel Hypermethylierung sind nicht bekannt.

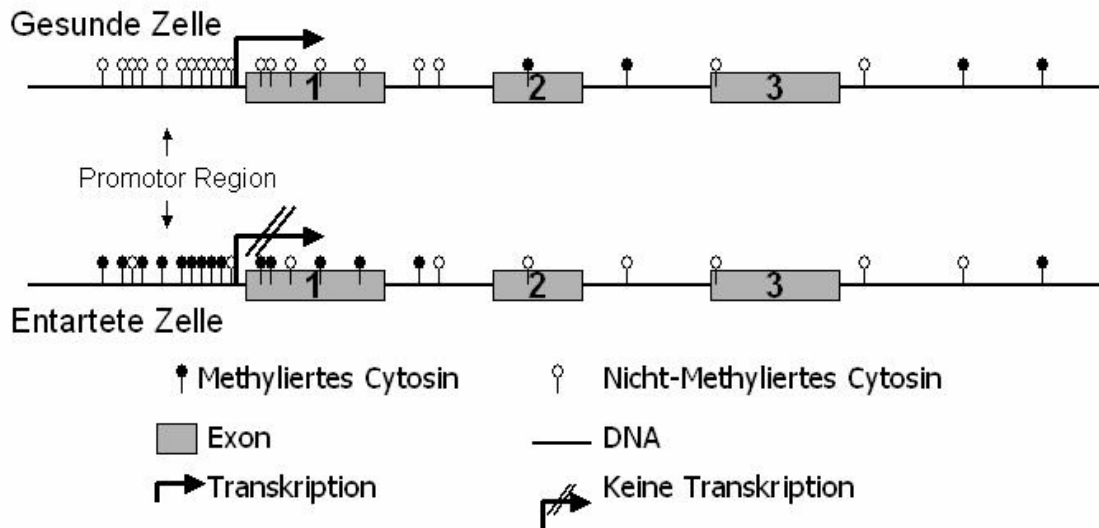


Abbildung 3: Promotorhypermethylierung in Karzinomzellen.

In der gesunden Zelle ist das betrachtete Gen im Promotorbereich nicht methyliert und wird exprimiert. In einer Tumorzelle kommt es zur aberranten Hypermethylierung der CpG-Dinukleotide im Promotorbereich. Dies führt zu einer verminderten Genexpression.

Dem gegenüber steht eine generelle Hypomethylierung von CpG-Dinukleotiden außerhalb von CpG-Inseln in vielen Tumorerkrankungen, deren Ursachen ebenfalls noch nicht geklärt sind (Esteller et al., 2001; Feinberg und Vogelstein, 1987). Diese führt zu einer Minderung der genetischen Stabilität und geht mit einer erhöhten Zahl an Mutationen einher. Weitere Effekte sind die Expression von Genen, die physiologischerweise gehemmt sind (z.B. imprintete Gene) und die Destabilisierung von Chromosomen im perizentromeren Bereich (Nakagawa et al., 2005).

Im Gegensatz zu Mutationen sind DNA-Hypermethylierungen potentiell reversibel; dies ist eine Eigenschaft, die sich neuere Therapieansätze zunutze machen. Es wird versucht, die epigenetischen Veränderungen durch gezielten Medikamenteneinsatz rückgängig zu machen. Die Substanzen 5-Azacytidin und 5-Aza-2'-Desoxycytidin beispielsweise werden durch Kinasen metabolisiert und in die DNA eingebaut. Dort hemmen sie die DNMTs, wodurch zuvor inhibierte Gene wieder reaktiviert werden können (Issa et

al., 2004). Ein weiterer Wirkstoff ist das MG98, ein hemmendes Antisense-Oligonukleotid der DNMT 1, welches sich bereits in Phase-II-Studien zur Behandlung des Nierenkarzinoms befindet (Winqvist et al., 2006).

1.4 Promotorhypermethylierung beim Blasenkarzinom

Analog zu anderen Tumorerkrankungen wurden auch beim Blasenkarzinom verschiedene Tumorsuppressorgene auf ihren Methylierungsstatus hin untersucht. Die Tabelle 4 gibt einen kurzen Überblick über die in der hier vorgelegten Studie betrachteten Gene. Weitere häufig untersuchte Genorte sind *p16* (Chan et al., 2003; Valenzuela et al., 2002), *p14* (Dulaimi et al., 2004; Hoque et al., 2006) und *RASSF1a* (Catto et al., 2005; Chan et al., 2003). Jedes dieser Proteine ist ein Bestandteil der regulatorischer Signalwege der Karzinogenese und bei gesunden Probanden wenig oder gar nicht methyliert. Es wurde schon vielfach versucht, anhand der Höhe der Methylierung verbindliche Aussagen über das TNM-Stadium oder die Prognose des Patienten zu machen. Die Ergebnisse ließen in den meisten Fällen solche Schlussfolgerungen nicht zu (Friedrich et al., 2004; Valenzuela et al., 2002). Nur wenige Arbeitsgruppen konnten einen Zusammenhang zwischen Grad der Methylierung und Invasivität oder Rezidivrate des Tumors feststellen (Catto et al., 2005; Dominguez et al., 2002; Hoque et al., 2006).

Tabelle 4: Methylierungsstatus einiger Gene beim Blasenkarzinom .

Genort	Autor, Jahr	Material	Fallzahl	(%)	Methode
<i>GSTP1</i>	(Dhawan et al., 2006)	Tumorgewebe	104	(6,9)	MSP
	(Catto et al., 2005)	Tumorgewebe	106	(0,0)	MSP
	(Hoque et al., 2006)	Tumorgewebe	15	(47,0)	QMSP
	(Maruyama et al., 2001)	Tumorgewebe	98	(11,0)	MSP
	(Gutierrez et al., 2004)	Tumorgewebe	41	(3,0)	MSP
	(Chan et al., 2002)	Tumorgewebe	98	(5,1)	MSP
	(Tada et al., 2002)	Tumorgewebe	55	(13,0)	MSP
	(Yates et al., 2006)	Urin	35	(3,0)	QMSP
	(Hoque et al., 2006)	Urin	175	(43,0)	QMSP

<i>APC</i>	(Maruyama et al., 2001)	Tumorgewebe	98	(35,0)	MSP
	(Gutierrez et al., 2004)	Tumorgewebe	41	(26,0)	MSP
	(Hoque et al., 2006)	Tumorgewebe	15	(73,0)	qMSP
	(Dulaimi et al., 2004)	Tumorgewebe	45	(68,9)	MSP
	(Yates et al., 2006)	Urin	35	(40,0)	qMSP
	(Dulaimi et al., 2004)	Urin	45	(55,6)	MSP
<i>DAPK</i>	(Catto et al., 2005)	Tumorgewebe	106	(8,0)	MSP
	(Maruyama et al., 2001)	Tumorgewebe	98	(4,0)	MSP
	(Neuhausen et al., 2006)	Tumorgewebe	96	(29,0)	MSP
	(Gutierrez et al., 2004)	Tumorgewebe	41	(58,0)	MSP
	(Chan et al., 2002)	Tumorgewebe	98	(58,2)	MSP
	(Christoph et al., 2007)	Tumorgewebe	34	(70,5)	qMSP
	(Tada et al., 2002)	Tumorgewebe	55	(29,0)	MSP
	(Yates et al., 2006)	Urin	35	(6,0)	qMSP
	(Friedrich et al., 2004)	Urin	37	(22,0)	qMSP
	(Chan et al., 2002)	Urin	22	(45,5)	MSP
<i>Reprimo</i>	(Takahashi et al., 2005)	Tumorgewebe	58	(19,0)	MSP
<i>TIG1</i>	(Tokumaru et al., 2003)	Zelllinien	3	(0,0)	MSP
<i>PTGS2</i>	(Friedrich et al., 2005)	Tumorgewebe	105	(75,2)	qMSP

MSP: Methylierungssensitive PCR, qMSP: quantitative methylierungssensitive PCR; APC, adenomatosis polyposis coli; DAPK, Death-associated proteine kinase ; TIG1, tazarotene induced gene 1 ; PTGS2, prostaglandine synthetase 2 ; GSTP1, glutathione transferase class-pi 1

Aberrante Promotorhypermethylierung freier DNA in Serum/Plasma wurde in verschiedenen Tumorentitäten einschließlich des Blasenkarzinoms nachgewiesen (Dominguez et al., 2002; Esteller et al., 1999; Sanchez-Cespedes et al., 2000; Valenzuela et al., 2002). Der präoperative Nachweis von Hypermethylierung in Serum-DNA war zudem in einigen Studien (Kolonkarzinom (Wallner et al., 2006), Mammakarzinom (Muller et al., 2003), Zervixkarzinom (Widschwendter et al., 2004), Prostatakarzinom (Bastian et al.,

2005b)) mit einer ungünstigen Prognose assoziiert und erlaubt einen Rückschluss auf den Therapieerfolg.

1.5 Zielsetzung

Der Zeitpunkt der Diagnosestellung ist von entscheidender Bedeutung für die Prognose des Blasenkarzinoms: Nur in einem frühen Stadium ist eine blasenerhaltende Therapie möglich. Die Therapie muskelinvasiver Blasenkarzinome macht eine Zystektomie notwendig. Dennoch ist die Prognose bei extravasikalen bzw. metastasierten Tumoren ungünstig. Bisher zur Verfügung stehende diagnostische Tests haben eine eingeschränkte Sensitivität oder besitzen nur eine begrenzte prognostischen Aussagekraft.

Frei zirkulierende DNA lässt sich regelhaft in Serum/Plasma detektieren. Dabei hat sich gezeigt, dass die Menge freier DNA bei Patienten mit unterschiedlichen Tumorentitäten im Vergleich zum Gesunden erhöht ist, während die Intaktheit der freien DNA-Fragmente vermindert ist. Darüber hinaus lassen sich in der freien DNA tumorspezifische Veränderungen nachweisen. Bislang wurden jedoch noch keine Untersuchungen zur Konzentration der freien DNA im Serum und ihrer Intaktheit bei Blasenkarzinompatienten durchgeführt. In dieser Studie soll die diagnostische und prognostische Aussagekraft der Eigenschaften von freier DNA bei Blasenkarzinompatienten untersucht werden:

- 1) Mit Hilfe einer Real-Time-Polymerase-Kettenreaktion (rt-PCR) sollen in dieser Studie die Konzentrationen von kleinen und großen DNA-Fragmenten im Serum von 45 Blasenkarzinompatienten und 45 Patienten mit benigner Prostatahyperplasie bestimmt werden. Aus dem Verhältnis von großen zu kleinen DNA-Fragmenten soll auf die DNA-Intaktheit geschlossen werden.
- 2) Eine frühe und häufige Veränderung in der Karzinogenese des Blasenkarzinoms stellt die DNA-CpG-Insel-Hypermethylierung dar. Nach Behandlung der zellfreien DNA mit methylierungssensitiven Restriktionsenzymen soll eine Quantifizierung der hypermethylierten Serum DNA mit einer Real-Time-PCR durchgeführt werden. Bisherige Studien an Gewebeproben lassen vermuten, dass die Sensitivität eines diagnostischen Tests durch eine Multigen-Analyse gesteigert werden kann. Es sollen daher die CGI-Hypermethylierung von sechs Kandidaten-Genen (*APC*, *DAPK*, *GSTP1*, *PTGS2*, *Reprimo*, *TIG1*) untersucht werden.

- 3) Mit Hilfe von Receiver-Operator-Curve-Analysen (ROC) sollen die diagnostischen Eigenschaften von DNA-Konzentration, DNA-Integrität und DNA-Hypermethylierung im Serum bestimmt werden. Es soll weiterhin überprüft werden, ob Veränderungen der freien Serum-DNA bei Tumorpatienten eine prognostische Bedeutung haben. Hierzu soll auf Korrelationen mit klinisch-pathologischen Parametern bzw. dem rezidivfreien/karzinomspezifischen Überleben getestet werden.

Der Vorteil dieser Methode besteht vor allem in der nur wenig invasiven Gewinnung des Serums durch eine einfache Blutentnahme. Sollte es gelingen, anhand der erhobenen Daten nicht nur die Diagnose eines Urothelkarzinoms zu sichern, sondern auch Aussagen bezüglich des Tumortyps, seiner Invasivität, Metastasierung oder Prognose zu treffen, könnte dies langfristig zu einer Vereinfachung und Erleichterung der Diagnostik des Blasenkarzinoms führen.

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Geräte

8-Kanal-Pipette (1-10 µl)	Biozym Scientific, Oldendorf, Deutschland
ABI Prism 7900 HT Sequence Detection System	Applied Biosystems, Foster City, California, USA
Analysenwaage BP 2100 S	Sartorius, Göttingen, Deutschland
Gel Dokumentationsanlage mit Kamera Classic Uno	Intas, Göttingen, Deutschland
Horizontalelektrophoresekammer Sub-cell GT Basic	Biorad Laboratories, Hercules, California, USA
Mikrozentrifuge Sigma 1-15	Sigma-Aldrich, Seelze, Deutschland
Multipette plus	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Spannungsquelle PowerPac 100	Biorad Laboratories, Hercules, California, USA
Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Tischzentrifuge Sigma 4-K15	Sigma-Aldrich, Seelze, Deutschland
Transferpette digital (1-10 µl, 2-20 µl, 10-100 µl, 20-200 µl)	Brand, Wertheim, Deutschland
UV-Photometer Ultraspec 3000	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Vortex-Genie 2	Scientific Industries, New York, USA

2.1.2 Labormaterialien

Falcon Tubes (15 ml, 50 ml)	Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland
Monovette EDTA 9 ml	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
PCR-Tubes (0,2 ml)	ABGene, Epsom, England
Pipettenspitzen (10 µl, 20 µl, 100 µl,	Biozym Scientific, Oldendorf, Deutschland

200 µl, 1000 µl)

Safe-Lock Tubes (0,5 ml, 1,5 ml, 2,0 ml)	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
S-Monovette Kanüle	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Thermo-Fast 384-Well-PCR Platten	ABGene, Epsom, England
Monovette Gel 9ml	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland

2.1.3 Chemikalien

Die nachfolgend genannten Chemikalien wurden in Analysequalität und im höchsten erhältlichen Reinheitsgrad erworben und nach den Herstellervorschriften gelagert.

Deionisiertes Wasser aus Reinstwassersystemanlage Milli-Q biocel	Millipore, Molsheim, Frankreich
Diethylpyrocarbonat (DEPC)-Wasser	Ambicon, Austin, Texas, USA
DNA Längenstandard 10 bp	Invitrogen, Paisley, England
Ethanol absolut	VWR, Darmstadt, Deutschland
Ethylendinitrilotetraacetat (EDTA)	Sigma-Aldrich, Seelze, Deutschland
Fluoreszenzfarbstoff GelStar	Biozym Scientific, Oldendorf, Deutschland
Tris-Hydrochlorid (Tris-HCL)	Fluka, Buchs, Schweiz
Ultrapure 10xTBE-Buffer	Invitrogen, Paisley, England

2.1.4 Kits

QIAamp DNA Mini Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
QIAamp Ultra Sens Virus	Qiagen, Hilden, Deutschland
SYBR GreenER PCR Master Mix	Invitrogen, Paisley, Schottland
GenomePhi DNA Amplification Kit	GE Healthcare, München, Deutschland

2.1.5 Enzyme

SssI CpG Methylase	NEB, Frankfurt, Deutschland
HpaII	NEB, Frankfurt, Deutschland
HinP1 I	NEB, Frankfurt, Deutschland

2.1.6 Primer

Alle Primersequenzen wurden von der Firma Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland, im Reinheitsgrad „desalted“ bezogen. Sie wurden in 1mM Tris-HCl gelöst, aliquotiert und bei -20°C gelagert.

Die Primer wurden aus den Ensembl Human Gene View-Einträgen abgeleitet (*APC*: ENSG00000134982, *DAPK*: ENSG000000196730, *GSTP1*: ENSG00000084207, *PTGS2*:ENSG00000073750, *Reprimo*: ENSG00000177519, *TIG1*: ENSG00000099917) mit Hilfe des Programms Primer 3 abgeleitet (s. Tabelle 5).

Tabelle 5: Primersequenzen der untersuchten Gene.

5' - Primersequenz - 3'

APC	Forward	GGAGAGAGAAGCAGCTGTGTAAT
	Reverse	CAGCCACATGTCGGTAC
DAPK	Forward	GGGCAGCTTAGCAATGTGTC
	Reverse	TCTACCGCGCACACCCC
GSTP1	Forward	TCTACCGCGCACACCCC
	Reverse	ACTCACTGGTGGCGAAGACT
PTGS2	Forward	GGAGAGGAAGCCAAGTGTCC
	Reverse	GGTTTCCGCCAGATGTCTTT
TIG1	Forward	GGCGCTTCACTTCTTCAACT
	Reverse	CTCGGCCAGCACTCGTAG
Reprimo	Forward	GCGCTAGTCTGCGAGTGAG
	Reverse	CGCGCATTATGTACAGGCTA

2.1.7 Software

Microsoft Office 2000	Microsoft, Seattle, USA
Primer Express 2.0	Applied Biosystems, Foster City, California, USA
SDS Software Version 2.1	Applied Biosystems, Foster City, California, USA
Statistical package of social science (SPSS) Version 11.5	SPSS Inc., Chicago, Illinois, USA

2.1.8 Probenmaterial

Die Serumproben stammten von 45 Patienten mit nachgewiesenem Blasenkarzinom, die sich zwischen 1996 und 2007 in der Klinik und Poliklinik für Urologie der Universitätskliniken einer radikalen Zystektomie unterzogen. 32 der Patienten litten an einem Urothelkarzinom (TCC), 3 an einem Plattenepithelkarzinom (SCC) und 10 an einem Urothelkarzinom in Kombination mit einem Prostatakarzinom (PCA, s. Tabelle 6). Die Kontrollgruppe bestand aus 45 Patienten mit bekannter benigner Prostatahyperplasie (BPH), bei denen eine transurethrale Resektion der Prostata (TUR-P) durchgeführt wurde. Ein mögliches begleitendes Urothelkarzinom wurde durch die im Rahmen der TUR-P durchgeführte Zystoskopie ausgeschlossen. Die histologische Aufarbeitung des in der TUR-P entfernten Gewebes konnte ein koinzidentes Prostatakarzinom mit hoher Wahrscheinlichkeit ausschließen.

