

**Urin-assoziierte Ribonukleinsäure-basierte Tumormarker
beim Harnblasenkarzinom:
Entwicklung einer nicht-invasiven Diagnostik**

Dissertation

Zur Erlangung des akademischen Grades
Doktorin der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)
der Technisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität zu Lübeck

vorgelegt von

Merle Hanke

geboren am 01.11.1977 in Eutin

Lübeck, 2007

Die Arbeit wurde am Institut für Molekulare Medizin der Universität zu Lübeck unter der Betreuung von Prof. Dr. rer. nat. Georg Sczakiel angefertigt.

Erstgutachter: Prof. Dr. G. Sczakiel

Zweitgutachter: Prof. Dr. H. Stürzbecher

Drittgutachter: Prof. Dr. L. Gissmann

Datum der mündlichen Prüfung: 03.03.2008

zum Druck genehmigt: Lübeck, den 03.03.2008

gez. Prof. Dr. rer. nat. E. Hartmann

- Dekan der Technisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät -

Abkürzungen

ACTB	beta-Aktin
Akt1	humane Protein Kinase Akt1
AMP	Ampicillin
ANGPT1	Angiopoeitin 1
ANGPT2	Angiopoeitin 2
APS	Ammonium-Peroxodisulfat
Apaf1	Apoptose Protease-aktivierender Faktor 1
ATM	<i>ataxia telangiectasia mutated protein</i>
AUC	<i>area under the curve</i>
Bad	<i>BCL2-antagonist of cell death</i>
BAX	Bcl-2-assoziiertes Protein X Protein
bp	Basenpaare
BCL2L1 (Bcl-x _L)	<i>B-cell CLL/lymphoma xL</i>
Bcl-2	<i>B-cell CLL/lymphoma 2</i>
BCG	<i>Bacillus Calmette-Guérin</i>
BRCA1	<i>breast cancer 1, early onset</i>
BSA	Rinderserum Albumin
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
CASP8	Caspase 8
CC3	HIV-1 Tat interaktives Protein 2 (30 kDa)
CCNE1	Cyclin E1
CDC25A	<i>cell division cycle 25 homolog A (S. pombe)</i>
CDK2	<i>cyclin-dependent kinase 2</i>
CDK4	<i>cyclin-dependent kinase 4</i>
CDKN1A	<i>cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (p21, Cip1)</i>
CDKN2A	<i>cyclin-dependent kinase inhibitor 2A (melanoma, p16, inhibits CDK4)</i>
CDDP	Cisplatin
cDNA	<i>complementary</i> Desoxyribonukleinsäure
CHK2	<i>checkpoint homolog (S. pombe)</i>
CFLAR	<i>CASP8 and FADD-like apoptosis regulator</i>
COL18A1	Kollagen, Type XVIII, Alpha 1
DD	<i>death domain</i>
CARD	Caspase-Rekrutierungs-Domäne
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CSF-1	<i>Colony Stimulating growth factor 1</i>
Ct	Cycle _{threshold}
CTC	<i>cycling tumor cells</i>
Da	Dalton
DED	<i>death effector domain</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	2'-Desoxynukleosid-5'-triphosphat
DTT	Dithiothreitol
E2F1	E2F Transcriptionsfaktor 1
EDTA	Ethylendiamin-Tetraessigsäure
EGFR	<i>epidermal growth factor receptor</i>
ELISA	<i>Enzyme-Linked-Immunsorbent-Assay</i>
v-erb-b2	<i>erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 2, neuro/glioblastoma derived oncogene homolog (avian)</i>
Erk	<i>extracellular regulated MAP kinase</i>
ETS2	v-Ets Erythroblastosis Virus E26
FAS	<i>Fas (TNF receptor superfamily, member 6)</i>
FAK	PTK2 Protein Tyrosin Kinase 2
FGFR2	<i>fibroblast growth factor receptor 2</i>
FGFR3	<i>fibroblast growth factor receptor 3</i>
FOS	<i>V-fos FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog</i>