Bereits existierende Studien verglichen die Menge frei im Blut zirkulierender DNA in Abhängigkeit vom Geschlecht und vom Alter der Probanden. Die Ergebnisse scheinen darauf hinzuweisen, dass keine signifikanten Unterschiede bezüglich der DNA-Konzentration bestehen (Zhong et al., 2007)

Das Blut wurde jeweils unmittelbar präoperativ gewonnen und in Serum S-Monovetten mit Gerinnungsaktivator und Gel (Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland) gelagert. Nach mindestens 60 Minuten Lagerung wurden die Proben für 10 Minuten bei 1800g zentrifugiert. Danach wurde das Serum isoliert und bei -80° gelagert.

Tabelle 6: Klinisch-pathologische Parameter der Patienten .

	TCC n=32 (%)	TCC + PCA n=10 (%)	SCC n=3 (%)	BPH n=45 (%)
Alter				
Median	66,5	72,0	61,0	69,0
Mittelwert	64,6	70,5	54,67	68,4
Spannweite	40-86	58-85	40-63	55-83
Geschlecht				
Männlich	26 (81,2)	10 (100)	2 (66,6)	
Weiblich	6 (18,8)	0 (0,0)	1 (33,3)	
Urinzytologie				
Positiv	1 (3,1)	3 (33,3)	0 (0,0)	
Negativ	11 (34,4)	0 (0,0)	1 (33,3)	
Nicht durchgeführt	20 (93,8)	7 (66,7)	2 (66,7)	
Grading (BCA)				
G1	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	
G2	7 (21,9)	1 (10,0)	2 (66,7)	
G3	25 (78,1)	9 (90,0)	1 (33,3)	
Begleitende Cis-Läsion				
	8 (25,0)	2 (20,0)	0 (0,0)	
Stadium (BCA)				
pT0	1 (3,1)	0 (0,0)	0 (0,0)	
pT1	9 (28,1)	2 (20,0)	0 (0,0)	
pT2	5 (15,6)	1 (10,0)	0 (0,0)	
pT3	12 (37,5)	4 (40,0)	3 (100)	
pT4	5 (15,6)	3 (30,0)	0 (0,0)	
Multifokalität				
	10 (31,3)	1 (10,0)	1 (33,3)	
Lymphangiome				
	8 (25,0)	5 (50,0)	0 (0,0)	
Hämangiome				
	6 (18,8)	2 (20,0)	0 (0,0)	
Lymphknotenbefall				
	7 (21,9)	5 (50,0)	0 (0,0)	
Positiver Schnitttrand				
	6 (18,8)	2 (20,0)	1 (33,3)	
Stadium (PCA)				
pT2		10 (100)		
Gleason score (PCA)				
3		4 (40,0)		
4		2 (20,0)		
5		3 (30,0)		
6		1 (10,0)		

Erklärung zu Tabelle 6: TCC=Urothelkarzinom; SCC=Plattenepithelkarzinom; PCA=Prostatakarzinom, BCA= Blasenkarzinom, BPH= benigne Prostatahyperplasie.

Es wurde bereits gezeigt, dass sich in Serumproben eine sechsfach höhere Menge frei zirkulierender DNA nachweisen lässt als in Plasmaproben und dass sich dieser Unterschied nicht durch Verunreinigungen erklären lässt (Umetani et al., 2006b). Daher diene in dieser Studie Serum als Probenmaterial, da die höheren Konzentrationen vermutlich eine genauere Quantifizierung der zellfreien DNA-Mengen und auch der Tumor-DNA ermöglichen.

Die durchgeführten Studien wurden auf Grundlage der revidierten Deklaration von Helsinki des Weltärztebundes von 1983 und den geltenden gesetzlichen Vorgaben durchgeführt. Die Ethikkommission der Universität Bonn erteilte die Genehmigung zu dieser Studie. Alle Patienten gaben ihr schriftliches Einverständnis zu den Untersuchungen.

2.2 Methoden

2.2.1 DNA-Isolation

Die frei zirkulierende DNA im Patientenserum wurde mittels des QIAamp Ultrasens Virus Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) isoliert und konzentriert. Dazu wurden zunächst 2ml des Serums mit AC-Puffer versetzt. Bestandteile des AC-Puffers bilden Komplexe mit den Nukleinsäuren der DNA, die sich nach Zentrifugation als Pellet absetzen. Nach Entfernung des Überstandes wurde das Pellet mittels Hinzugabe von AR-Puffer und Proteinase K resuspendiert und für 10 Minuten bei 40°C inkubiert. Die Proteinase K ist eine Serinprotease, die verunreinigende Proteine und auch DNAsen zersetzt. Für die DNA-Konzentrierung wurde das Lysat mit AB-Puffer versetzt und auf die QIAamp Spin Säule aufgetragen. Während der darauf folgenden Zentrifugation konnte die DNA selektiv an die QIAamp-Membran binden. In mehreren Waschschrritten wurden die verbliebenen Verunreinigungen entfernt und die DNA in AVE-Puffer gelöst.

Die so gewonnenen Proben wurden bei –80°C gelagert.

2.2.2 Kontrollproben

Zur Herstellung von methylierten und unmethylierten Kontrollproben wurde einem gesundem Freiwilligen 9 ml Blut in einem EDTA-Röhrchen entnommen und bei 1900g für 20 Minuten bei 4°C zentrifugiert. Die Leukozytenfraktion wurde entnommen und ihre DNA mit dem Qiagen DNA Mini Kit isoliert.

Zur Herstellung einer unmethylierten Negativkontrolle wurden 10ng der isolierten DNA mit dem GenomiPhi Amplification Kit (Amersham Bioscience, Freiberg, Deutschland) behandelt. Dieses enthält DNA-Polymerasen und unspezifische Primer, jedoch keine Methyltransferasen oder Methylendonatoren. Die so vorbereitete DNA wurde mittels zweier im Anschluss durchgeführter PCRs zwar amplifiziert, aber aufgrund des fehlenden Methylcytosins im Reaktionsmix ist die komplette DNA unmethyliert.

Weitere 2µg der Leukozyten-DNA wurden mit 10 U des Enzyms SssI-CpG-Methylase und dem Methylgruppendonator S-Adenosyl-Methionin (SAM) für 60 Minuten bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde das Enzym bei 56°C inaktiviert und die DNA mit Hilfe des QiaQuick PCR Purification Kit aufgereinigt. Diese an den CpG-Dinukleotiden universell methylierte DNA diente als Positivkontrolle.

2.2.3 Restriktionsenzymbehandlung

Restriktionsendonukleasen sind Enzyme, welche DNA innerhalb einer bestimmten Sequenz schneiden können. Dabei erkennt jedes Restriktionsenzym eine spezifische Basensequenz. Methylierungssensitive Restriktionsenzyme schneiden jedoch nur dort, wo keine Methylierung der Cytosin-Basen vorhanden ist.

In dieser Studie werden die beiden Endonukleasen HpaII und HinP1I eingesetzt. Sie schneiden DNA-Bruchstücke charakteristischerweise an CCGG- (HpaII) und an GCGC- (HinP1I) Sequenzen, sofern die Cytosine in nicht-methylierter Form vorliegen (s. Abbildung 4).

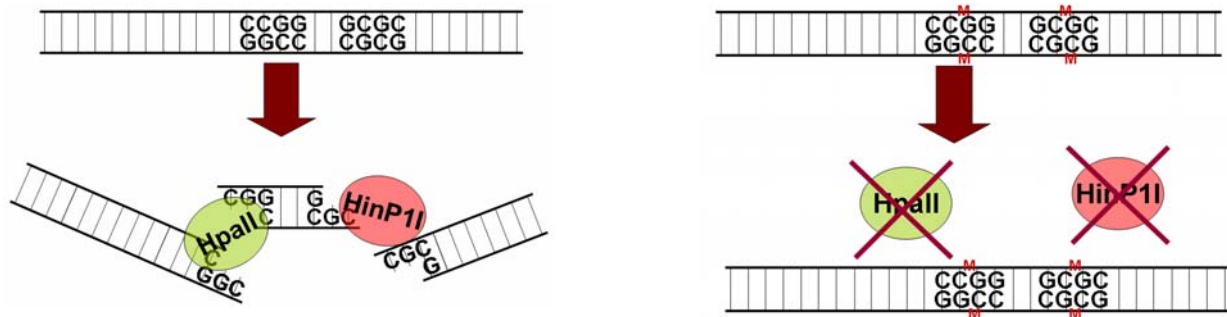


Abbildung 4: Funktionsweise der Restriktionsenzyme HpaII und HinP1I.

Die Restriktionsendonukleasen HpaII und HinP1I arbeiten methylierungsspezifisch. Sie schneiden DNA nur innerhalb bestimmter DNA-Sequenzen (links). Falls diese Erkennungssequenzen Methylierungen aufweisen, wird die Enzymaktivität blockiert (rechts).

Für die Restriktionsenzymbehandlung wurden 20 µl des aus dem Serum gewonnenen DNA-Eluates mit 50 U HpaII und 50 U HinP1I versetzt, in NEBuffer 1 gelöst und durch DEPC-Wasser zu einem Gesamtvolumen von 50 µl ergänzt. Danach wurden die Proben für 4 Stunden bei 37°C inkubiert. Im Anschluss erfolgte die Zugabe von je weiteren 10 U HpaII und HinP1I, um eine vollständige Fragmentierung unmethylierter Sequenzen zu gewährleisten. Nach Inkubation für weitere 12 Stunden wurden die Enzyme durch Erhitzen auf 65°C für 20 Minuten inaktiviert. Auf gleiche Weise wurde mit jeweils 500 ng der Positiv- und Negativkontrolle verfahren. Abschließend wurden die Proben aliquotiert und bei -20°C gelagert.

2.2.4 Primerdesign

Um die CpG-Insel-Hypermethylierung im Promotorbereich der Kandidatengene zu detektieren, wurden Primersequenzen entworfen, die mindestens eine Erkennungssequenz der Restriktionsendonukleasen umgeben. Das Primerdesign erfolgte unter Zuhilfenahme der Software Primer 3 (Rozen S und Skaletzky H, 2000). In Abbildung 5 sind die Ausschnitte aus der Promotorregion der untersuchten Gene inklusive der Erkennungssequenzen der Restriktionsendonukleasen und der Primerbindungsstellen dargestellt.

▲ bezeichnet die Erkennungssequenz der Endonuklease HpaI, ▲ bezeichnet die Erkennungssequenz der Endonuklease HinfI; >>> Bindungsstelle Forward Primer; <<< Bindungsstelle Reverse Primer

2.2.5 Quantitative Polymerase-Kettenreaktion

Die PCR stellt ein Verfahren zur Amplifikation einer definierten DNA-Sequenz dar.

Hierzu werden Primer erstellt, die die Zielsequenz festlegen, indem sie sich ihr zu beiden Seiten anlagern. Die zu amplifizierenden DNA-Proben werden mit einer hitzestabilen DNA-Polymerase versetzt, um die festgelegten Sequenzen zu replizieren. Außerdem müssen Desoxynukleotidtriphosphate hinzugefügt werden, da sie die Bausteine für die neu synthetisierten DNA-Stränge darstellen.

Eine PCR umfasst gewöhnlich 25-50 Zyklen, wobei jeder Zyklus aus drei Einzelschritten besteht: Zunächst wird die doppelsträngige DNA erhitzt, um die Stränge zu trennen (Denaturierung). Nach der Trennung der Stränge wird die Temperatur gesenkt, so dass die Primer sich an die DNA-Einzelstränge anlagern können (Annealing). Schließlich synthetisiert die DNA-Polymerase einen komplementären DNA-Strang an die Matrize (Elongation).

Bei einer quantitativen Real-Time-PCR entsteht durch einen Fluoreszenzfarbstoff ein Signal, dessen Intensität mit der DNA-Menge korreliert. Zur Detektion wurde in dieser Studie der interkalierende DNA-Farbstoff SYBR Green verwendet, dessen Fluoreszenz nach Einlagerung in doppelsträngige DNA zunimmt. Auf diese Weise wurde nach jedem Zyklus die DNA-Menge gemessen. Die Verwendung des Farbstoffes SYBR Green ermöglicht die Durchführung einer Schmelzpunktanalyse, mit der die Echtheit eines PCR-Produkts überprüft werden kann. Durch kontinuierliche, langsame Erhöhung der Temperatur wird das doppelsträngige PCR-Produkt aufgeschmolzen. Bei einer für das Fragment spezifischen Schmelztemperatur zerfällt der Doppelstrang wieder in zwei Einzelstränge. Dabei wird der Fluoreszenzfarbstoff freigesetzt und eine Fluoreszenzabnahme registriert.

Ein exponentieller und daher quantifizierbarer Anstieg der Fluoreszenz findet sich in der linearen Amplifikationsphase. Der CT-Wert (Cycle Threshold = "Schwellenwert-Zyklus") beschreibt den Zyklus, an dem die Fluoreszenz erstmalig signifikant über die Hintergrund-Fluoreszenz ansteigt (Abbildung 6). Die Quantifizierung der DNA in einer Probe

ist mit Hilfe einer Standardkurve möglich (Abbildung 7). Hierbei wird aus einer Probe mit bekannter Kopienzahl eine Verdünnungsreihe hergestellt, und diese amplifiziert. Durch Auftragen der Ausgangsmenge der bekannten Probe gegen den CT-Wert kann mit der Geradengleichung für jede unbekannte Probe die Kopienzahl bestimmt werden.

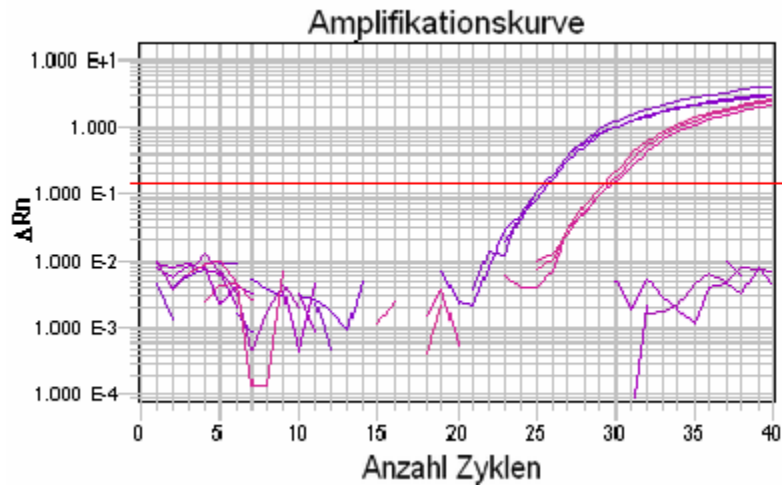


Abbildung 6: Amplifikationskurve.

Die Fluoreszenz wird gegen die Anzahl der Zyklen aufgetragen. Der ct-Wert (Cycle Threshold = "Schwellenwert-Zyklus") beschreibt den Zyklus, an dem die Fluoreszenz erstmalig signifikant über die Hintergrund-Fluoreszenz ansteigt.

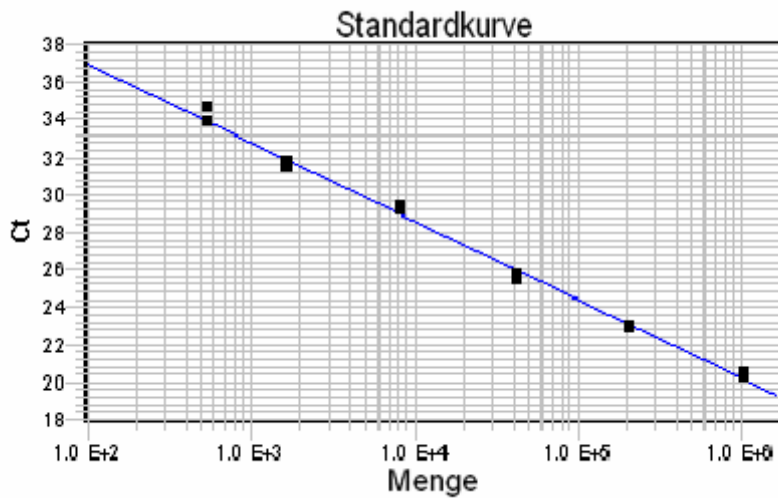


Abbildung 7: Standardkurve.

Zur Errechnung der Standardkurve wird der ct-Wert gegen die Konzentration einer bekannten Probe aufgetragen. Hieraus kann für jede unbekannte Probe die eingesetzte Kopienzahl berechnet werden.

Die PCR wurde auf einem ABI Prism 7900HT (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) mit einem Probenvolumen von je 10µl in 384 Well-Platten durchgeführt. Es erfolgte jeweils eine Dreifachbestimmung. Ein Reaktionsansatz bestand aus 1µl der DNA-Probe, je 200nM Forward und Reverse Primer und 1xSYBR GreenER Master Mix (In-vitrogen). In jedem Experiment wurde neben Standards zur Ermittlung der Standardkurve eine Positiv-, eine Negativ- und eine „No template control“ untersucht. Es wurde folgendes PCR-Protokoll angewandt:

1. Hotstart: 95°C für 10 min
2. 40 Zyklen:
 - i. Denaturierung: 95°C für 15s
 - ii. Annealing/Elongation: 60°C für 60s
3. Schmelzkurvenanalyse

Im Rahmen der Enzymbehandlung wurden nicht-methylierte DNA-Doppelstränge im Bereich der Erkennungssequenzen von den Restriktionsendonukleasen geschnitten, während methylierte Sequenzen intakt blieben. Während der PCR konnten daher nur die methylierten DNA-Stränge amplifiziert werden.

2.2.6 Gelelektrophorese

Um DNA-Fragmente nach ihrer Größe aufzutrennen und sichtbar zu machen wurden diese auf ein 3%iges Agarosegel aufgebracht und mit dem Fluoreszenzfarbstoff Gelstar (Biozym Scientific, Oldendorf, Deutschland) sichtbar gemacht. Die Agarose wurde in 1x TBE aufgekocht und in einen horizontalen Gelgießstand gegossen. Nach Erkalten des Gels wurden in die vorgeformten Vertiefungen 15µl der Probe, sowie 1x DNA-Ladepuffer und 1x Gelstar zugegeben. Die Elektrophorese wurde bei 100V durchgeführt, nach 60-90 Minuten wurden die Produkte unter einer UV-Lampe sichtbar gemacht und photographiert.

Abbildung 8 zeigt exemplarisch, dass die Primer über einen großen Bereich eine lineare Amplifikation der DNA ermöglichen. Die Schmelzkurvenanalyse und die Auftrennung der PCR Produkte mittels Gelelektrophorese zeigt, dass es sich um die erwarteten, spezifische Produkte handelt.