Abkürzungsverzeichnis

FDA	<i>US Food and Drug Administration</i>
FDP	Fibrindeggradationsprodukten
FISH	Fluoreszenz <i>in situ</i> Hybridisierung
g	Gramm
GAPDH	Glycerinaldehydphosphat-Dehydrogenase
GEM	Gemcitabin
GuSCN	Guanidiniumthiocyanat
GZMA	Granzym A
h	Stunde
HA	Hyaluronsäure
HAase	Hyaluronidase
HRP	Meerrettich-Peroxidase
HTATIP2	HIV-1 Tat interaktives Prpotein 3, 30 kDa
HTERT	humane Telomerase reverse Transkriptase
HTR	humane Telomerase RNA
IFNA1	Interferon, alpha 1
IFNB1	Interferon, beta 1
IGF1	<i>Insulin-like growth factor 1</i>
IL8	Interleukin 8
ISUP	<i>International Society of Urological Pathology</i>
ITGA1	Integrin, alpha 1
ITGA2	Integrin, alpha 2
ITGA3	Integrin, alpha 3
ITGA4	Integrin, alpha 4
ITGAV	Integrin, alpha 5
ITGB1	Integrin, beta 1
ITGB3	Integrin, beta 3
ITGB5	Integrin, beta 5
JUN	<i>V-jun sarcoma virus 17 oncogene homolog (avian)</i>
k	Kilo
kb	Kilobase = 1000 Basenpaare
Ki-67	<i>antigene identified by monoclonal antibody Ki-67</i>
l	Liter
LB	Luria Broth (ein Bakterienmedium)
LOH	<i>loss of heterozygosity</i>
μ	mikro (10 ⁻⁶)
m	Meter
M	Molarität (mol/l)
MAP2K1	Mitogen-aktivierte Protein Kinase 1
MCAM	<i>melanoma cell adhesion molecule</i>
MDM2	<i>Mdm2, transformed 3T3 cell double minute 2, p53 binding protein</i>
MDR	Multi Drug Resistance
MET	Met Proto-Onkogen
MGB	<i>minor groove binder</i>
MHC I	<i>Major histocompatibility complex class I</i>
miRNA	microRNA
Min	Minute
MMC	Mitomycin C
M-MLV	<i>Moloney Murine Leukemia Virus</i>
MMP2	Matrix-Metalloprotease 2
MMP9	Matrix-Metalloprotease 9
mRNA	<i>messenger RNA</i>
MTA1	<i>Metastasis associated 1</i>
MTA2	<i>Metastasis associated 1 family, member 2</i>
MTS	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-Carboxymethoxyphenyl)- 2-(4-Sulfophenyl)-2H-Tetrazolium
MTSS1	<i>Metastasis suppressor 1</i>
MYC	<i>V-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog (avian)</i>
n	nano (10 ⁻⁹)
NFKB1	<i>Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells1(p105)</i>

Abkürzungsverzeichnis

NFKBIA	<i>Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, alpha</i>
NME1	<i>Non-metastatic cells 1, protein (NM23A)</i>
NME4	<i>Non-metastatic cells 4, protein (NM23A)</i>
NMP22	Nukleäres Matrix Protein 22
Non-RT	Kontroll-Ansatz bei der cDNA-Synthese ohne Reverse-Transkriptase
OD	optische Dichte
OP18	Onkoprotein 18
PAA	Polyacrylamid
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PDGFA	<i>Platelet-derived growth factor alpha polypeptide</i>
PDGFB	<i>Platelet-derived growth factor beta polypeptide (simian sarcoma viral (v-sis) oncogene homolog)</i>
PI3K	Phosphatidylinositol 3-Kinase
PLAU	uPA
PLAUR	uPA Rezeptor
PNN	Pinin, Desmosom-assoziiertes Protein
pH	pH-Wert ($\text{pH} = -\log_{10} [\text{Protonenkonzentration (mol/l)}]$)
RAF-1	<i>V-raf-1 murine leukemia viral oncogene homolog 1</i>
RB 1	Retinoblastoma-Protein 1
RISC	RNA-induced silencing complex
RNA	Ribonukleinsäure
RNAi	RNA-Interferenz
RNase	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen pro Minute
ROC	<i>receiver operating characteristic</i>
RT	Raumtemperatur
RTK	Rezeptor-Tyrosin-Kinase
RT-qPCR	Reverse Transkriptase quantitative PCR
S100A4	S100 Calcium-bindendes Protein A4
SCLC	<i>small cell lung carcinoma</i>
sec	Sekunde
SDS	Natriumdodecylsulfat
SERPINB5	Serin (oder Cystein) Proteinase Inhibitor, Clade B (Ovalbumin), Mitglied 5
SERPINB1	Serin (oder Cystein) Proteinase Inhibitor, Clade E (Nexin, Plasminogen Aktivator Inhibitor Typ 1), Mitglied 1
SNCG	Synuclein, gamma (Bruskrrebs-spezifisches Protein 1)
SNP	<i>single nucleotide polymorphism</i>
SPSS	<i>Statistical Package for the Social Sciences</i>
SYK	<i>Spleen tyrosine kinase</i>
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TE	Tris-EDTA-Puffer
TEK	<i>TEK tyrosine kinase, endothelial (venous malformations, Multiple cutaneous and mucosal</i>
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TGFB1	<i>Transforming growth factor, beta 1 (Camurati-Engelmann disease)</i>
TGFR1	<i>Transforming growth factor, beta receptor 1 (activin A receptor type II-like kinase, 53 kDa)</i>
THBS1	Thrombospondin 1
TIMP1	<i>tissue inhibitors of metalloproteinase 1 (erythroid potentiating activity, collagenase inhibitor)</i>
TIMP3	<i>tissue inhibitors of metalloproteinase 3 (Sorsby fundus dystrophy, pseudoinflammatory)</i>
TNF	Tumor Nekrosis Faktor, Mitglied 2
TNF- α	Tumor Nekrosis Faktor alpha
TNFRSF10B	Tumor Nekrosis Faktor Rezeptor, Mitglied 10b
TNFRSF1A	Tumor Nekrosis Faktor Rezeptor, Mitglied 1A
TNFRSF25	Tumor Nekrosis Faktor Rezeptor, Mitglied 25
TP53	Tumor Protein 53 (Li-Fraumeni Syndrom)
TRADD	TNF-Rezeptor-assoziiertes Protein