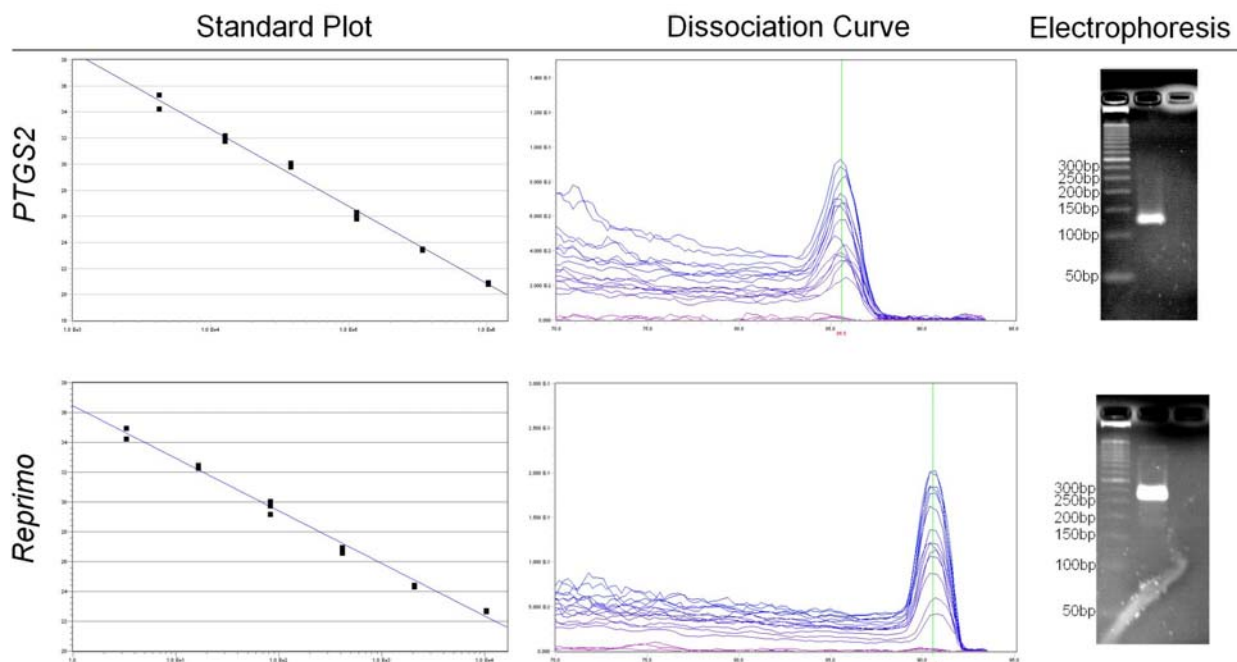


Abbildung 8: Polymerase-Kettenreaktion der PTGS2 und Reprimo DNA Fragmente.

Links: Standardkurve; Mitte: Schmelzkurve; Rechts: Gelelektrophorese. Oben PTGS2, Unten: Reprimo PCR.

2.2.7 Quantifizierung der zellfreien DNA und ihrer Methylierung

Die in den Proben enthaltene DNA-Konzentration wurde automatisch mittels der Software SDS 2.2 unter Zuhilfenahme der Standardkurve bestimmt. Hierbei wurde die DNA-Menge der enzymbehandelten (=methylierten) und der nicht enzymbehandelten (=Gesamt-DNA) Proben errechnet. Die Methylierungsrate (methylation ratio) wurde als das Verhältnis von methylierter zur Gesamt-DNA festgelegt. Eine Methylierungsrate von 0 bedeutet hierbei, dass keine methylierten Kopien des betrachteten Genabschnittes in der zellfreien DNA nachweisbar waren. Eine vollständige Methylierung zellfreier DNA in der Probe zeigt eine Methylierungsrate von 1 an. Sie stellt damit ein Maß für den Anteil der Tumor-DNA an der gesamten freien DNA dar.

Frühere Studien haben gezeigt, dass insbesondere kleinere Fragmente zellfreier DNA im Serum von Tumorpatienten vermehrt nachweisbar sind (Jahr et al., 2001; Wu et al., 2002). Dies ist als Hinweis auf einen apoptotischen Ursprung der DNA (<200bp) zu werten. Es wurde daher der Apoptoseindex definiert. Er bezeichnet das Verhältnis kleinfragmentärer (*PTGS2*, 124bp) zu großfragmentärer (*Reprimo*, 271bp) freier DNA. Die Wahrscheinlichkeit, ein Fragment einer bestimmten Größe mit Hilfe der oben genannten Primerpaare zu detektieren, wird in Abbildung 9 dargestellt.

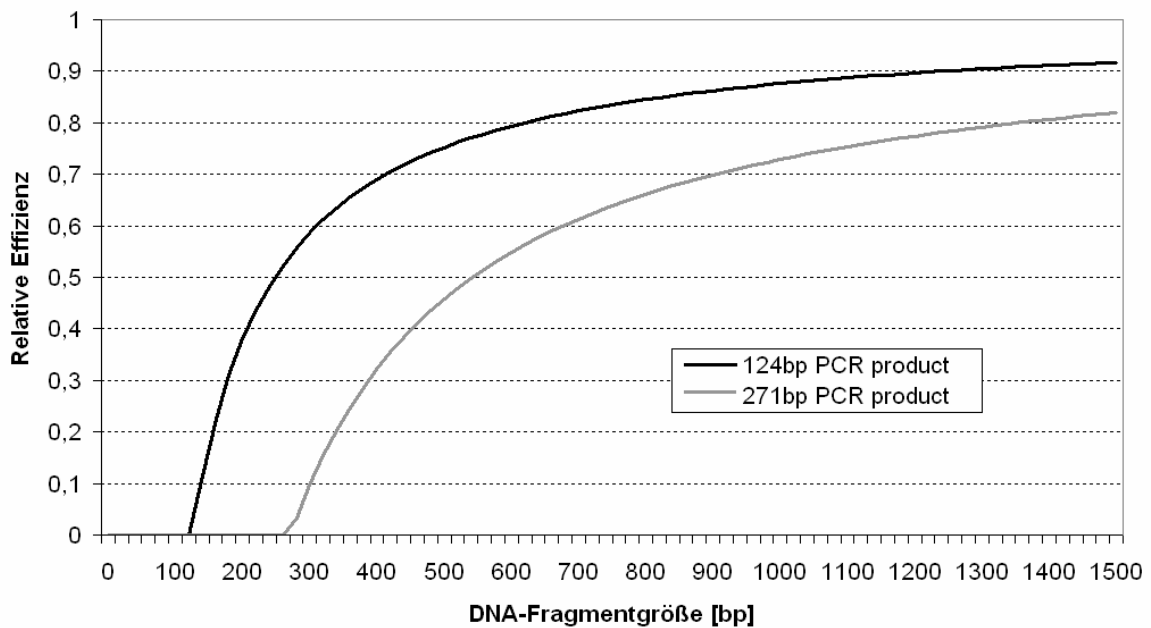


Abbildung 9: Relative Effizienz der Detektion unterschiedlicher DNA-Fragmente.

Die Abbildung zeigt die Effizienz, mit der ein Fragment einer bestimmten DNA-Größe in Abhängigkeit von der PCR-Produktgröße detektiert wird. DNA apoptotischen Ursprungs ist etwa 200bp groß, während DNA anderer Herkunft deutlich größer ist. Durch Amplifikation der unterschiedlich großen PCR-Produkte (124bp=PTGS2, 271bp=Reprimo) kann auf die Herkunft der DNA zurückgeschlossen werden. PCR: Polymerase-Kettenreaktion.

Im Rahmen einer Studie an Patienten mit Prostatakarzinom (Ellinger et al., 2007) wurde festgestellt, dass aus Tumorzellen stammende DNA-Fragmente ähnlicher Größe in annähernd gleicher Kopienzahl im peripheren Blut nachweisbar sind (Abbildung 10). Die Konzentration der kleinen Fragmente freier DNA scheint also ein Maß für die Konzentration der gesamten freien DNA im Blut zu sein.

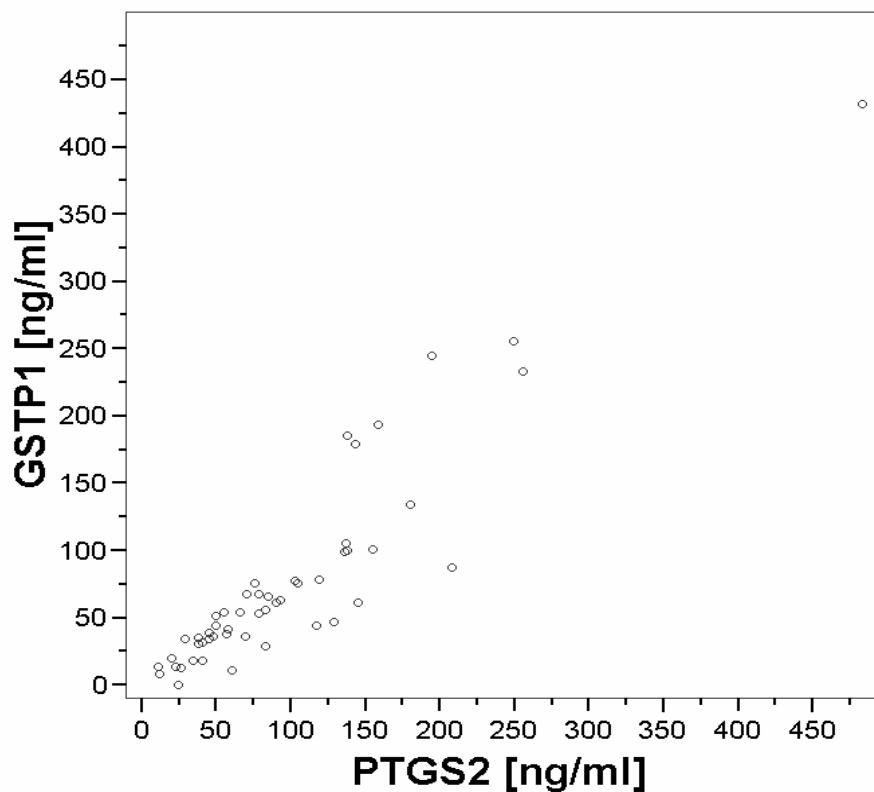


Abbildung 10: Konzentrationen kleinfragmentärer freier DNA im Blut.

GSTP1 (134bp) und PTGS2 (124bp) sind annähernd gleich groß. Die freie DNA wurde aus Proben von Prostatakarzinom-Patienten gewonnen und mittels einer PCR amplifiziert. Die jeweiligen Konzentrationen der beiden betrachteten Fragmente wurden gegeneinander aufgetragen und zeigen einen linearen Zusammenhang. Hiervon lässt sich schließen, dass DNA-Fragmente gleicher Größe im peripheren Blut in gleicher Menge nachzuweisen sind.

2.2.8 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte mit SPSS Version 11.5. Alle Tests wurden zweiseitig durchgeführt und ein Signifikanzniveau von $p < 0,05$ definiert.

Zunächst wurden die Proben von Tumor- und von BPH-Patienten auf Unterschiede in der Konzentration freier DNA, Methylierungsrate und Apoptoseindex untersucht. Der Mann-Whitney-Test diente zur Überprüfung der Signifikanz der Übereinstimmung der beiden jeweils untersuchten Gruppen.

Um festzustellen, welcher Cut-off-Wert eine bessere Unterscheidung zwischen Blasenkarzinom- und BPH-Patienten ermöglicht, wurden Receiver-Operator-Curve (ROC)-

Analysen durchgeführt. Hierbei wurde jeder Messwert als Cut-off untersucht und die resultierende Sensitivität und Spezifität berechnet. Der Begriff Sensitivität beschreibt die Wahrscheinlichkeit, das Krebsleiden durch ein positives Testergebnis korrekt zu erkennen. Unter Spezifität versteht man die Wahrscheinlichkeit, einen gesunden Patienten auch durch ein negatives Testergebnis zu detektieren. Als optimaler Cut-off-Wert wurde ein Messwert festgelegt, bei dem die Summe aus Sensitivität und Spezifität – repräsentiert durch die Fläche unter der Kurve (AUC) - maximal ist. Je mehr diese gegen den Wert 1 strebt, desto höher ist die diagnostische Güte des Tests.

Die Eigenschaften Methylierung, Konzentration freier DNA und Apoptoseindex wurden mit Hilfe des Mann-Whitney-Tests in verschiedenen Gruppen von Probanden untersucht. Hierbei wurden die Patienten mit Urothelkarzinom mit denen verglichen, die zusätzlich an einem Prostatakarzinom litten. Drei der in der Studie untersuchten Proben stammten von Patienten mit einem Plattenepithelkarzinom der Blase. Mit ihnen konnte aufgrund der geringen Fallzahl kein aussagekräftiger Vergleich angestellt werden.

Schließlich wurde untersucht, ob die DNA-Konzentration, ihre Methylierung und der Apoptoseindex mit den erhobenen klinisch-pathologischen Parametern korrelierten (Mann-Whitney-, Kruskal-Wallis-, Chi-Quadrat-Test). Mit Hilfe des univariaten Cox-proportional-hazard-Modells wurde der Einfluss auf die Rezidivfreiheit/ das Überleben der Probanden getestet. Zusätzlich wurden Kaplan-Meier-Analysen zur Erstellung von Überlebenskurven durchgeführt.

3 Ergebnisse

3.1 Nachweis zellfreier DNA-Fragmente im Serum

Stellvertretend für ein kurzes und ein langes frei zirkulierendes DNA-Fragment wurden aus den Proben die Konzentrationen von *PTGS2* (124bp) und *Reprimo* (271bp) mit Hilfe einer quantitativen PCR ermittelt.

Es zeigte sich eine signifikante Erhöhung der Konzentration freier *PTGS2*-Fragmente im Serum der Tumorpatienten verglichen mit BPH-Patienten ($p < 0,001$). Im Median lag die Konzentration bei 68,9ng/ml gegenüber 10,6ng/ml. Auch die Konzentration der *Reprimo*-DNA war bei den Tumorpatienten oberhalb des Signifikanzniveaus erhöht ($p = 0,041$). Hier fand sich eine mediane Konzentration von 16,9ng/ml gegenüber 6.5ng/ml bei den BPH-Patienten.

Es wird ersichtlich, dass der Anstieg der *PTGS2*-Konzentration und damit kleinfragmentärer DNA im Serum von Tumorpatienten größer ist als der von großfragmentärer DNA. Daher kann von einem vorwiegend apoptotischen Ursprung der frei zirkulierenden DNA, repräsentiert durch *PTGS2*, ausgegangen werden. Nur kleinere Mengen zellfreier DNA stammen aus nekrotischen Zelluntergängen und spiegeln sich in der Konzentration freier *Reprimo*-DNA-Fragmente wider.

In einem weiteren Schritt wurden die Konzentrationen freier DNA-Fragmente von Patienten mit Urothelkarzinom und solchen, die zusätzlich an einem koinzidenten Prostatakarzinom litten, verglichen. Innerhalb beider Gruppen zeigten sich ähnliche Konzentrationen von *PTGS2*-DNA ($p = 0,790$). In den Proben der Patienten mit Urothelkarzinom konnte eine leicht verminderte Konzentration von *Reprimo*-DNA nachgewiesen werden. Allerdings erreichten diese Unterschiede nicht das Signifikanzniveau ($p = 0,051$). Die Gruppe der Patienten mit Plattenepithelkarzinomen konnte wegen ihrer kleinen Fallzahl ($n = 3$) nicht mit den anderen Untergruppen verglichen werden. Die Daten implizieren jedoch auch hier einen Anstieg der Konzentration freier *PTGS2*-Fragmente gegenüber BPH-Serumproben. Die Konzentration freier *Reprimo*-DNA scheint sich jedoch nicht von der der BPH-Proben zu unterscheiden (Abbildung 11).

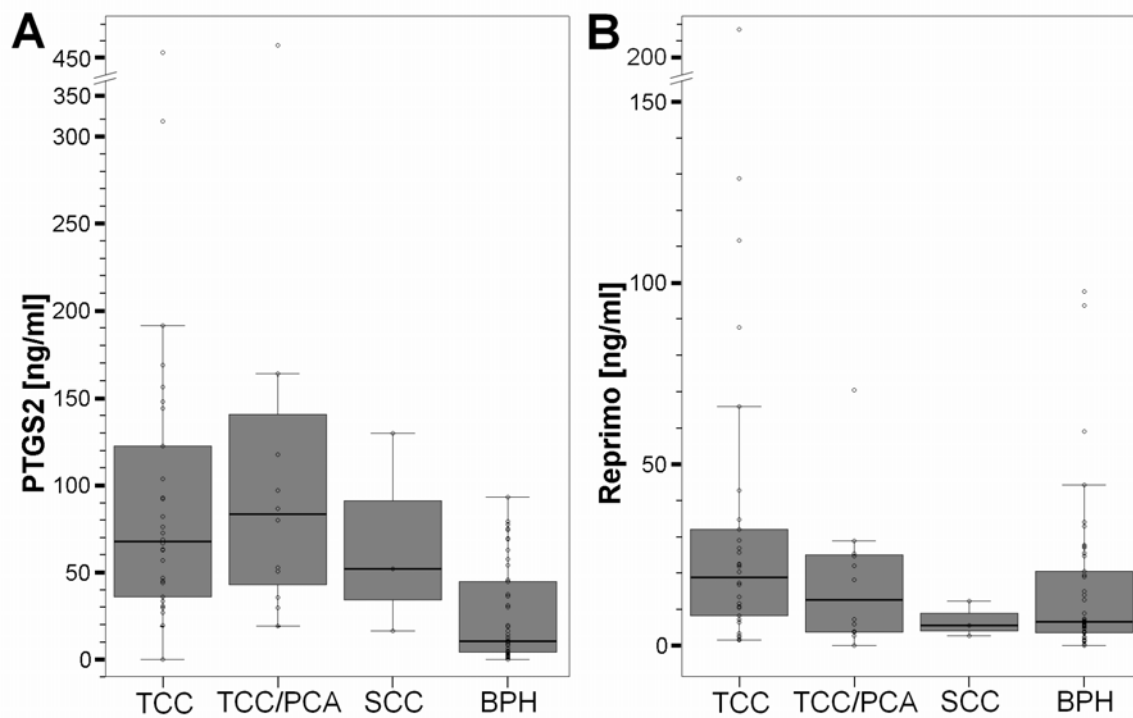


Abbildung 11: Konzentrationen freier DNA im Serum der Probanden.

PTGS2 steht stellvertretend für ein kurzes (A) und *Reprimo* für ein langes (B) Fragment freier DNA im Serum. TCC=Urothelkarzinom; SCC=Plattenepithelkarzinom; PCA=Prostatakarzinom, BCA= Blasenkarzinom, BPH= benigne Prostatahyperplasie.

3.2 Berechnung des Apoptoseindex

Der Apoptoseindex bezeichnet das Verhältnis von kleinfragmentärer (*PTGS2*) zu großfragmentärer (*Reprimo*) freier DNA. Aus den Proben der Karzinom-Patienten ließ sich ein signifikant höherer Apoptoseindex errechnen als aus den Vergleichsproben der BPH-Patienten ($p < 0,001$). Im Median lag der Apoptoseindex aller Karzinom-Patienten bei 3,94 gegenüber 1,60. Ein noch höherer Wert wurde aus den Proben der Patienten ermittelt, die sowohl an einem Urothelkarzinom als auch an einem Prostatakarzinom litten ($p = 0,010$). Hier betrug der Apoptoseindex im Median 8,89. Auch hier wurde eine Subgruppen-Analyse der Patienten mit Plattenepithelkarzinomen aufgrund der geringen Fallzahl nicht durchgeführt.

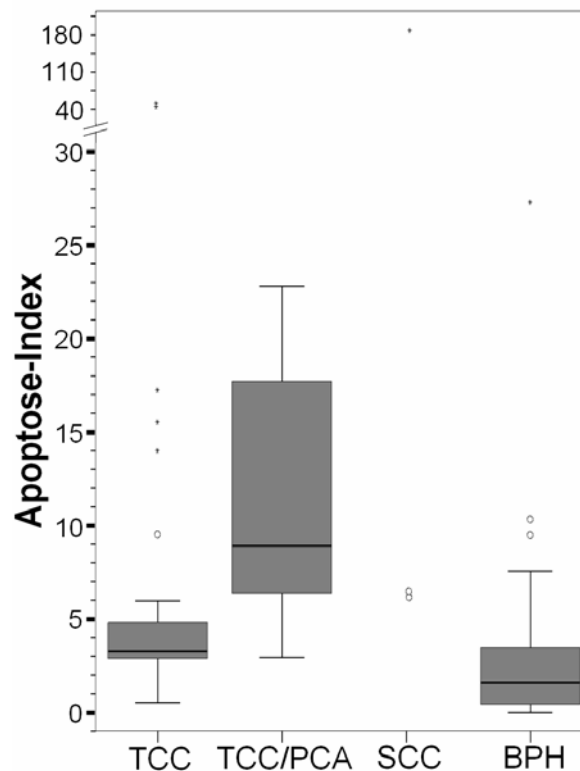


Abbildung 12: Apoptose-Indices der verschiedenen Probandengruppen.

TCC=Urothelkarzinom; SCC=Plattenepithelkarzinom; PCA=Prostatakarzinom, BCA=Blasenkarzinom, BPH= benigne Prostatahyperplasie.

3.3 DNA-Methylierung

Mittels quantitativer methylierungssensitiver PCR wurde die Methylierung der Promotor-CpG-Inseln von *APC*, *DAKP*, *GSTP1*, *PTGS2*, *TIG1* und *Reprimo* untersucht. Abbildung 13 und soll einen Überblick über den Methylierungsstatus der untersuchten freien DNA geben. Innerhalb der Gruppe der Blasenkarzinom-Patienten konnte CpG-Insel-Hypermethylierung in *APC* (59,5%), *GSTP1* (59,1%), *TIG1* (31,8%), *PTGS2* (24,4%) und *DAPK* (2,4%) nachgewiesen werden, wohingegen keine Methylierung von *Reprimo* detektiert wurde.

Im Vergleich zwischen Patienten mit Urothelkarzinom, Plattenepithelkarzinom und solchen mit einem zusätzlichen PCA konnten ähnliche Methylierungslevel festgestellt werden ($p=0,367-1,000$). Auch in den Proben der Patienten mit einem Plattenepithelkarzi-

nom der Blase zeigte sich eine CpG-Insel-Hypermethylierung. Drei der untersuchten BPH-Proben (6,8%) waren an *GSTP1* ebenfalls hypermethyliert.

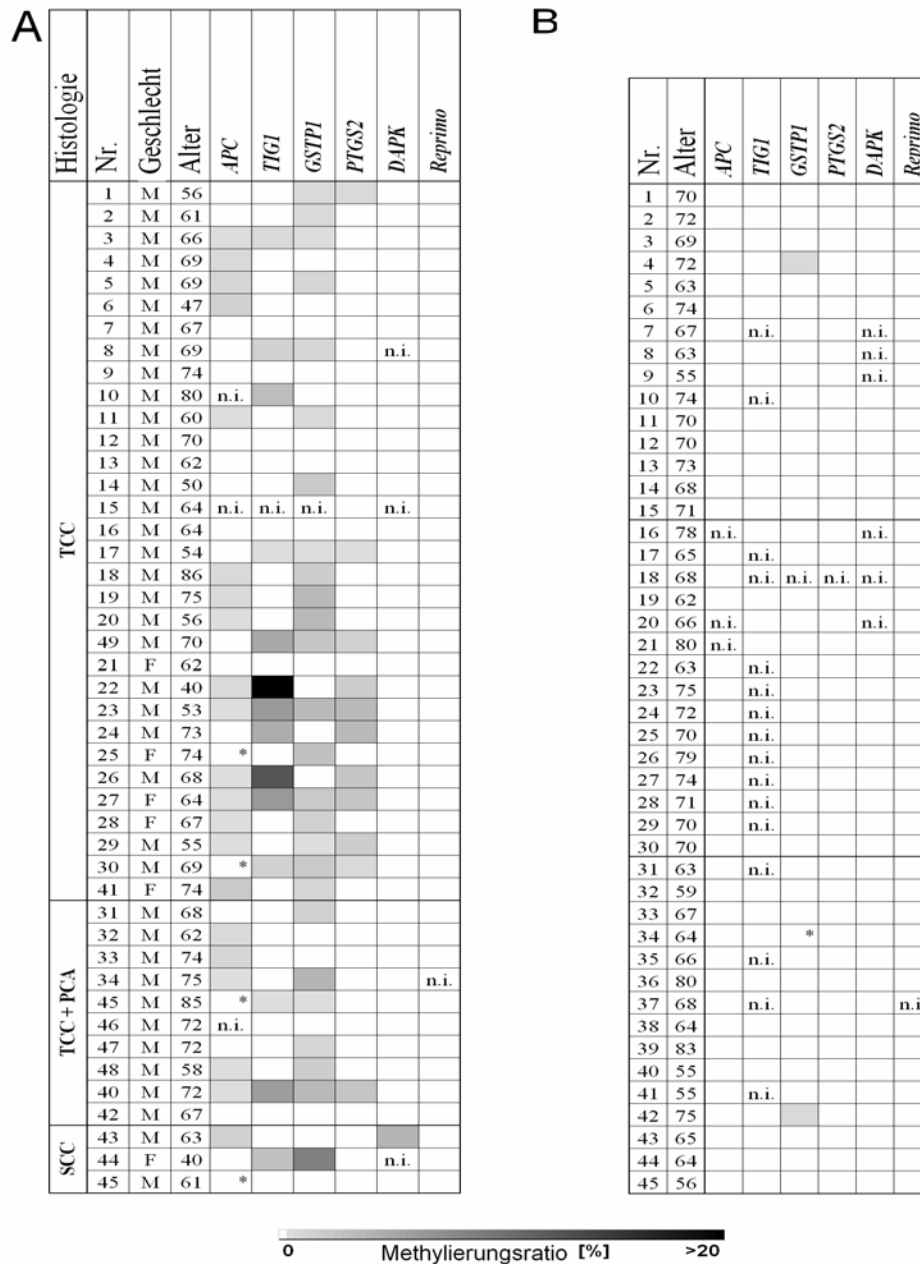


Abbildung 13: Methylierungsstatus der untersuchten Genorte.

A: Resultate der Karzinompatienten, B: Resultate der BPH-Kontrollen. n.i.: Nicht informativ. Hier konnte keine DNA und damit auch keine Methylierung detektiert werden. *: Eine Methylierung konnte nur in sehr geringem Umfang ($\leq 1\%$) nachgewiesen werden. TCC=Urothelkarzinom; SCC=Plattenepithelkarzinom; PCA=Prostatakarzinom, BCA= Blasenkarzinom, BPH= benigne Prostatahyperplasie.

Tabelle 7: Methylierungsratio der untersuchten Gene.

	Methylierungsratio	
	BCA [%]	BPH [%]
<i>TIG1</i>		
Mittelwert	2,33	0,00
Median	0,00	0,00
Minimum	0,00	0,00
Maximum	24,14	0,00
<i>GSTP1</i>		
Mittelwert	1,82	0,05
Median	0,77	0,00
Minimum	0,00	0,00
Maximum	5,70	0,95
<i>PTGS2</i>		
Mittelwert	0,74	0,00
Median	0,00	0,00
Minimum	0,00	0,00
Maximum	5,70	0,00
<i>DAPK</i>		
Mittelwert	0,14	0,00
Median	0,00	0,00
Minimum	0,00	0,00
Maximum	5,85	0,00
<i>APC</i>		
Mittelwert	0,54	0,00
Median	0,29	0,00
Minimum	0,00	0,00
Maximum	3,10	0,00

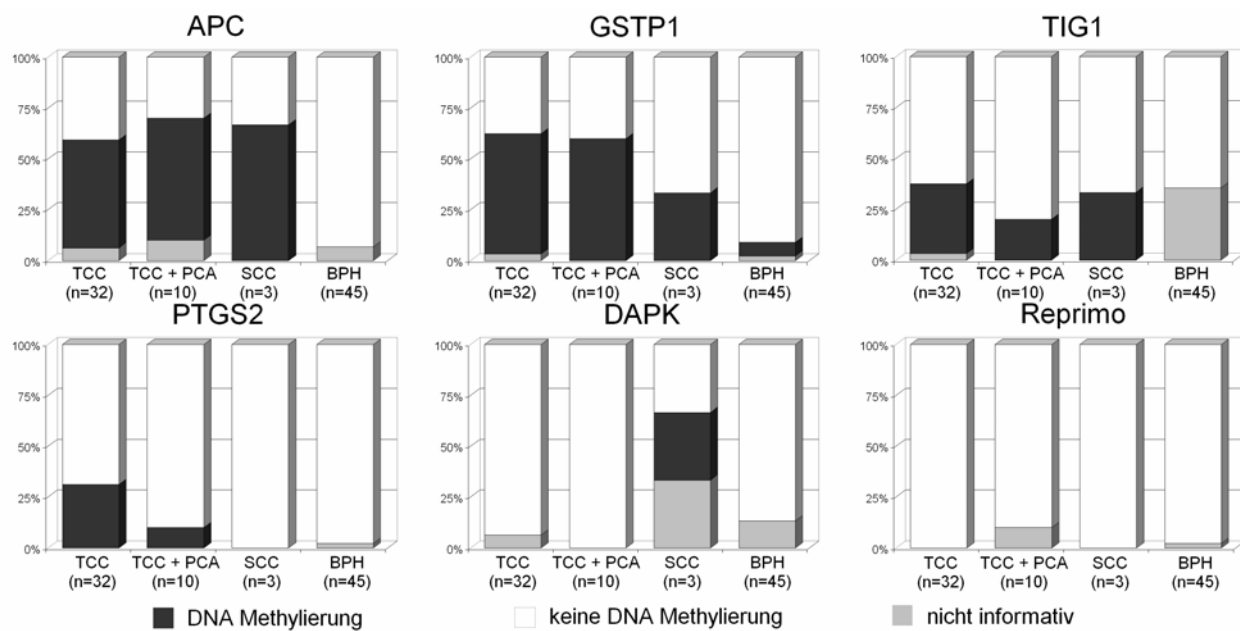


Abbildung 14: Methylierungsfrequenzen der untersuchten Gene nach Subgruppen.

TCC=Urothelkarzinom; SCC=Plattenepithelkarzinom; PCA=Prostatakarzinom, BCA=Blasenkarzinom, BPH= benigne Prostatahyperplasie.

3.4 Diagnostische Aussagekraft

3.4.1 ROC-Analysen von PTGS2, Reprimo und Apoptoseindex

Im Rahmen der ROC-Analysen wurden die Cut-off-Werte mit der höchsten Sensitivität und Spezifität ermittelt, um anhand der vorliegenden Daten eine bessere Unterscheidung zwischen Blasenkarzinom- und BPH-Patienten zu ermöglichen.

Im Falle der *PTGS2*-Fragmente lag der Cut-off bei einer Konzentration von 19,01 ng/ml. Mit Hilfe dieses Grenzwertes gelang eine hochsensitive (95,6%) Unterscheidung zwischen Karzinom- und BPH-Patienten bei einer Spezifität von 62,2%.

Der Cut-off-Wert für die *Reprimo*-DNA lag bei 7,09 ng/ml. Von diesem Wert ausgehend konnten nur sehr eingeschränkt Aussagen über die Dignität der betrachteten Probe gemacht werden. Hier lag die Sensitivität bei 59,1% und die Spezifität bei 57,8%.

Die höchste Spezifität in der Unterscheidung zwischen beiden Patientengruppen gelang mittels Betrachtung des Apoptoseindex. Sie betrug 69,8% bei einem Cut-off von 2,56. Die Sensitivität lag bei 86,4%, die AUC bei 0,785.

Anhand der vorliegenden Daten konnten Positive und Negative Prädiktive Werte (PPV und NPV) ermittelt werden. Diese beschreiben, wie viele der gesunden oder kranken Probanden durch den Test richtig zugeordnet wurden. Abbildung 15 und Tabelle 8 sollen einen Überblick über die Resultate der ROC-Analysen geben.

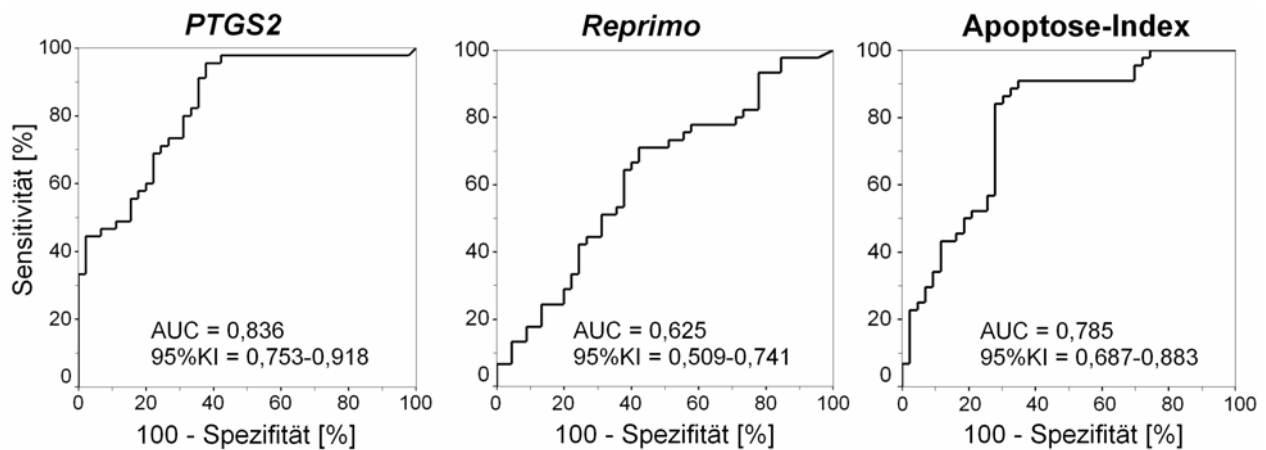


Abbildung 15: ROC-Analysen: Apoptoseindex, PTGS2- und Reprimo-Fragmente

Sensitivität und Spezifität wurden gegeneinander aufgetragen. Je größer die Fläche unter der Kurve (AUC), desto höher ist die diagnostische Güte des Tests. 95%KI= 95% Konfidenzintervall.

Tabelle 8: ROC-Analysen der DNA-Fragmente sowie des Apoptoseindex.

	Sensitivität (%)	Spezifität (%)	PPV (%)	NPV (%)	AUC	95%KI
124bp PTGS2-Fragmente (Cut-off: 19,01ng/ml)	95,6	62,2	70,7	96,6	0,836	0,753 - 0,918
271bp Reprimo-Fragmente (Cut-off: 7,09ng/ml)	59,1	57,8	60,8	69,4	0,625	0,509 - 0,741
Apoptose - Index (Cut-off: 2,56)	86,4	69,8	74,0	81,1	0,785	0,687 - 0,883

PPV= Positiver Vorhersagewert, NPV=Negativer Vorhersagewert, AUC= Fläche unter der Kurve, 95%KI= 95% Konfidenzintervall.

3.4.2 ROC-Analysen der Methylierungslevel aller betrachteter Gene

In einem weiteren Schritt wurden die Methylierungsmuster der CpG-Promotorregionen der sechs betrachteten frei zirkulierenden Gene auf ihre diagnostische Aussagekraft untersucht.

Betrachtete man einen einzelnen Genlokus, so unterschied dieser mit einer Spezifität von 93,2 bis 100% spezifisch zwischen den beiden Probandengruppen. Allerdings erwies sich hier die Sensitivität als eher gering (2,4 bis 59,5%). Dabei erreichte die Fläche unter der Kurve Werte zwischen 0,512 und 0,798.

Gesteigert werden konnte die diagnostische Wertigkeit, wenn mehrere der untersuchten Gene in Kombination untersucht wurden. Durch eine „oder“-Verknüpfung zweier oder dreier Gene konnte die Sensitivität auf 66,7 bis 80% gesteigert und ein gleichbleibend hohes Spezifitätsniveau (93 bis 100%, AUC=0,800 bis 0,844) erhalten werden. Bei kombinierter Untersuchung von mehr als drei Genen konnte die Aussagekraft nicht weiter gesteigert werden.

Die genaueste Detektion von Tumorpatienten gelang durch eine „oder“-Verknüpfung von *APC*, *GSTP1* oder *TIG1*. Hier lagen Sensitivität und Spezifität bei 80,0 bzw. 93,3%. Die Ergebnisse der ROC-Analysen werden in Abbildung 16 und Tabelle 9 zusammengefasst.