Abkürzungsverzeichnis

TUR	Transurethrale Resektion
TWIST1	Twist Homolog 1 (Acrocephalosyndaktylie 3; Saethre-Chotzen Syndrom) (<i>Drosophila</i>)
U	Unit
UCC1	<i>Upregulated in colorectal cancer gene 1</i>
UE	Untereinheit
uPA	Urokinase Plasminogen Aktivator
uPAR	Urokinase Plasminogen Aktivator Rezeptor
UICC	Union Internationale Contre le Cancer
UPK1A	Uroplakin 1A
UPK1B	Uroplakin 1B
UPK2	Uroplakin 2
UPK3	Uroplakin 3
UV	Ultraviolett
VZ	Verdopplungszeit
V	Volt
VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor</i>
vs	<i>versus</i>
v/v	volume per volume
WHO	<i>World Health Organization</i>
wt	Wildtyp
x	mal
xg	mal Erdbeschleunigung (<i>gravity</i>)

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	1
1.1	Diagnostik des Harnblasenkarzinoms	1
1.1.1	<i>Nicht-invasive Diagnostik des Harnblasenkarzinoms</i>	2
1.2	Klassifizierung von Harnblasenkarzinomen	5
1.3	Tumorigenese des Harnblasenkarzinoms	7
1.4	Progression und Invasion des Harnblasenkarzinoms	9
1.5	Urin-basierte molekulare Diagnostik des Harnblasenkarzinoms	10
1.5.1	Evaluation neuer RNA-Tumormarker	11
1.5.2	MicroRNA-basierte Diagnostik des Harnblasenkarzinoms	12
1.5.3	Messenger (m)RNA-basierte Diagnostik des Harnblasenkarzinoms	13
1.5.4	Strategien zur Normalisierung der mRNA-Abundanz im Gesamturin	17
1.6	Zielsetzung der Arbeit	19
2	MATERIAL UND METHODEN	20
2.1	Materialien	20
2.1.1	Geräte	20
2.1.2	Chemikalien	21
2.1.3	Puffer und Lösungen	22
2.2	Herkunft, Sammlung, Analyse und Lagerung von Urinproben	22
2.2.1	Klinische Proben	23
2.2.2	Herstellung und Stabilisierung verschiedener Urinfraktionen	23
2.2.3	Quantifizierung der RNase-Aktivität im Urin	24
2.3	Molekularbiologische Methoden	25
2.3.1	Verwendete Gelelektrophoresesysteme	25
2.3.1.1	<i>Analytische native Agarosegelelektrophorese</i>	26
2.3.1.2	<i>Analytische native Polyacrylamidgelelektrophorese</i>	26
2.3.1.3	<i>Analytische denaturierende Polyacrylamidgelelektrophorese</i>	26
2.3.2	Test auf RNase-Kontamination	27
2.3.3	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	27
2.3.4	Ethanol-Präzipitation	27
2.3.5	Präparation eines externen RNA-Standards (RNA _{LUC})	28
2.3.5.1	<i>Kultivierung transformierter Bakterien sowie Präparation von Plasmid-DNA</i>	28
2.3.5.2	<i>In vitro Transkription</i>	29
2.3.6	Präparation von Gesamt-RNA aus Urinproben	30
2.3.6.1	<i>Standardprotokoll zur Präparation von Gesamt-RNA aus Urin mittels RNeasy® Midi Kit</i>	30
2.3.6.2	<i>Präparation von Gesamt-RNA aus Urin mittels RNeasy® Mini Kit</i>	31
2.3.6.3	<i>Präparation von Gesamt-RNA aus Urin mittels QiAmp MinElute Virus Kit</i>	31
2.3.6.4	<i>Präparation von Gesamt-RNA aus Urin mittels QiAmp UltraSens Virus Kit</i>	31
2.3.6.5	<i>Präparation von Gesamt-RNA aus Urin mittels NucleoSpin® Virus F Kit</i>	32
2.3.6.6	<i>Präparation von Gesamt-RNA aus Zelllinien und Reverse Transkription präparierter RNA</i>	32