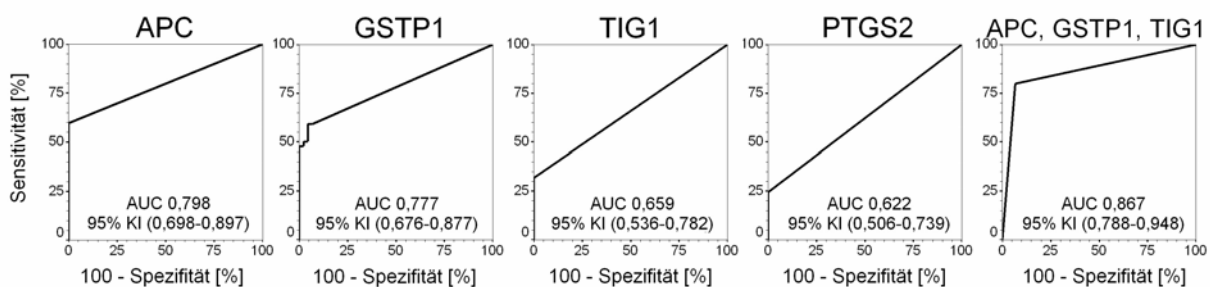


Abbildung 16: ROC-Analyse: Methylierungslevel für einige der untersuchten Gene.

AUC= Fläche unter der Kurve, 95%KI= 95% Konfidenzintervall.

Tabelle 9: ROC-Analysen der Methylierungslevel aller betrachteter Gene

	Spezifität	Sensitivität	PPV	NPV	AUC	95% KI
APC	100	59,5	100	71,2	0,798	0,698-0,897
DAPK	100	2,4	100	48,8	0,512	0,385-0,638
GSTP1	93,2	59,1	89,7	69,5	0,777	0,676-0,877
PTGS2	100	24,4	100	56,5	0,622	0,506-0,739
TIG1	100	31,8	100	49,2	0,659	0,536-0,782
GSTP1 oder TIG1	93,3	66,7	90,9	73,7	0,800	0,704-0,895
GSTP1 oder APC	93,3	75,6	91,9	79,2	0,844	0,757-0,931
TIG1 oder APC	100	68,9	100	76,3	0,844	0,757-0,931
GSTP1, TIG1 oder APC	93,3	80,0	92,3	82,4	0,867	0,785-0,948
TIG1, GSP1, APC oder PTGS2	93,3	80,0	92,3	82,4	0,867	0,785-0,948

PPV= positiver Vorhersagewert, NPV= negativer Vorhersagewert, AUC= Fläche unter der Kurve, 95%KI= 95% Konfidenzintervall.

3.4.3 Korrelation der Menge frei zirkulierender DNA mit klinischen und pathologischen Parametern

Die in dieser Studie betrachteten klinischen und pathologischen Parameter sind Alter, Geschlecht, Gesamtüberleben, rezidivfreies Überleben, Grading, Staging, Resultat der Urinzytologie, Lymphangiosis, Hämangiosis, Multifokalität, Lymphknotenbefall, positiver Schnittrand und Stadium eines eventuell koexistenten Prostatakarzinomes (Tabelle 6). Bezüglich der nachgewiesenen Konzentrationen frei zirkulierender DNA-Fragmente und des Apoptoseindex konnte keine Korrelation mit den oben genannten Parametern nachgewiesen werden ($p > 0,05$). Allerdings zeigte sich der Apoptoseindex signifikant negativ korreliert mit dem tumorspezifischen Überleben. Bei einem Cut-off von 12,1 für den Apoptoseindex konnte ein kürzeres postoperatives Langzeitüberleben für die Patienten mit einem höheren Apoptoseindex festgestellt werden Abbildung 17.

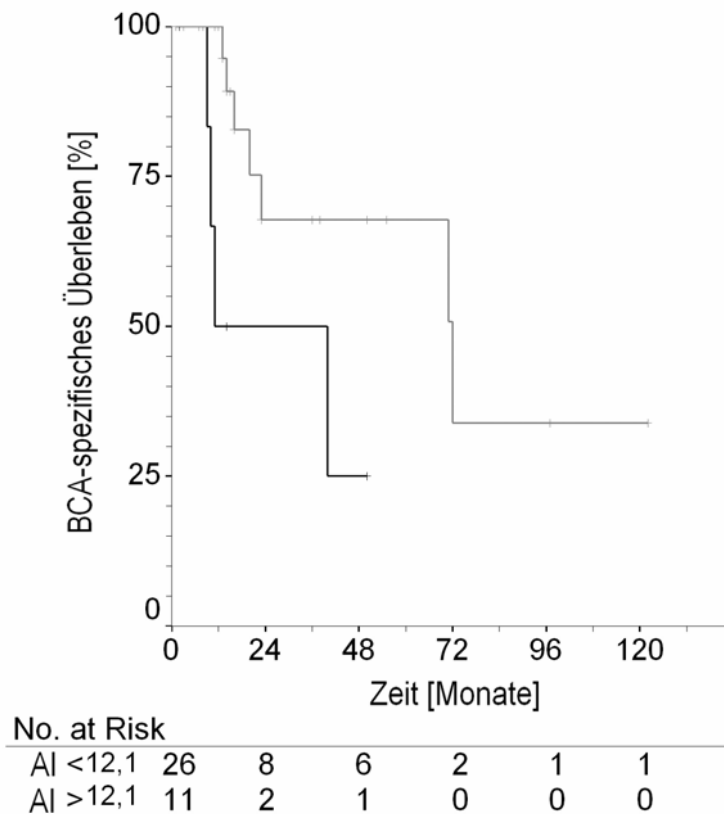


Abbildung 17: BCa-spezifisches Überleben in Abhängigkeit vom Apoptoseindex.

AI: Apoptoseindex. Grau: Langzeitüberleben bei AI < 12,1, Schwarz: Langzeitüberleben bei AI > 12,1. No at risk: Anzahl der noch lebenden Patienten einer Gruppe in Abhängigkeit von der Zeitspanne seit radikaler Zystektomie in Monaten.

Zwischen der BCa-spezifischen Mortalität und den gemessenen Konzentrationen der *PTGS2*- und *Reprimo*-Fragmente bestand keine Korrelation. Dies ist aus

Tabelle 10 ersichtlich, in der Odds ratio, 95%-Konfidenzintervalle (KI) und P-Werte für Apoptoseindex, *PTGS2* und *Reprimo* angegeben sind. Das Odds Ratio drückt aus, um wie viel größer die Chance an dem BCa zu versterben ist, sofern hohe Konzentrationen freier DNA vorliegen. Ein Wert von 1 bedeutet ein gleiches Chancenverhältnis. Mit einem größeren Wert steigt das Risiko.

Tabelle 10: Cox Proportional Hazard-Modell: DNA-Fragmente und Apoptoseindex.

	Odds ratio	95%-Konfidenzintervall	P-Wert
Apoptoseindex	1,072	1,016-1,130	0,011
<i>PTGS2</i>	1,000	0,994-1,007	0,972
<i>Reprimo</i>	0,996	0,981-1,012	0,622

3.4.4 Korrelation der Methylierungslevel mit klinischen und pathologischen Parametern

An verschiedenen Stellen konnten Korrelationen von CpG-Insel-Hypermethylierungen der betrachteten Gene mit klinischen oder pathologischen Parametern detektiert werden.

So zeigte sich eine signifikante Korrelation zwischen der Methylierung von *APC* im Promotorbereich und dem Vorhandensein positiver Schnittränder in der Aufarbeitung des Operationspräparates ($p=0,003$). Eine R1-Resektion stellt einen für das Langzeitüberleben ungünstigen Faktor dar und zeigte sich ebenfalls oberhalb des Signifikanzniveaus korreliert, sofern *APC*- und *TIG1*-Hypermethylierung als „oder“-Verknüpfung betrachtet wurden ($p=0,006$). Außerdem ging eine Hypermethylierung an *APC* mit dem Vorliegen eines hohen pT-Stadiums einher ($p=0,010$), (Abbildung 18 A, B und E).

Im Falle von *GSTP1* korrelierte eine CpG-Insel-Hypermethylierung signifikant ($p=0,012$) mit der Inzidenz eines multifokalen Übergangszellkarzinoms (Abbildung 18 C). Die kombinierte Betrachtung von *GSTP1*- und *TIG1*- Hypermethylierung als „oder“-Verknüpfung zeigte sich ebenfalls korreliert ($p= 0,032$) mit dem Vorliegen eines multifokalen Befundes, wie aus Abbildung 18 D hervorgeht.

Es konnte kein Zusammenhang zwischen Hypermethylierung an *DAPK*, *PTGS2* oder *TIG1* und einem der betrachteten klinischen oder pathologischen Parametern nachgewiesen werden ($p>0,05$).

Ausgehend von der Annahme, dass Plattenepithelkarzinome sich in ihren biologischen Eigenschaften grundlegend von den Übergangszellkarzinomen unterscheiden, wurden sie in diese Untersuchungen nicht mit eingeschlossen.

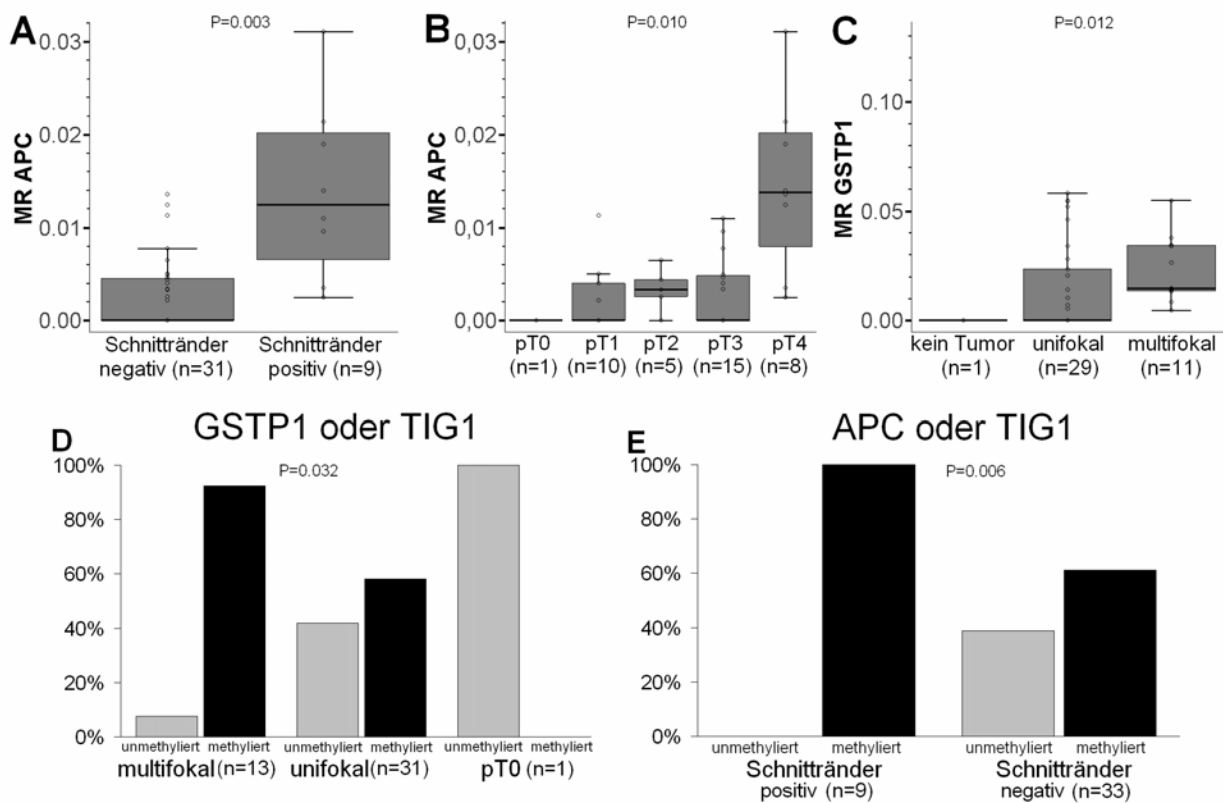


Abbildung 18: Korrelation Methylierung mit klinisch-pathologischen Parametern.

MR=Methylierungsratio.

Schließlich wurde untersucht, ob sich ausgehend von der Methylierung frei zirkulierender DNA Aussagen bezüglich des tumorspezifischen Überlebens der Betroffenen ableiten lassen können. Follow-up-Daten waren für 38 Patienten mit BCA (n=28) oder BCA mit koinzidentem PCA (n=10) verfügbar.

Insgesamt kam es in 16 der beobachteten Fälle zu einem Tumorrezidiv, an dem 11 Patienten verstarben. Der Beobachtungszeitraum nach Abschluss der stationären Behandlung betrug im Durchschnitt bei den Patienten ohne Rezidiv 32 (Median: 15) Monate, bei den Patienten, die ein Rezidiv erlitten 15 (Median: 7) Monate und bei den Patienten, die an dem Rezidiv verstarben 27 (Median: 16) Monate.

Im Chi-Quadrat-Test konnte für die Fälle mit letalem Ausgang eine signifikant häufigere Hypermethylierung von CpG-Inseln im Promotorbereich von *APC* nachgewiesen werden als in den anderen Fällen ($p=0.030$). Darüber hinaus war die Methylierungsratio von *APC* mit einem kürzeren tumorspezifischen Langzeitüberleben korreliert ($p=0,040$; Odds

ratio: $6,9 \times 10^{33}$; 95% Konfidenzintervall: $41-1,1 \times 10^{66}$). Das rezidivfreie Überleben zeigte sich unterhalb des Signifikanzniveaus ($p=0,175$) verkürzt, sofern eine Hypermethylierung von *APC* oder *GSTP1* vorlag (Abbildung 19).

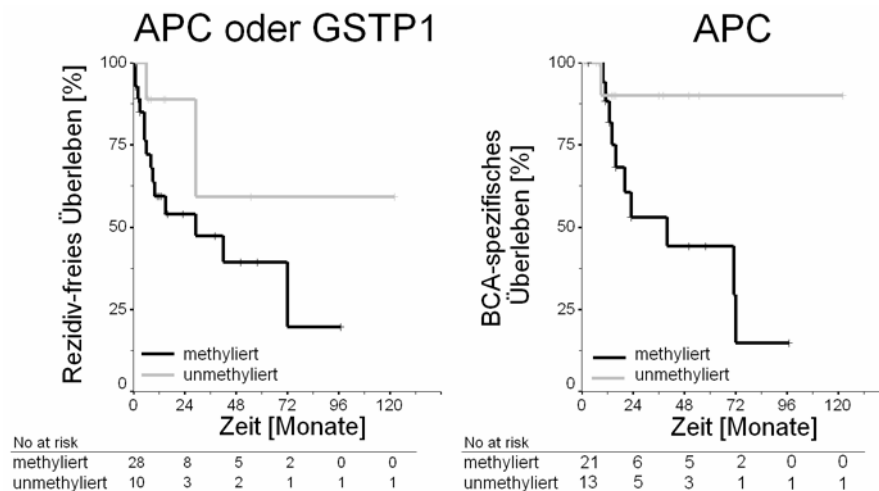


Abbildung 19: Einfluss der Hypermethylierung von *APC/GSTP1* auf das Überleben.

Im Falle einer Hypermethylierung von „*APC* oder *GSTP1*“ zeigt sich ein kürzeres Rezidivfreies Überleben als bei Nichtmethylierung der beiden Promotorregionen. Allerdings erreicht dieses Resultat nicht das Signifikanzniveau. Es besteht jedoch eine signifikante Korrelation zwischen der Hypermethylierung an *APC* und dem BCA-spezifischen Überleben. No at risk: Anzahl der noch lebenden Patienten einer Gruppe in Abhängigkeit von der Zeitspanne seit radikaler Zystektomie in Monaten.

Von den übrigen untersuchten klinisch-pathologischen Parametern zeigte sich lediglich das Vorhandensein einer Hämangiosis carcinomatosa korreliert mit einem verkürzten Tumor-spezifischen Überleben ($p=0,036$), hier betrug die Odds ratio 0,242 und das 95% Konfidenzintervall 0,064 bis 0,911 (Abbildung 20).

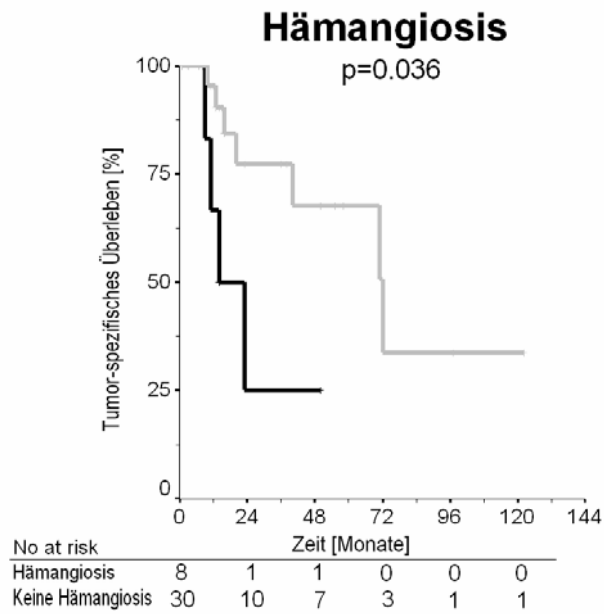


Abbildung 20: Bedeutung einer Hämangiosis carcinomatosa

No at risk: Anzahl der noch lebenden Patienten einer Gruppe in Abhängigkeit von der Zeitspanne seit radikaler Zystektomie in Monaten.

Grau: BCA-spezifisches Langzeitüberleben bei Vorliegen einer Hämangiose.

Schwarz: BCA-spezifisches Langzeitüberleben ohne Vorliegen einer Hämangiose.