2.3.7	Reverse Transkriptase-Reaktion präparierter RNA: Standard Protokoll	33
2.3.8	Polymerasekettenreaktion (PCR)	33
2.3.8.1	<i>PCR Amplikons</i>	33
2.3.8.2	<i>Konventionelle PCR</i>	35
2.3.8.3	<i>Einstellungen des Pipettierroboters</i>	36
2.3.8.4	<i>Quantitative PCR (qPCR, Standardprotokoll) und Analyse der Daten</i>	37
2.3.8.5	<i>Analyse von Schmelzprodukten</i>	39
2.3.8.6	<i>qPCR-Array</i>	39
2.3.9	Verdünnungsexperimente zur Bestimmung möglicher inhibitorischer Effekte der RNA-Extrakte („spike-Experimente“)	41
2.3.10	MicroRNA-Analyse	41
2.3.10.1	<i>Präparation von miRNA aus Gesamturin sowie RT-PCR-Analyse</i>	42
2.3.10.2	<i>RT-qPCR-Array und Einzelanalyse ausgewählter miRNAs</i>	44
2.4	Zellkultur	46
2.5	Suppression von mRNA mittels siRNA	47
2.5.1	Messenger RNA Strukturanalyse und Entwurf von siRNAs	47
2.5.2	Standardprotokoll zur Transfektion von siRNAs	48
2.6	Charakterisierung siRNA-behandelter Zellen	49
2.6.1	Denaturierende SDS Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) sowie Nachweis spezifischer Proteine (Western-Blot)	49
2.6.2	Mikroskopische Aufnahmen	50
2.6.3	Bestimmung der Zellviabilität anhand des MTS-Assays	51
2.6.4	Nachweis von Apoptose	51
2.6.5	Chemosensibilisierung siRNA-behandelter Zellen	52
2.7	Datenanalyse und statistische Auswertung	53
3	ERGEBNISSE	55
3.1	Analyse von miRNAs im Urin von Harnblasenkarzinompatienten	55
3.1.1	Methodologie zur Detektion von miRNAs im Urin	55
3.1.2	RT-qPCR-Array-basierte Analyse der miRNA-Zusammensetzung im Urin von Harnblasenkarzinompatienten	58
3.1.3	Einzelanalyse ausgewählter miRNAs im Urin von Harnblasenkarzinompatienten	60
3.2	Messenger RNAs im Urin von Harnblasenkarzinompatienten	62
3.2.1	Methodologie zur Detektion von RNA im Urin mittels RT-qPCR	62
3.2.1.1	<i>Effizienz entwickelter qPCR-Amplikons am Beispiel von Ki-67</i>	63
3.2.1.2	<i>Vergleich verschiedener Systeme zur RNA-Präparation aus Urin</i>	65
3.2.1.3	<i>Technische Analyse des RNA-Präparations- und Quantifizierungssystems</i>	67
3.2.1.3.1	<i>Entwicklung eines externen RNA Standards</i>	68
3.2.1.3.2	<i>Stabilisierung und Lagerung von Urinproben</i>	71
3.2.1.3.3	<i>Interne Referenz-mRNAs im Urin</i>	73
3.2.1.3.4	<i>Bestimmung der RNase-Aktivität im Urin</i>	80
3.2.1.3.5	<i>Spender-abhängiger Einfluss der Urin-Zusammensetzung auf die Detektion von RNA</i>	82

Inhaltsverzeichnis

3.2.2	Potentielle mRNA-Tumormarker des Harnblasenkarzinoms	83
3.2.2.1	<i>RT-qPCR-basiertes Screening von 84 potentiellen mRNA-Tumormarkern im Urin</i>	84
3.2.2.2	<i>Rationale Auswahl publizierter mRNA-Tumormarker</i>	86
3.2.3	Detektion ausgewählter mRNA-Tumormarker im Urin von Harnblasenkarzinompatienten	88
3.2.3.1	<i>Detektion von Harnblasenkarzinomen über die Urin-assoziierte mRNA-Ratio ETS2/uPA</i>	89
3.2.3.2	<i>OP18/UPK1A als malignitätsspezifische mRNA-Ratio im Urin</i>	95
3.2.3.3	<i>Tumormarker mRNA-Ratios im Urin von Tumornachsorge-Patienten</i>	98
3.3	Tumorbiologie von OP18 und UPK1A beim Harnblasenkarzinom	100
3.3.1	OP18/UPK1A mRNA-Ratio in kultivierten Harnblasenkarzinomzellen	100
3.3.2	siRNA-vermittelte Suppression von OP18- und UPK1A-mRNA	102
3.3.3	mRNA-Expressionsanalyse nach Hemmung von OP18 und UPK1A	105
3.3.4	Phänotypische Charakterisierung von siRNA-supprimierten Zellen.	112
3.3.4.1	<i>Viabilität bei Hemmung von UPK1A und OP18</i>	113
3.3.4.2	<i>Zellproliferation bei Hemmung von UPK1A und OP18</i>	113
3.3.4.3	<i>Apoptoserate bei Hemmung von UPK1A und OP18</i>	115
3.3.4.4	<i>Nachweis von Autophagosomen bei Hemmung von UPK1A und OP18</i>	116
3.3.4.5	<i>Chemosensibilisierung bei Hemmung von UPK1A und OP18</i>	118
3.3.5	Modell zur tumorbiologischen Rolle von UPK1A und OP18	120
4	DISKUSSION	121
4.1	Nicht-invasive Diagnostik des Harnblasenkarzinoms	121
4.1.1	RT-qPCR-basierte Tumordiagnostik im Gesamturin	122
4.1.2	Phase 1 der Tumormarker-Entwicklung: Technische Analyse der RT-qPCR-basierten Quantifizierung von RNAs im Urin	125
4.1.3	Phase 2 der Tumormarker-Entwicklung: klinische Relevanz identifizierter potentieller Tumormarker	130
4.1.4	MicroRNA-basierte Identifizierung von Harnblasenkarzinomen	137
4.2	Konsequenzen aus dieser Arbeit für Behandlungsstrategien beim Harnblasenkarzinom	138
5	ZUSAMMENFASSUNG	143
6	LITERATURVERZEICHNIS	145
7	ANHANG	154
7.1	RT-qPCR-basierte Analyse der miRNA-Zusammensetzung im Urin von Harnblasenkarzinompatienten	154
7.2	Charakteristika entworfener qPCR-Amplikons	157
7.2.1	qPCR-Amplikons der mRNA-Tumormarker	157
7.2.2	qPCR-Amplikons der Referenz-RNAs	161
7.3	Diagnostische Aussagekraft Urin-assoziiertes mRNA-Tumormarker	167

1 Einleitung

1.1 Diagnostik des Harnblasenkarzinoms

Nach Schätzungen des Robert-Koch-Instituts erkranken in Deutschland jedes Jahr etwa 25.950 Menschen an Harnblasenkarzinomen. Männer sind dabei zweieinhalb Mal so häufig betroffen wie Frauen. Wie bei den meisten bösartigen Tumoren gibt es auch beim Harnblasenkarzinom keine eindeutigen Symptome, die auf diese Erkrankung hinweisen. Eine Mikro- oder seltener eine Makrohämaturie (Vorliegen von Blut im Urin) tritt bei 80% der Patienten mit einem Harnblasenkarzinom als erstes Symptom auf, wobei eine Mikrohämaturie allerdings bei fast allen Erkrankungen im Harnblasen- und Nierensystem vorkommt. Die übrigen 20% der Patienten haben Symptome, die denen einer Blasenentzündung entsprechen. Schmerzen entstehen erst sehr spät in weit fortgeschrittenen Stadien oder wenn ein Harnleiter (von der Niere zur Blase) oder die Harnröhre durch den Tumor verlegt ist. Für die Diagnostik sowie für Nachsorgeuntersuchungen von Harnblasenkarzinomen ist der „Goldstandard“ nach wie vor die Zystoskopie (Blasenspiegelung). Die Qualität eines diagnostischen Verfahrens wird anhand der erreichten Sensitivität und Spezifität innerhalb der untersuchten Patientengruppe bewertet. Hierbei gibt die Sensitivität den prozentualen Anteil der Patientenproben an, bei denen die Erkrankung richtig diagnostiziert wurde. Mit der diagnostischen Spezifität wird der prozentuale Anteil der gesunden Patientengruppe angegeben, welcher anhand des Verfahrens auch als gesund identifiziert werden konnte. Ein optimaler diagnostischer Test sollte sich einer Sensitivität und Spezifität von 100% annähern, allerdings wird ein diagnostischer Test bereits ab einer Sensitivität und Spezifität von 70% als klinisch relevant angesehen.