4 Diskussion

Das Vorkommen frei zirkulierender DNA in Serum/Plasma von Tumorpatienten wurde in verschiedenen Studien bereits nachgewiesen (Jiang et al., 2006; Silva et al., 2002; Umetani et al., 2006a; Wu et al., 2002). Zielsetzung dieser Studien war es, aus der Konzentration und epigenetischen Eigenschaften der frei zirkulierenden DNA Rückschlüsse über das Vorhandensein oder den Ausbreitungsgrad eines malignen Tumors ziehen zu können. Darüber hinaus wurde versucht, aus den gewonnenen Daten auf Korrelationen mit klinischen oder pathologischen Daten zu schließen. Von besonderem Interesse ist dieser Ansatz bei Tumorerkrankungen, für die sich noch kein im Blut detektierbarer Tumormarker hat etablieren können und deren Diagnose mit der Durchführung invasiver und aufwändiger Untersuchungen verbunden ist. Auch das Blasenkarzinom gehört zu diesen Tumoren. Allerdings hat eine systematische Quantifizierung von freier DNA in Serum oder Plasma von Blasentumorpatienten noch nicht stattgefunden.

Die CpG-Insel-Promotor-Hypermethylierung ist eine häufige epigenetische Veränderung der DNA von Tumorpatienten und konnte sowohl in Tumorgewebe als auch in Urin und Plasma/Serum von Blasenkarzinompatienten nachgewiesen werden (Dulaimi et al., 2004; Hoque et al., 2006; Maruyama et al., 2001). Der Nachweis tumorspezifischer DNA im Urin bedeutet nicht notwendigerweise das Vorhandensein eines Urothelkarzinoms, da diese ebenfalls im Urin von Nieren-, Prostata- und Pankreaskarzinompatienten nachgewiesen wurde (Botezatu et al., 2000; Hoque et al., 2006).

Ziel der Arbeit ist es, anhand Mengen, Fragmentgrößen und Hypermethylierung freier, aus Serum gewonnener DNA Aussagen bezüglich des Tumortyps, seiner Ausbreitung oder Prognose zu treffen.

In der vorliegenden Studie wurde erstmals eine Kombination mehrerer Genorte im Serum von Blasenkarzinompatienten auf Promotorhypermethylierung untersucht. Es handelt sich hierbei um *APC*, *DAPK*, *GSTP1*, *PTGS2*, *TIG1* und *Reprimo*.

4.1 Freie DNA im Serum

Mit Hilfe gelelektrophoretischer Untersuchungen konnte bereits nachgewiesen werden, dass frei im Serum/Plasma zirkulierende DNA-Fragmente apoptotischen und nekrotischen Ursprungs anhand ihrer Größe voneinander abgrenzbar sind. Während kurze Fragmente apoptotischen Prozessen entstammen, haben längere Fragmente ihren Ursprung in Nekrosen (Jahr et al., 2001). Es ist allerdings noch nicht bekannt, aus welchen Zellen die freie DNA freigesetzt wird.

Stellvertretend für ein kurzes und ein langes DNA-Fragment wurden in dieser Studie *PTGS2* und *Reprimo* im Serum von Blasenkarzinompatienten untersucht. Es konnte für *PTGS2* eine siebenfache, für *Reprimo* eine dreifache Erhöhung der Konzentrationen im Serum von Tumorpatienten gegenüber gesunden Probanden nachgewiesen werden. Dies ist die erste Studie in der gezeigt wurde, dass die Konzentration freier DNA im Serum von Blasenkarzinom-Patienten erhöht ist. Andere Untersuchungen an Patienten mit Prostata- (Chun et al., 2006; Ellinger et al., 2007), Kolon- (Umetani et al., 2006c), Mamma- (Umetani et al., 2006c; Umetani et al., 2006a), Ovarial- (Chang et al., 2002) und Lungenkarzinomen (Gautschi et al., 2004) zeigten ebenfalls eine Erhöhung der freien DNA im Blut. Patienten mit unterschiedlichen nicht-malignen Erkrankungen (HIV, Autoimmunerkrankungen, inflammatorische Erkrankungen) haben niedrigere DNA-Konzentrationen (Chang et al., 2002), ebenso wie gesunde Individuen (Wu et al., 2002). Aus diesen Ergebnissen kann man schließen, dass der Nachweis erhöhter Mengen freier DNA als universeller Tumormarker geeignet ist.

In dieser Studie wurde gezeigt, dass der Anstieg der *PTGS2*-Konzentration und damit kleinfragmentärer DNA im Serum von Tumorpatienten größer ist als der von großfragmentärer DNA. Daher kann von einem vorwiegend apoptotischen Ursprung der frei zirkulierenden DNA ausgegangen werden. Nur kleinere Mengen zellfreier DNA stammen aus nekrotischen Zelluntergängen. Um diese Herkunft zu verdeutlichen wurde der Apoptoseindex definiert. Dieser bezeichnet das Verhältnis kleinfragmentärer (*PTGS2*) zu großfragmentärer (*Reprimo*) DNA. Der Apoptoseindex war bei Patienten mit Blasenkarzinom signifikant erhöht gegenüber BPH-Patienten.

Interessanterweise war der Apoptoseindex bei Patienten mit inzidentellem Prostatakarzinomen signifikant höher als bei Patienten, die nur an einem Blasenkarzinom litten. Dagegen wiesen andere Studien an Patienten mit HNO-Tumoren (Jiang et al., 2006),

Mamma- (Umetani et al., 2006a), Kolon- (Umetani et al., 2006c) und Ovarialkarzinomen (Wang et al., 2003) vermehrt großfragmentäre DNA in Serum oder Plasma nach. Dieser scheinbare Widerspruch kann als Hinweis dafür gewertet werden, dass die der DNA-Freisetzung zugrunde liegenden Pathomechanismen sich in verschiedenen Tumorentitäten unterscheiden können.

4.2 Promotorhypermethylierung

Die Hypermethylierung von CpG-Inseln freier DNA im Promotorbereich ist eine epigenetische Veränderung, der ein hohes Potential als Biomarker für verschiedene Karzinome zugesprochen wird. Verschiedene Studien haben bereits gezeigt, dass diese Veränderungen nahezu ausschließlich einer malignen Grunderkrankung zuzuordnen sind (Catto et al., 2005; Dulaimi et al., 2004; Esteller et al., 2001; Friedrich et al., 2004; Maruyama et al., 2001). In verschiedenen Studien wurden bereits simultan die Methylierungsprofile mehrerer aus Tumorgewebsproben isolierter Gene für das Blasenkarzinom untersucht. Ferner wurde Hypermethylierung einzelner Genorte mit Hilfe der Untersuchung von Urin, Plasma oder Serum von Tumorpatienten detektiert.

Mit dieser Studie liegen erstmalig Daten über die Hypermethylierung mehrerer Gene vor, die aus Serum von Blasentumorpatienten und somit durch eine einfache und wenig invasive Blutentnahme gewonnen wurden. Die simultane Untersuchung mehrerer Gene führt zu einer Steigerung der Sensitivität des Verfahrens.

4.2.1 Methylierungsfrequenzen APC

Das *APC* (Adenomatosis Polyposis Coli)- Gen spielt eine wesentliche Rolle in der Entstehung von familiärem Darmkrebs und wurde daher in Kolonkarzinomen häufig untersucht (Esteller et al., 2001; Nagase und Nakamura, 1993).

Doch auch bei anderen Tumorentitäten konnte eine Promotorhypermethylierung von *APC* nachgewiesen werden. So zum Beispiel beim Endometriumkarzinom, (Banno et al., 2006), Mammakarzinom (Zhang et al., 2007) und beim Prostatakarzinom (Bastian et al., 2005a). Studien haben für das Blasenkarzinom eine Hypermethylierungsraten von *APC* zwischen 26,0 (Gutierrez et al., 2004) und 73,0% (Hoque et al., 2006) festgestellt. Gewonnen wurde die DNA jedoch aus Gewebeproben der bereits resezierten Tumoren

oder Urin. In dieser Studie fand sich eine CpG-Insel-Hypermethylierung für *APC* in 59,5% der Blasenkarzinom-Patienten.

4.2.2 Methylierungsfrequenzen *DAPK*

Die *DAPK*-Kinase ist ein Vermittler des Interferon-Gamma- induzierten programmierten Zelltodes. In Tierversuchen mit Bronchialkarzinomen zeigte sich, dass besonders aggressive Varianten des Tumors kein *DAPK* exprimierten. Eine Anhebung der *DAPK*-Level auf ein physiologisches Niveau verzögerte die Metastasierung und den lokalen Tumorprogress. Darüber hinaus stieg die Apoptosehäufigkeit mit verminderter *DAPK*-Expression (Inbal et al., 1997).

Die *DAPK*-Kinase ist ein Tumorsuppressorgen, dessen epigenetische Veränderungen bei verschiedenen Tumorerkrankungen bereits untersucht wurden (Fischer et al., 2006; Kuester et al., 2007).

In dieser Studie zeigte sich nur bei einem Patienten (2,4%) eine Hypermethylierung an *DAPK*. Hierbei handelte es sich um ein Plattenepithelkarzinom. In anderen Studien fanden sich uneinheitliche Methylierungsraten zwischen 4,0 (Maruyama et al., 2001) und 70,5% (Christoph et al., 2007). Die Daten deuten darauf hin, dass die Hypermethylierung von *DAPK* eine untergeordnete Rolle in der Karzinogenese des Blasenkarzinoms spielt.

4.2.3 Methylierungsfrequenzen *GSTP1*

GSTP1 gehört zu einer Gruppe von Enzymen, deren Aufgabe in der Katalysierung von Konjugationsprozessen besteht, mit deren Hilfe hydrophobe karzinogene Substanzen abgebaut werden.

Für das *GSTP1*- Molekül besteht ein hoher Polymorphismus. Es konnte nachgewiesen werden, dass das Vorkommen bestimmter Subtypen des Enzyms mit einer geringeren Aktivität und damit mit einem höheren Tumorrisiko einhergeht (Cao et al., 2005; Ryk et al., 2005; Srivastava et al., 2005). In vorangegangenen Studien wurde die Hypermethylierung von *GSTP1* nur in Tumorgewebe und Urin von Patienten mit Blasenkarzinom untersucht. Hier zeigten sich eine Methylierung in zwischen 0 und 47% der Fälle. In dieser Studie konnte eine Hypermethylierung in 59,1% der Patienten nachgewiesen werden. Mehrere Umstände können zur Erklärung dieser hohen Methylierungsrate herangezogen werden:

1. In dieser Studie wurde erstmalig Patientenserum auf seine Methylierung hin untersucht. Es gibt also keinerlei Vergleichsmöglichkeiten mit bereits veröffentlichten Untersuchungsergebnissen anderer Arbeitsgruppen.
2. Das in die Studie eingeschlossene Patientenkollektiv litt an einer bereits fortgeschrittenen Blasen-tumorerkrankung, die nur mittels radikaler Zystektomie therapiert werden konnte. Andere Untersuchungen schlossen auch Patienten mit weniger ausgedehnten Befunden mit ein.

Allerdings zeigte sich auch bei den BPH-Patienten in einigen Fällen eine CpG-Insel-Promotorhypermethylierung. Es gibt hierfür zwei Erklärungsmöglichkeiten:

Es kann sich bei diesen Fällen um ein inzidentelles Prostatakarzinom gehandelt haben, welches im Rahmen der TUR-P nicht reseziert wurde, denn die Hypermethylierung von *GSTP1* ist auch beim PCA in mehreren Fällen bereits erfolgreich nachgewiesen worden (Bastian et al., 2005b; Yegnasubramanian et al., 2004).

Darüber hinaus ist eine CpG-Insel-Hypermethylierung auch bei Patienten mit benigner Prostatahyperplasie nachgewiesen worden (Enokida et al., 2005).

4.2.4 Methylierungsfrequenzen *TIG1*

TIG1 kodiert für einen Retinolsäurerezeptor, dessen Expression über das polyzyklische Retinoid Tazaroten reguliert wird. Retinoide regulieren das Wachstum, die Differenzierung und die Apoptose von Zellen während der Embryonalentwicklung, aber auch von prämaligen und malignen Zellen im Rahmen der Karzinogenese.

Die Bedeutung von *TIG1* als Tumorsuppressorgen wurde in mehreren Studien für verschiedene Tumorentitäten untersucht. Hierzu gehören das Prostatakarzinom, das Kolonkarzinom, Brust-, Lungen- und Hautkrebs sowie Tumoren des hämatopoetischen Systems (Tokumaru et al., 2004; Youssef et al., 2004). Für das Blasenkarzinom konnte bisher keine Promotor-Hypermethylierung an *TIG1* detektiert werden (Tokumaru et al., 2003). In der hier vorliegenden Studie zeigte sich eine signifikante Hypermethylierung von *TIG1* in 31,8% der Fälle. Die Daten implizieren, dass auch dieses Methylierungsverhalten von diagnostischer Bedeutung für das Blasenkarzinom sein kann.

4.2.5 Methylierungsfrequenzen *PTGS2*

PTGS2 ist auch bekannt unter dem Namen *COX2* und stellt das Schlüsselenzym in der Biosynthese der Prostaglandine dar. Diese wiederum spielen eine wichtige Rolle im Rahmen von entzündlichen Geschehen im menschlichen Körper.

In dieser Studie konnte in 24,4% eine Hypermethylierung von *PTGS2* im Promotorbereich nachgewiesen werden. Die einzigen zum Vergleich vorliegenden Daten stammen von (Friedrich et al., 2005), der mittels Untersuchungen an Tumorgewebe von Blasenkarzinom-Patienten eine Methylierung von *PTGS2* in 75,5% der Fälle detektieren konnte. Allerdings wurden in diese Studie lediglich Patienten mit einem nichtinvasiven Blasenkarzinom eingeschlossen.

Weitere Tumorgruppen, in denen die Hypermethylierung von *PTGS2* bereits mit Erfolg nachgewiesen wurde sind Magenkarzinom (Yu et al., 2003), hepatozelluläres Karzinom (Murata et al., 2004), Mammakarzinom (Singh-Ranger et al., 2007) und Prostatakarzinom (Bastian et al., 2007).

4.2.6 Methylierungsfrequenzen *Reprimo*

Reprimo ist ein Bestandteil des p53- Signalweges, der nach einer Zellschädigung sowohl den Zellzyklus als auch Apoptose und DNA-Reparatur reguliert.

In verschiedenen Tumorzelllinien konnte eine Hypermethylierung des Gens im Promotorbereich ermittelt werden (Takahashi et al., 2005). Für Blasenkarzinomzelllinien zeigte sich eine Hypermethylierung in 19% der Fälle. Des Weiteren wurde *Reprimo* eine Rolle in der Karzinogenese des Ösophaguskarzinoms zugeschrieben (Hamilton et al., 2006).

Im Rahmen dieser Studie konnte allerdings keine Hypermethylierung von *Reprimo* nachgewiesen werden, was auf eine geringe Bedeutung in der Pathogenese des Blasenkarzinoms schließen lässt.

4.3 Ursprung der freien DNA

Bei den meisten BCA-Patienten (80%) konnte hypermethylierte DNA nachgewiesen werden. Jedoch ist der Anteil der tumorspezifischen DNA an der freien DNA im Serum nur sehr gering: weniger als 5% der freien DNA stammt von Tumorzellen ab. Daraus ist zu schließen, dass der Tumor indirekt zu einer Erhöhung der freien DNA bei BCA-Patienten führt.

Im Mausmodell konnte ein Anstieg der zellfreien DNA sowohl durch Fas-Ligand (Apoptose) als auch durch Acetaminophen (Nekrose) induziert werden. Je nach Art des Zelltodes wurde ein Anstieg von kleinfragmentärer (Apoptose, <200bp) bzw. hochmolekularer (Nekrose, >400bp) festgestellt (Jahr et al., 2001). Die Beobachtung, dass BCA-Zellen Fas-Ligand exprimieren (Lee et al., 1999) und die Konzentration von Fas-Ligand im Serum von BCA-Patienten erhöht sind (Mizutani et al., 2001), lassen auf eine Rolle proapoptotischer Zytokine für die Erhöhung der zellfreien DNA schließen. Die Zytokine könnten auf diese Weise apoptotische Zellreaktionen in tumorfernen, nicht befallenen Arealen auslösen (Abbildung 21). Dies erklärt, dass nur ein geringer Anteil der detektierten freien DNA methyliert war. Bei einigen BCA-Patienten war auch der Anteil großfragmentärer DNA erhöht. In schnell wachsenden Karzinomen werden oftmals ausgedehnte Nekroseareale beobachtet, die ursächlich für den Anstieg der großen DNA-Fragmente sein könnten.

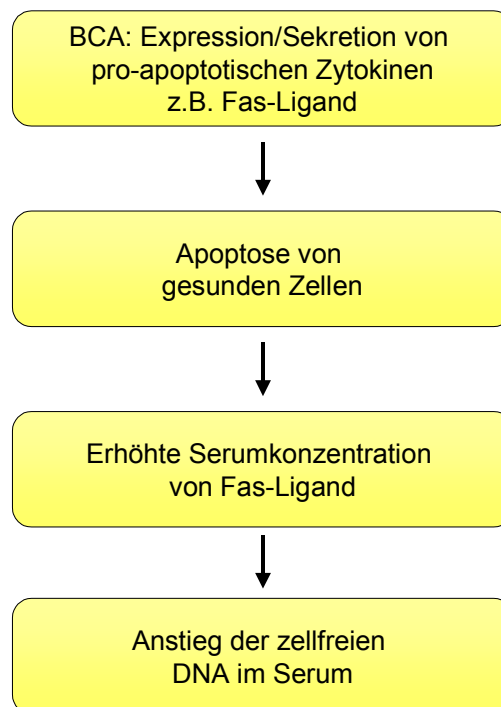


Abbildung 21: Hypothese zur Entstehung freier DNA im Serum

In anderen Tumorentitäten wie Mamma- (Umetani et al., 2006a), HNO-Tumoren (Jiang et al., 2006), Kolon- (Umetani et al., 2006c) und Ovarialkarzinomen (Wang et al., 2003) konnten, im Gegensatz zu den hier vorliegenden Ergebnissen, vermehrt hochmolekulare

freie DNA-Fragmente im Blut der Patienten nachgewiesen werden. Dies deutet darauf hin, dass unterschiedliche Pathomechanismen in den einzelnen Tumorentitäten zu der Erhöhung der zellfreien DNA in der Zirkulation führen.

4.4 Diagnostische Information

4.4.1 Dignität der betrachteten Probe

Mit Hilfe von ROC-Analysen wurden die Cut-off-Werte mit der höchsten Sensitivität und Spezifität ermittelt, um anhand der vorliegenden Daten eine bessere Unterscheidung zwischen Blasenkarzinom- und BPH-Patienten zu ermöglichen.

Mittels der *PTGS2*-Fragmentkonzentrationen konnte eine sehr sensitive (95,6%) Unterscheidung zwischen Karzinom- und BPH-Patienten erzielt werden. Die Spezifität betrug hier 62,2%.