Mit der Zystoskopie wird eine Sensitivität von über 90% erreicht. Die Nachteile dieser Technik sind zum einen die hohen Untersuchungskosten, zum anderen wird die Technik invasiv durchgeführt, das heißt, dass beim Patienten ein Eingriff durchgeführt werden muss. Darüber hinaus werden flache maligne Tumoren des Urothels (Carcinomata *in situ*, pTis, Abbildung 1-1) nur unzureichend über Weißlichtendoskopie detektiert [1], so dass ungefähr die Hälfte dieser Tumorentitäten bei der Untersuchung übersehen wird. Neben der Zystoskopie wird die Urinzytologie als nicht-invasives Verfahren zur Detektion von Harnblasenkarzinomen angewandt. Mit der Urinzytologie können Harnblasenkarzinome zwar mit einer hohen Spezifität (81–100%) aber nur mit einer Sensitivität von 28–76,47% identifiziert werden (Tabelle 1-1). Während bei invasiven Tumoren und Carcinomata *in situ* die Sensitivität dieses Tests noch bei 75–95% liegt [2], werden gut differenzierte papilläre Tumoren über Zytologie jedoch nur unbefriedigend erkannt, da sich die Zellmorphologie nur gering von abgeschilferten, nicht-entarteten Urothelzellen unterscheidet. Die daraus resultierende falsch-negativ Rate von etwa 40% ist dementsprechend hoch. Zudem ist die Zytologie ein Verfahren, welches sehr von der subjektiven Beurteilung des Untersuchers abhängig ist. Daraus ergibt sich die Notwendigkeit für die Identifizierung spezifischer Tumormarker, welche nicht-invasiv und mit geringerem Kostenaufwand im Urin von

Harnblasenkarzinompatienten nachgewiesen werden können. Tumormarker können beispielsweise Proteine oder Nukleinsäuren sein, deren qualitative oder quantitative Analyse eine Aussage sowohl über das Vorliegen als auch über die Prognose einer Tumorerkrankung ermöglichen kann.

In diesem Zusammenhang war das Hauptziel der vorliegenden Arbeit, im Urin von Harnblasenkarzinompatienten nach potentiellen RNA-Tumormarkern zu suchen, um auf der Grundlage Urin-assoziiertes RNA eine robuste, sensitive und spezifische Tumordiagnostik zu entwickeln. Hierbei sollte die Technik der quantitativen PCR als Methodenplattform dienen. Diese Technik erlaubt eine schnelle und höchstgenaue Quantifizierung jeglicher Nukleinsäure-Sequenzen in einem heterogenen Probenmaterial.

1.1.1 Nicht-invasive Diagnostik des Harnblasenkarzinoms

Derzeit liegen zahlreiche nicht-invasive Verfahren zur Detektion von Harnblasenkarzinomen vor, welche zum Teil validiert und zugelassen wurden. Neben Protein-basierten Verfahren wurden bereits auch schon einige RNA- und DNA-Tumormarker identifiziert. Aufgrund der hohen falsch-positiv Raten vieler Tests können die Urin-basierten Tumormarkersysteme aber nur bedingt als Primärdiagnostik eingesetzt werden. Zudem sind die Schwankungen zwischen den Testergebnissen, welche in unterschiedlichen Laboratorien erhoben wurden, noch viel zu hoch, so dass die Sensitivitäten und Spezifitäten der Tests erheblich variieren. Die Sensitivität und Spezifität konnte durch eine Kombination verschiedener Tumormarker zu einem Multimarker-Test verbessert werden, was allerdings auch mit einer nicht tragbaren Erhöhung der Kosten verbunden war. Demzufolge konnte für Harnblasenkarzinome noch kein diagnostischer Tumormarkertest etabliert werden, welcher das invasive diagnostische Standardverfahren der Zystoskopie ersetzen könnte.

Neben der Identifizierung diagnostischer Tumormarker ist die Suche nach prognostischen Tumormarkern ebenfalls äußerst erstrebenswert. Anhand prognostischer Tumormarker könnte eine Aussage zum klinischen Verhalten eines Tumors gemacht werden, wodurch für besonders aggressive, invasive oder metastasierende Tumore frühzeitig eine adäquate Therapie eingeleitet werden könnte. Infolgedessen könnten die Chancen für den Erhalt der Harnblase und die 5-Jahres Überlebensraten, die bei einem Muskel-invasiven Tumorstadium nur bei 40–60% liegen [3], deutlich erhöht werden. Die Früherkennung eines Rezidivs ist besonders wichtig, da zwar für oberflächliche Harnblasenkarzinome die 5-Jahres Überlebensrate im Allgemeinen über 95% liegt, jedoch 60–80% der Patienten innerhalb von 4 Jahren nach der Entfernung des Tumors ein Rezidiv entwickeln. Etwa 20–30% der Rezidive können in ein Muskel-invasives Wachstum übergehen [4].

In der Tabelle 1-1 werden die Sensitivitäten und Spezifitäten von teilweise zugelassenen diagnostischen Verfahren zur nicht-invasiven Detektion von Harnblasenkarzinomen aufgelistet.

Tabelle 1-1 A Sensitivitäten und Spezifitäten Harnblasenkarzinom-spezifischer Marker. Die Tabelle wurde auf der Grundlage zusammenfassender Literatur erstellt [5,6,7,8].

Tumormarker (Status***)	Technik	Vorteile/ Nachteile	Sensitivität [%]	Spezifität [%]
Hämoglobin-basierte Tests				
Hämoglobin Dipstick****	Bestimmung der Erythrozytenzahl	einfache, kostengünstige Methode, wenig Training in der Durchführung notwendig Hämaturie entsteht bei einer Vielfalt benigner urologischer Erkrankungen (Prostata Hyperplasie, Harnwegsinfektionen, Nierensteine)	47-93	51-84
Morphologie-basierte Tests				
Zytologie Standardverfahren	Histologische Auswertung	Zeitaufwand sowie Kosten für die benötigte Ausrüstung sind gering unsensitiv, insbesondere für pTa-Tumoren; Ergebnisse sind abhängig vom Untersucher	28-77	81-100
ImmunoCyt™ (Diagnocure®)****	Fluoreszenz-Immunohistochemischer Ansatz zum kombinierten Nachweis des MUC ₂ -Apomucins	Mucine werden nur auf der Oberfläche von Tumorzellen exprimiert, nicht auf normalen Epithelzellen [9]; in Kombination mit Zytologie wird die Diagnostik von Karzinomen verbessert die Sensitivität ist für low grade Ta-Tumoren unbefriedigend [10]	39-86	73-84
Protein-basierte Tests				
Blasen Tumor Antigen (BTA) stat (Polymedco®)****	Quantitativer Immunoassay zum Nachweis des humanen Komplement-Faktor H assoziierten Proteins	höhere Spezifität als BTA-TRAK hohe Rate falsch-positiver Befunde	53-89	54-93
BTA-TRAK (Polymedco®)****	Modifizierter BTA-stat Test	hohe Rate falsch-positiver Befunde	17-78	51-95
NMP22 (Maritech Inc.®)****	ELISA zum Nachweis komplexierter und fragmentierter Formen des nukleären Matrix-Proteins	die intrazelluläre Konzentration des Proteins ist in Tumorzellen 25-fach höher als im normalen Urothelium [11], und es wird in löslicher Form während der Apoptose freigesetzt eine ausgeprägte Makrohämaturie kann zu falsch-positiven Ergebnissen führen	47-100	56-95
FDP AccuDx (Aura Tec), Intracel Corp.®****	Immunoassay zum Nachweis von Fibrindeggradationsprodukten (FDP)	Tumorzellen exprimieren den vaskulären endothelialen Wachstumsfaktor (VEGF) zur Erhöhung der Permeabilität von Blutgefäßen für Proteine; die VEGF-Konzentration steigt mit zunehmenden Tumorgrad und –Stadium [12], wodurch vermehrt FDP im Urin anfällt keine zusätzliche Verbesserung der Diagnose in Kombination mit Urinzytologie; falsch-positive Werte durch Makrohämaturie, Entzündungen und Steinleiden	48-81	75-91
HA-HAase	ELISA-ähnlicher Test zum Nachweis von Hyaluronidase und Hyaluronidase	Der HA-Gehalt ist 3– bis 5-fach erhöht in Gewebeextrakten von Harnblasenkarzinomen im Vergleich zu normalem Gewebe [13]; die Sensitivität des Tests ist hoch	83-91	70-84
Survivin	Immunoassay	Survivin gehört zur Protein-Familie der Apoptose Inhibitoren (IAP) und wird in Harnblasenkarzinomen überexprimiert geringe Sensitivitäten für gut differenzierte Ta-Tumoren	64-100	93-100