Anhand der Konzentration der *Reprimo*-Fragmente konnten nur sehr eingeschränkt Aussagen bezüglich der Dignität der betrachteten Probe gemacht werden. Hier lag die Sensitivität bei 59,1% und die Spezifität bei 57,8%.

Die höchste Spezifität (69,8%) in der Unterscheidung zwischen beiden Patientengruppen gelang mittels Betrachtung des Apoptoseindex. Die Sensitivität lag bei 86,4%, die AUC bei 0,785.

4.4.2 CpG-Insel-Hypermethylierung der betrachteten Gene

CpG-Insel-Hypermethylierung im Promotorbereich konnte insbesondere bei *APC*, *GSTP1*, *PTGS2* und *TIG1* beobachtet werden. Hier waren zwischen 24 und 60% der detektierten DNA hypermethyliert. *DAPK* war in nur 2% methyliert und *Reprimo* zeigte in keiner der betrachteten Proben eine Hypermethylierung. In Betrachtung nur eines einzelnen Genlokus mit Hilfe der ROC-Analysen wurde mit jeweils hoher Spezifität zwischen den Probandengruppen unterschieden (93,2 bis 100%), jedoch war die Sensitivität nur gering (2,4 bis 59,5%). Die diagnostische Genauigkeit konnte jedoch durch kombinierte Untersuchung mehrerer Gene gesteigert werden. Durch eine „oder“-Verknüpfung zweier oder dreier Gene konnte die Sensitivität auf 66,7 bis 75,6% gesteigert werden bei gleichzeitig hoher Spezifität (93 bis 100%). Am zuverlässigsten konnte die Dignität der betrachteten Probe durch eine „oder“-Verknüpfung von *APC*, *GSTP1* oder *TIG1* ermittelt werden. Hier lagen Sensitivität und Spezifität bei 80,0 bzw. 93,3%.

In Gewebeproben 15 verschiedener Tumorentitäten (u.a. Lunge, Mamma, Kolon, Blase, Niere, Leber) konnte gezeigt werden, dass ein Methylierungsprofil die molekularbiologische Diagnose der zugrunde liegenden Tumorentität ermöglichte (Esteller et al., 2001). In dieser Studie konnten keine signifikanten Unterschiede im Methylierungsprofil von Patienten mit BCA und solchen mit zusätzlich koinzidentem PCA festgestellt werden. Allerdings handelte es sich bei diesen PCA um klinisch nicht-relevante Karzinome, die vermutlich nicht zur Abgabe von Tumor DNA ins Blut neigen. So wurde bislang in keiner Studie der Nachweis von Tumor DNA im Serum/Plasma von Patienten mit inzidentellen PCA beschrieben.

4.4.3 Vergleich mit anderen diagnostischen Verfahren

Zusätzlich wurden die Ergebnisse der ROC-Analysen mit bereits vorliegenden Daten zum ebenfalls postulierten Marker NMP22 und dem bereits etablierten diagnostischen Verfahren der Urinzytologie verglichen. Zum Vergleich wurden die Daten einer Metaanalyse von (Glas et al., 2003) herangezogen, da für die untersuchten Patienten keine ausreichenden Daten zu Zytologie oder NMP22 vorlagen. Der Apoptoseindex zeigt im Vergleich mit beiden Verfahren zwar eine geringere Spezifität, übertrifft sie jedoch deutlich an Sensitivität.

Die kombinierte Betrachtung der Methylierungsprofile von *APC*, *GSTP1* und *TIG1* stellte sich in dieser Studie als potentes Unterscheidungskriterium zwischen gesunden und erkrankten Probanden heraus. Die Untersuchung übertraf an Sensitivität sowohl die Urinzytologie als auch die Bestimmung von NMP22. Die Spezifität war vergleichbar mit derjenigen der Urinzytologie und um 15% höher als die der NMP22-Bestimmung.

Diagnostischer Test	Sensitivität (%)	Spezifität (%)
Zytologie	55	94
Nukleäres Matrixprotein 22 (NMP 22)	67	78
Apoptoseindex	86,4	69,8
Hypermethylierung <i>APC</i> , <i>GSTP1</i> oder <i>TIG1</i>	80	93,3

Tabelle 11: Vergleich verschiedener Tests auf das Vorliegen eines Urothelkarzinoms.

Quelle Daten Zytologie und NMP22: (Glas et al., 2003)

Bei den in dieser Studie untersuchten Tumorpatienten waren zuvor in 16 Fällen urinzytologische Untersuchungen durchgeführt worden, in nur 4 Fällen (25%) konnten Tumorzellen nachgewiesen werden. Auch diese Daten unterstützen die Annahme einer nur eingeschränkten Sensitivität der Urinzytologie.

In der Zusammenschau der vorliegenden Ergebnisse kann also davon ausgegangen werden, dass die Quantifizierung der zellfreien DNA und ihrer aberranten Methylierungsmuster zur Diagnostik des invasiven Blasenkarzinoms geeignet ist. In der Zukunft sind weitere Studien notwendig, die das Potential der freien DNA beim oberflächlichen Harnblasenkarzinom überprüfen.

4.5 Prognostische Information

4.5.1 Tumorspezifisches Überleben

Bezüglich der nachgewiesenen Konzentrationen frei zirkulierender DNA-Fragmente und des Apoptoseindex konnte keine Korrelation mit den betrachteten klinischen Parametern nachgewiesen werden. Allerdings korrelierte der Apoptoseindex signifikant mit dem tumorspezifischen Überleben. Bei einem Cut-off von 12,1 für den Apoptoseindex konnte ein kürzeres BCA-spezifisches Langzeitüberleben für die Patienten mit einem höheren Apoptoseindex festgestellt werden. Die Konzentrationen frei zirkulierender DNA-Fragmente korrelierten nicht mit der tumorspezifischen Mortalität.

4.5.2 Korrelation mit klinisch-pathologischen Parametern

In dieser Studie gelang erstmals der Nachweis, dass die Hypermethylierung von einzelnen (*GSTP1*, *APC*) oder mehreren in Kombination betrachteten Genorten („*GSTP1* oder *TIG1*“, „*APC* oder *TIG1*“) oberhalb des Signifikanzniveaus mit klinisch-pathologischen Parametern wie pT-Stadium, Multifokalität oder dem Vorhandensein positiver Schnittländer korrelierten.

Darüber hinaus zeigte sich die Hypermethylierung von *APC* negativ korreliert mit dem tumorspezifischen Überleben.

Für das Blasen tumorleiden haben sich in Abhängigkeit vom Stadium der Erkrankung unterschiedliche Therapien etabliert. Eine möglichst frühe und einfach zu ermittelnde Kenntnis über den Ausbreitungsgrad des Tumors könnte noch vor Therapiebeginn die Langzeitprognose der Patienten entscheidend verbessern. Die hier vorliegenden Daten

zeigen, dass die Methylierungsraten frei im Serum zirkulierender DNA von Tumorsuppressorgenen eine prognostische Bedeutung haben könnten. Daraus folgt, dass die auf diese Weise gewonnenen Daten noch vor einer operativen Maßnahme zur Planung einer stadienspezifischen und multimodalen Therapie des Blasenkarzinoms herangezogen werden können.

4.6 Perspektiven

Durch Screeninguntersuchungen und Monitoring des klinischen Verlaufs können Diagnose und Therapie maligner Erkrankungen vereinfacht und günstig beeinflusst werden. Hierbei spielen organ- und tumorspezifische Marker eine wichtige Rolle. Ein optimaler Marker sollte in leicht zu gewinnen Körpersekreten (Urin, Blut) kostengünstig und mit hoher Spezifität und Sensitivität nachweisbar sein. Die mit dieser Studie vorliegenden Daten deuten darauf hin, dass die Hypermethylierung und die Fragmentgröße von frei zirkulierender DNA im Serum von BCA-Patienten potentielle Marker darstellen, die diesen Anforderungen gerecht werden könnten.

Bisher wurde für das Blasenkarzinom die Hypermethylierung allerdings fast ausschließlich in Tumorgewebe oder Zelllinien untersucht. Es liegen also zur Zeit keine vergleichbaren Daten vor. Weitere Untersuchungen an einer größeren Anzahl an Patienten und unter Einschluss auch oberflächlicher Tumorstadien wären notwendig, um die Eignung freier DNA im Serum als Tumormarker zu prüfen.

Ein Nachteil der zellfreien DNA als Tumormarker ist die universelle Erhöhung in verschiedenen Tumorentitäten. Zur spezifischeren Diagnose der Karzinomentität könnte der Nachweis spezifischer Methylierungsmuster von ausgewählten Tumorsuppressorgenen im Blut sein. Methylierungsprofile der zellfreien DNA könnten dann nicht nur die Existenz eines malignen Tumorleidens andeuten, sondern auch auf das Ursprungsorgan und ggf. das Tumorstadium schließen lassen.

Eine bessere Vergleichbarkeit der Ergebnisse könnte darüber hinaus durch eine Standardisierung und Automatisierung der Arbeitsmethoden erreicht werden.

5 Zusammenfassung

In dieser Studie wurden die Fragmentgrößen und die Methylierung frei zirkulierender DNA-Fragmente im Serum von Patienten mit Blasenkarzinom untersucht und ihre Eignung als diagnostischer und prognostischer Marker überprüft. Hierzu wurde die freie DNA aus dem Serum von 45 BCA-Patienten isoliert, die sich aufgrund eines invasiven BCA einer radikalen Zystektomie unterzogen. Als Kontrollgruppe dienten 45 BPH-Patienten.

In früheren Studien wurde gezeigt, dass eine Unterscheidung zwischen Karzinompatienten und Gesunden über Fragmentierungsmuster möglich ist, die zudem einen Rückschluss auf den die Genese erlauben (Nekrose >200bp, Apoptose <200bp). Daher wurden die frei zirkulierende Mengen von *PTGS2* (124bp Fragment) und *Reprimo* (271bp Fragment) mittels quantitativer RT-PCR untersucht. *PTGS2*- ($p < 0,001$), *Reprimo*-Fragmente ($p = 0,041$) und der Apoptoseindex (*PTGS2/Reprimo*, $p < 0,001$) zeigten sich bei BCA-Patienten signifikant erhöht. Die Konzentration der *PTGS2*-Fragmente erlaubte die sensitive (96%) Unterscheidung zwischen BCA- und BPH-Patienten (Spezifität 62%). Der Apoptoseindex unterschied weniger sensitiv (81%), aber mit einer höheren Spezifität (71%) zwischen den Patientengruppen. Darüber hinaus korrelierte ein hoher Apoptoseindex signifikant mit einem kürzeren BCA-spezifischen Überleben.

Mittels methylierungssensitiver PCR wurde tumorspezifische DNA im Serum detektiert: CpG-Insel-Hypermethylierung konnte am *APC* (59%), *GSTP1* (59%), *TIG1* (32%), *PTGS2* (24%) und *DAPK* (2%) Promotor nachgewiesen werden; in der Kontrollgruppe zeigte sich in drei Fällen eine Hypermethylierung des *GSTP1* Promotors. Die kombinierte Untersuchung von „*APC*, *GSTP1* oder *TIG1*“ unterschied hochspezifisch (93%) und sensitiv (80%) zwischen beiden Patientengruppen. Zusätzlich konnte eine signifikante Korrelation von Hypermethylierung und ungünstigen klinisch-pathologischen Parametern festgestellt werden (*APC*: pT-Stadium; *GSTP1*, „*GSPT1* oder *TIG1*“: multifokales Wachstum; *APC*, „*APC* oder *TIG1*“: R1-Resektion). Das tumorspezifische Überleben zeigte sich signifikant verkürzt bei erhöhter *APC*-Hypermethylierung.

Obwohl es zu einer Erhöhung der zellfreien DNA bei BCA-Patienten kommt, ist dieser Anstieg nicht durch Tumor-DNA verursacht. Es ist zu vermuten, dass der Tumor zum

Zelltod gesunder Nachbarzellen führt, wobei die Fragmentierungsmuster auf eine apoptotische Genese hindeuten.

6 Literaturverzeichnis

1. Anker P, Mulcahy H, Chen XQ, Stroun M. Detection of circulating tumour DNA in the blood (plasma/serum) of cancer patients. *Cancer Metastasis Rev.* 1999;18:65-73
2. Banno K, Yanokura M, Susumu N, Kawaguchi M, Hirao N, Hirasawa A, Tsukazaki K, Aoki D. Relationship of the aberrant DNA hypermethylation of cancer-related genes with carcinogenesis of endometrial cancer. *Oncol.Rep.* 2006;16:1189-1196
3. Bastian PJ, Ellinger J, Heukamp LC, Kahl P, Muller SC, von Rucker A. Prognostic value of CpG island hypermethylation at PTGS2, RAR-beta, EDNRB, and other gene loci in patients undergoing radical prostatectomy. *Eur.Urol.* 2007;51:665-674
4. Bastian PJ, Ellinger J, Wellmann A, Wernert N, Heukamp LC, Muller SC, von Ruecker A. Diagnostic and prognostic information in prostate cancer with the help of a small set of hypermethylated gene loci. *Clin.Cancer Res.* 2005a;11:4097-4106
5. Bastian PJ, Palapattu GS, Lin X, Yegnasubramanian S, Mangold LA, Trock B, Eisenberger MA, Partin AW, Nelson WG. Preoperative serum DNA GSTP1 CpG island hypermethylation and the risk of early prostate-specific antigen recurrence following radical prostatectomy. *Clin.Cancer Res.* 2005b;11:4037-4043
6. Bertz J, Giersiepen K, Haberland J, Hentschel S, Kaatsch P, Katalinic A, Stabenow R, Stegmaier C, Ziegler H. Harnblase. In: Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (GEKID) in Zusammenarbeit mit dem Robert Koch-Institut (RKI), Hrsg., Krebs in Deutschland. 5. überarbeitete, aktualisierte Auflage. Saarbrücken, Robert Koch Institut: 2006: 80

7. Botezatu I, Serdyuk O, Potapova G, Shelepov V, Alechina R, Molyaka Y, Ananev V, Bazin I, Garin A, Narimanov M, Knysh V, Melkonyan H, Umansky S, Lichtenstein A. Genetic analysis of DNA excreted in urine: a new approach for detecting specific genomic DNA sequences from cells dying in an organism. *Clin.Chem.* 2000;46:1078-1084
8. Cao W, Cai L, Rao JY, Pantuck A, Lu ML, Dalbagni G, Reuter V, Scher H, Cordon-Cardo C, Figlin RA, Belldegrun A, Zhang ZF. Tobacco smoking, GSTP1 polymorphism, and bladder carcinoma. *Cancer* 2005;104:2400-2408
9. Catto JW, Azzouzi AR, Rehman I, Feeley KM, Cross SS, Amira N, Fromont G, Sibony M, Cussenot O, Meuth M, Hamdy FC. Promoter hypermethylation is associated with tumor location, stage, and subsequent progression in transitional cell carcinoma. *J.Clin.Oncol.* 2005;23:2903-2910
10. Chan MW, Chan LW, Tang NL, Lo KW, Tong JH, Chan AW, Cheung HY, Wong WS, Chan PS, Lai FM, To KF. Frequent hypermethylation of promoter region of RASSF1A in tumor tissues and voided urine of urinary bladder cancer patients. *Int.J.Cancer* 2003;104:611-616
11. Chan MW, Chan LW, Tang NL, Tong JH, Lo KW, Lee TL, Cheung HY, Wong WS, Chan PS, Lai FM, To KF. Hypermethylation of multiple genes in tumor tissues and voided urine in urinary bladder cancer patients. *Clin.Cancer Res.* 2002;8:464-470
12. Chang HW, Lee SM, Goodman SN, Singer G, Cho SK, Sokoll LJ, Montz FJ, Roden R, Zhang Z, Chan DW, Kurman RJ, Shih I. Assessment of plasma DNA levels, allelic imbalance, and CA 125 as diagnostic tests for cancer. *J.Natl.Cancer Inst.* 2002;94:1697-1703
13. Christoph F, Hinz S, Kempkensteffen C, Weikert S, Krause H, Schostak M, Schrader M, Miller K. A gene expression profile of tumor suppressor genes commonly methylated in bladder cancer. *J.Cancer Res.Clin.Oncol.* 2007;133:343-349

14. Chun FK, Muller I, Lange I, Friedrich MG, Erbersdobler A, Karakiewicz PI, Graefen M, Pantel K, Huland H, Schwarzenbach H. Circulating tumour-associated plasma DNA represents an independent and informative predictor of prostate cancer. *BJU.Int.* 2006;98:544-548
15. Cohen SM, Shirai T, Steineck G. Epidemiology and etiology of premalignant and malignant urothelial changes. *Scand.J.Urol.Nephrol.Suppl* 2000;105-115
16. Dhawan D, Hamdy FC, Rehman I, Patterson J, Cross SS, Feeley KM, Stephenson Y, Meuth M, Catto JW. Evidence for the early onset of aberrant promoter methylation in urothelial carcinoma. *J.Pathol.* 2006;209:336-343
17. Dominguez G, Carballido J, Silva J, Silva JM, Garcia JM, Menendez J, Provencio M, Espana P, Bonilla F. p14ARF promoter hypermethylation in plasma DNA as an indicator of disease recurrence in bladder cancer patients. *Clin.Cancer Res.* 2002;8:980-985
18. Dulaimi E, Uzzo RG, Greenberg RE, Al Saleem T, Cairns P. Detection of bladder cancer in urine by a tumor suppressor gene hypermethylation panel. *Clin.Cancer Res.* 2004;10:1887-1893
19. Ellinger J, Bastian PJ, Haan K., Heukamp LC, Buettner R, Fimmers R, Mueller SC, von Rucker A. Circulating non-cancerous PTGS2 DNA-Fragments of apoptotic origin in Serum of Prostate cancer patients qualify as diagnostic and prognostic biomarker. *Int.J.Cancer* 2007;
20. Enokida H, Shiina H, Urakami S, Igawa M, Ogishima T, Pookot D, Li LC, Tabatabai ZL, Kawahara M, Nakagawa M, Kane CJ, Carroll PR, Dahiya R. Ethnic group-related differences in CpG hypermethylation of the GSTP1 gene promoter among African-American, Caucasian and Asian patients with prostate cancer. *Int.J.Cancer* 2005;116:174-181
21. Esteller M, Corn PG, Baylin SB, Herman JG. A gene hypermethylation profile of human cancer. *Cancer Res.* 2001;61:3225-3229

22. Esteller M, Sanchez-Cespedes M, Rosell R, Sidransky D, Baylin SB, Herman JG. Detection of aberrant promoter hypermethylation of tumor suppressor genes in serum DNA from non-small cell lung cancer patients. *Cancer Res.* 1999;59:67-70
23. Feinberg AP, Vogelstein B. Alterations in DNA methylation in human colon neoplasia. *Semin.Surg.Oncol.* 1987;3:149-151
24. Fischer JR, Ohnmacht U, Rieger N, Zemaitis M, Stoffregen C, Kostrzewa M, Buchholz E, Manegold C, Lahm H. Promoter methylation of RASSF1A, RARbeta and DAPK predict poor prognosis of patients with malignant mesothelioma. *Lung Cancer* 2006;54:109-116
25. Friedrich MG, Chandrasoma S, Siegmund KD, Weisenberger DJ, Cheng JC, Toma MI, Huland H, Jones PA, Liang G. Prognostic relevance of methylation markers in patients with non-muscle invasive bladder carcinoma. *Eur.J.Cancer* 2005;41:2769-2778
26. Friedrich MG, Weisenberger DJ, Cheng JC, Chandrasoma S, Siegmund KD, Gonzalgo ML, Toma MI, Huland H, Yoo C, Tsai YC, Nichols PW, Bochner BH, Jones PA, Liang G. Detection of methylated apoptosis-associated genes in urine sediments of bladder cancer patients. *Clin.Cancer Res.* 2004;10:7457-7465
27. Gautschi O, Bigosch C, Huegli B, Jermann M, Marx A, Chasse E, Ratschiller D, Weder W, Joerger M, Betticher DC, Stahel RA, Ziegler A. Circulating deoxyribonucleic Acid as prognostic marker in non-small-cell lung cancer patients undergoing chemotherapy. *J.Clin.Oncol.* 2004;22:4157-4164
28. Glas AS, Roos D, Deutekom M, Zwinderman AH, Bossuyt PM, Kurth KH. Tumor markers in the diagnosis of primary bladder cancer. A systematic review. *J.Urol.* 2003;169:1975-1982
29. Goebell PJ, Vom DF, Rodel C, Frohneberg D, Thuroff JW, Jocham D, Stief C, Roth S, Knuchel R, Schmidt KW, Kausch I, Zaak D, Wiesner C, Miller K, Sauer R, Rubben H. [Noninvasive and invasive bladder cancer: diagnostics and treatment]. *Urologe A* 2006;45:873-884

30. Gutierrez MI, Siraj AK, Khaled H, Koon N, El Rifai W, Bhatia K. CpG island methylation in Schistosoma- and non-Schistosoma-associated bladder cancer. *Mod.Pathol.* 2004;17:1268-1274
31. Hamilton JP, Sato F, Jin Z, Greenwald BD, Ito T, Mori Y, Paun BC, Kan T, Cheng Y, Wang S, Yang J, Abraham JM, Meltzer SJ. Reprimo methylation is a potential biomarker of Barrett's-Associated esophageal neoplastic progression. *Clin.Cancer Res.* 2006;12:6637-6642
32. Herman JG, Baylin SB. Gene silencing in cancer in association with promoter hypermethylation. *N.Engl.J.Med.* 2003;349:2042-2054
33. Hoque MO, Begum S, Topaloglu O, Chatterjee A, Rosenbaum E, Van Criekinge W, Westra WH, Schoenberg M, Zahurak M, Goodman SN, Sidransky D. Quantitation of promoter methylation of multiple genes in urine DNA and bladder cancer detection. *J.Natl.Cancer Inst.* 2006;98:996-1004
34. Inbal B, Cohen O, Polak-Charcon S, Kopolovic J, Vadai E, Eisenbach L, Kimchi A. DAP kinase links the control of apoptosis to metastasis. *Nature* 1997;390:180-184
35. Issa JP, Garcia-Manero G, Giles FJ, Mannari R, Thomas D, Faderl S, Bayar E, Lyons J, Rosenfeld CS, Cortes J, Kantarjian HM. Phase 1 study of low-dose prolonged exposure schedules of the hypomethylating agent 5-aza-2'-deoxycytidine (decitabine) in hematopoietic malignancies. *Blood* 2004;103:1635-1640
36. Jahr S, Hentze H, Englisch S, Hardt D, Fackelmayer FO, Hesch RD, Knippers R. DNA fragments in the blood plasma of cancer patients: quantitations and evidence for their origin from apoptotic and necrotic cells. *Cancer Res.* 2001;61:1659-1665
37. Jiang WW, Zahurak M, Goldenberg D, Milman Y, Park HL, Westra WH, Koch W, Sidransky D, Califano J. Increased plasma DNA integrity index in head and neck cancer patients. *Int.J.Cancer* 2006;119:2673-2676

38. Jones PA, Baylin SB. The fundamental role of epigenetic events in cancer. *Nat.Rev.Genet.* 2002;3:415-428
39. Kirkali Z, Chan T, Manoharan M, Algaba F, Busch C, Cheng L, Kiemenev L, Kriegmair M, Montironi R, Murphy WM, Sesterhenn IA, Tachibana M, Weider J. Bladder cancer: epidemiology, staging and grading, and diagnosis. *Urology* 2005;66:4-34
40. Kuester D, Dar AA, Moskaluk CC, Krueger S, Meyer F, Hartig R, Stolte M, Malfertheiner P, Lippert H, Roessner A, El Rifai W, Schneider-Stock R. Early involvement of death-associated protein kinase promoter hypermethylation in the carcinogenesis of Barrett's esophageal adenocarcinoma and its association with clinical progression. *Neoplasia.* 2007;9:236-245
41. Lachner M, O'Sullivan RJ, Jenuwein T. An epigenetic road map for histone lysine methylation. *J.Cell Sci.* 2003;116:2117-2124
42. Lee SH, Lee JY, Park WS, Kim SY, Jang JJ, Yoo NJ. Transitional cell carcinoma expresses high levels of Fas ligand in vivo. *BJU.Int.* 1999;83:698-702
43. Leon SA, Shapiro B, Sklaroff DM, Yaros MJ. Free DNA in the serum of cancer patients and the effect of therapy. *Cancer Res.* 1977;37:646-650
44. Lo YM. Circulating nucleic acids in plasma and serum: an overview. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 2001;945:1-7
45. Lopez-Beltran A, Montironi R. Non-invasive urothelial neoplasms: according to the most recent WHO classification. *Eur.Urol.* 2004;46:170-176
46. Marcus PM, Hayes RB, Vineis P, Garcia-Closas M, Caporaso NE, Autrup H, Branch RA, Brockmoller J, Ishizaki T, Karakaya AE, Ladero JM, Mommsen S, Okkels H, Romkes M, Roots I, Rothman N. Cigarette smoking, N-acetyltransferase 2 acetylation status, and bladder cancer risk: a case-series meta-analysis of a gene-environment interaction. *Cancer Epidemiol.Biomarkers Prev.* 2000;9:461-467

47. Maruyama R, Toyooka S, Toyooka KO, Harada K, Virmani AK, Zochbauer-Muller S, Farinas AJ, Vakar-Lopez F, Minna JD, Sagalowsky A, Czerniak B, Gazdar AF. Aberrant promoter methylation profile of bladder cancer and its relationship to clinicopathological features. *Cancer Res.* 2001;61:8659-8663
48. Mizutani Y, Hongo F, Sato N, Ogawa O, Yoshida O, Miki T. Significance of serum soluble Fas ligand in patients with bladder carcinoma. *Cancer* 2001;92:287-293
49. Muller HM, Widschwendter A, Fiegl H, Ivarsson L, Goebel G, Perkmann E, Marth C, Widschwendter M. DNA methylation in serum of breast cancer patients: an independent prognostic marker. *Cancer Res.* 2003;63:7641-7645
50. Murata H, Tsuji S, Tsujii M, Sakaguchi Y, Fu HY, Kawano S, Hori M. Promoter hypermethylation silences cyclooxygenase-2 (Cox-2) and regulates growth of human hepatocellular carcinoma cells. *Lab Invest* 2004;84:1050-1059
51. Nagase H, Nakamura Y. Mutations of the APC (adenomatous polyposis coli) gene. *Hum.Mutat.* 1993;2:425-434
52. Nakagawa T, Kanai Y, Ushijima S, Kitamura T, Kakizoe T, Hirohashi S. DNA hypomethylation on pericentromeric satellite regions significantly correlates with loss of heterozygosity on chromosome 9 in urothelial carcinomas. *J.Urol.* 2005;173:243-246
53. Neuhausen A, Florl AR, Grimm MO, Schulz WA. DNA methylation alterations in urothelial carcinoma. *Cancer Biol.Ther.* 2006;5:993-1001
54. Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J.Clin.* 2005;55:74-108
55. Pashos CL, Botteman MF, Laskin BL, Redaelli A. Bladder cancer: epidemiology, diagnosis, and management. *Cancer Pract.* 2002;10:311-322
56. Robertson KD, Wolffe AP. DNA methylation in health and disease. *Nat.Rev.Genet.* 2000;1:11-19

57. Rozen S, Skaletzky H Primer 3 on the WWW for general users and for biologist programmers. In: Krawetz S, Misener S, Hrsg. Bioinformatics methods and protocols: Methods in molecular biology.
58. Ryk C, Berggren P, Kumar R, Hemminki K, Larsson P, Steineck G, Lambert B, Hou SM. Influence of GSTM1, GSTT1, GSTP1 and NAT2 genotypes on the p53 mutational spectrum in bladder tumours. *Int.J.Cancer* 2005;113:761-768
59. Sadetzki S, Bensal D, Blumstein T, Novikov I, Modan B. Selected risk factors for transitional cell bladder cancer. *Med.Oncol.* 2000;17:179-182
60. Sanchez-Cespedes M, Esteller M, Wu L, Nawroz-Danish H, Yoo GH, Koch WM, Jen J, Herman JG, Sidransky D. Gene promoter hypermethylation in tumors and serum of head and neck cancer patients. *Cancer Res.* 2000;60:892-895
61. Sauter G. WHO classification of tumours of the urinary system and male genital organs. In: Eble JN SGEJSI, Hrsg. Lyon: IARCC Press
62. Silva JM, Silva J, Sanchez A, Garcia JM, Dominguez G, Provencio M, Sanfrutos L, Jareno E, Colas A, Espana P, Bonilla F. Tumor DNA in plasma at diagnosis of breast cancer patients is a valuable predictor of disease-free survival. *Clin.Cancer Res.* 2002;8:3761-3766
63. Singh-Ranger G, Salhab M, Mokbel K. The role of cyclooxygenase-2 in breast cancer: review. *Breast Cancer Res.Treat.* 2007;
64. Srivastava DS, Mishra DK, Mandhani A, Mittal B, Kumar A, Mittal RD. Association of genetic polymorphism of glutathione S-transferase M1, T1, P1 and susceptibility to bladder cancer. *Eur.Urol.* 2005;48:339-344
65. Tada Y, Wada M, Taguchi K, Mochida Y, Kinugawa N, Tsuneyoshi M, Naito S, Kuwano M. The association of death-associated protein kinase hypermethylation with early recurrence in superficial bladder cancers. *Cancer Res.* 2002;62:4048-4053

66. Takahashi T, Suzuki M, Shigematsu H, Shivapurkar N, Echebiri C, Nomura M, Stastny V, Augustus M, Wu CW, Wistuba II, Meltzer SJ, Gazdar AF. Aberrant methylation of Reprimo in human malignancies. *Int.J.Cancer* 2005;115:503-510
67. Tokumaru Y, Harden SV, Sun DI, Yamashita K, Epstein JI, Sidransky D. Optimal use of a panel of methylation markers with GSTP1 hypermethylation in the diagnosis of prostate adenocarcinoma. *Clin.Cancer Res.* 2004;10:5518-5522
68. Tokumaru Y, Sun DI, Nomoto S, Yamashita K, Sidransky D. Re: Is TIG1 a new tumor suppressor in prostate cancer? *J.Natl.Cancer Inst.* 2003;95:919-920
69. Umetani N, Giuliano AE, Hiramatsu SH, Amersi F, Nakagawa T, Martino S, Hoon DS. Prediction of breast tumor progression by integrity of free circulating DNA in serum. *J.Clin.Oncol.* 2006a;24:4270-4276
70. Umetani N, Hiramatsu S, Hoon DS. Higher amount of free circulating DNA in serum than in plasma is not mainly caused by contaminated extraneous DNA during separation. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 2006b;1075:299-307
71. Umetani N, Kim J, Hiramatsu S, Reber HA, Hines OJ, Bilchik AJ, Hoon DS. Increased integrity of free circulating DNA in sera of patients with colorectal or periampullary cancer: direct quantitative PCR for ALU repeats. *Clin.Chem.* 2006c;52:1062-1069
72. Valenzuela MT, Galisteo R, Zuluaga A, Villalobos M, Nunez MI, Oliver FJ, Ruiz de Almodovar JM. Assessing the use of p16(INK4a) promoter gene methylation in serum for detection of bladder cancer. *Eur.Urol.* 2002;42:622-628
73. Wallner M, Herbst A, Behrens A, Crispin A, Stieber P, Goke B, Lamerz R, Kolligs FT. Methylation of serum DNA is an independent prognostic marker in colorectal cancer. *Clin.Cancer Res.* 2006;12:7347-7352
74. Wang BG, Huang HY, Chen YC, Bristow RE, Kassaei K, Cheng CC, Roden R, Sokoll LJ, Chan DW, Shih I. Increased plasma DNA integrity in cancer patients. *Cancer Res.* 2003;63:3966-3968

75. Weiss C, Wolze C, Engehausen DG, Ott OJ, Krause FS, Schrott KM, Dunst J, Sauer R, Rodel C. Radiochemotherapy after transurethral resection for high-risk T1 bladder cancer: an alternative to intravesical therapy or early cystectomy? *J.Clin.Oncol.* 2006;24:2318-2324
76. Widschwendter A, Ivarsson L, Blassnig A, Muller HM, Fiegl H, Wiedemair A, Muller-Holzner E, Goebel G, Marth C, Widschwendter M. CDH1 and CDH13 methylation in serum is an independent prognostic marker in cervical cancer patients. *Int.J.Cancer* 2004;109:163-166
77. Winquist E, Knox J, Ayoub JP, Wood L, Wainman N, Reid GK, Pearce L, Shah A, Eisenhauer E. Phase II trial of DNA methyltransferase 1 inhibition with the antisense oligonucleotide MG98 in patients with metastatic renal carcinoma: a National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group investigational new drug study. *Invest New Drugs* 2006;24:159-167
78. Wu TL, Zhang D, Chia JH, Tsao KH, Sun CF, Wu JT. Cell-free DNA: measurement in various carcinomas and establishment of normal reference range. *Clin.Chim.Acta* 2002;321:77-87
79. Yates DR, Rehman I, Meuth M, Cross SS, Hamdy FC, Catto JW. Methylation analysis: a prospective study of bladder cancer patients and age stratified benign controls. *Oncogene* 2006;25:1984-1988
80. Yegnasubramanian S, Kowalski J, Gonzalvo ML, Zahurak M, Piantadosi S, Walsh PC, Bova GS, De Marzo AM, Isaacs WB, Nelson WG. Hypermethylation of CpG islands in primary and metastatic human prostate cancer. *Cancer Res.* 2004;64:1975-1986
81. Youssef EM, Chen XQ, Higuchi E, Kondo Y, Garcia-Manero G, Lotan R, Issa JP. Hypermethylation and silencing of the putative tumor suppressor Tazartene-induced gene 1 in human cancers. *Cancer Res.* 2004;64:2411-2417
82. Yu J, Leung WK, Lee TL, Tse PC, To KF, Sung JJ. Promoter hypermethylation of cyclooxygenase-2 in gastric carcinoma. *Int.J.Oncol.* 2003;22:1025-1031

83. Zhang JJ, Ouyang T, Wan WH, Xu GW, Deng GR. [Detection and significance of APC gene promoter hypermethylation in serum of breast cancer patients]. *Ai.Zheng.* 2007;26:44-47
84. Zhong XY, Hahn S, Kiefer V, Holzgreve W. Is the quantity of circulatory cell-free DNA in human plasma and serum samples associated with gender, age and frequency of blood donations? *Ann.Hematol.* 2007;86:139-143

7 Danksagung

Ich möchte mich bei allen bedanken, die mich bei der Entstehung dieser Arbeit unterstützt haben:

- meiner Familie und meinen Freunden, die mich immer unterstützt haben.
- meinem Mann Herrn Dr. med. Jörg Ellinger für seine schier grenzenlose Geduld und seine unzähligen Hilfestellungen in jedem Stadium der Arbeit.
- PD Dr. med. P. Bastian für die Überlassung des Themas und die stets kompetente Betreuung der Arbeit.
- Doris Schmidt für die Mithilfe bei der Versuchsplanung.
- Kim Haan für die gelungene Zusammenarbeit bei der Etablierung der Methoden.

8 Publikationsverzeichnis

8.1 Originalartikel:

Ellinger J, Bastian PJ, Ellinger N, Kahl P, Perabo FG, Büttner R, Müller SC, Ruecker A
Apoptotic DNA fragments in serum of patients with muscle invasive bladder cancer: A
prognostic entity.

Cancer Lett. 2008, online publication

Ellinger J, El Kassem N, Heukamp LC, Matthews S, Cubukluoz F, Kahl P, Perabo FG,
Müller SC, Ruecker A, Bastian PJ

Hypermethylation of cell-free serum DNA indicates worse outcome in patients with
bladder cancer.

J Urol. 2008, 179(1): 346-352

8.2 Poster

Ellinger J, Ellinger N, Heukamp LC, Kahl P, Perabo FG, Büttner R, Müller SC, Ruecker
A, Bastian PJ

Cell-free DNA in serum of patients with bladder cancer: Diagnostic and prognostic
implications.

23rd Annual EAU Congress, 26.3.-29.3.2008, Mailand, Italien

Eur Urol Suppl 2008, 7(3) 207; Abstract 548

Bastian PJ, Ellinger J, Ellinger N, Heukamp LC, Kahl P, Perabo FG, Ruecker A, Müller
SC

Hypermethylation of cell-free serum DNA indicates worse outcome in patients with
bladder cancer.

23rd Annual EAU Congress, 26.3.-29.3.2008, Mailand, Italien

Eur Urol Suppl 2008, 7(3) 208; Abstract 549