***Zugelassen von der FDA (US Food and Drug Administration)

Tabelle 1-1 B Sensitivitäten und Spezifitäten Harnblasenkarzinom-spezifischer Marker. Die Tabelle wurde auf der Grundlage zusammenfassender Literatur erstellt [5,6,7,8].

Tumormarker (Status****)	Technik	Vorteile/ Nachteile	Sensitivität [%]	Spezifität [%]
Telomerase (TRAP-Assay)	Telomerase-Aktivitäts-Test über die Amplifikation der TTAGGG-Sequenzwiederholungen an den Telomerenenden	Telomerase wird vorwiegend in Tumorzellen exprimiert und ist nur in proliferierenden Zellen aktiv hoher technischer Aufwand, hohe Kosten	71-100	71-90
CYFRA 21-1 (Cis Bio Int.)	ELISA zur Detektion von Cytokeratin 19 Fragmenten	Cytokeratine sind in der Tumorigenese hochregulierte Internmediärfilamente des Zytoskeletts in Kombination mit dem NMP22 Test als vielversprechender Marker beschrieben	31-96	74-96
Urine-bladder-cancer (UBC)-Test (IDL Biotech)	ELISA-basierter Test zur Quantifizierung von Cytokeratin 8 und 18 Fragmenten	für pTa-Tumoren wurde mit 80,7% eine hohe Sensitivität erreicht; eine höhere Sensitivität wurde in Kombination mit einer Ploidiäts-Bestimmung erreicht derzeit liegen nur wenig vergleichende Studien vor	81	80
Lewis X	Immunoaassay zum Nachweis des Lewis X Antigens	das Antigen wird nicht von normalem Urothel, aber von 90% der Harnblasenkarzinome exprimiert (unabhängig von Tumorstadium) [14]; die Sensitivität des Tests ist hoch, auch bei gut differenzierten Tumoren die Spezifität ist unbefriedigend	80-85	85-86
Messenger RNA (mRNA)-basierte Tests				
hTERT	Die Telomerase mRNA Abundanz korreliert mit der Proteinabundanz; der Nachweis erfolgt über RT-PCR.	der Nachweis der mRNA ist sensitiver als der TRAP-Assay aber vergleichbar spezifisch die Detektion der mRNA erfolgt aufgrund der geringen Abundanz nahe am Detektionslimit	94-96	80-95
CD44	Nachweis verschiedener Isoformen (CD44v8-19) mittels kompetitive RT-PCR	die Spezifität ist hoch die Daten basieren auf einer Studie	77	100
Survivin	RT-qPCR-basierter Nachweis	bei vielen Proben scheint das Detektionslimit des Tests erreicht zu sein	68-100	100
Cytokeratin 20 (CK 20)	RT-qPCR-basierter Nachweis	CK20 wird während der Tumorigenese hochreguliert die Spezifität ist unbefriedigend	78-91	36-100
DNA-basierte Tests				
Mikrosatelliten	PCR-basierte Detektion von Mikrosatellitenmarkern	die Sensitivität und Spezifität des Tests sind sehr gut die Kosten sind sehr hoch und die Technik ist komplex	72-97	88-100
DNA-Methylierungen	Detektion anomaler Methylierung eines Gen-Promoters	diese epigenetischen Alterationen kommen häufig in Tumoren vor; der Nachweis ist spezifisch für eine ausreichende Sensitivität müssen mehrere Gene untersucht werden	78-91	76-100
SNP Assay	SNP sind Polymorphismen, die an einzelnen Nukleotiden auftreten.	die Sensitivität und Spezifität des Tests sind sehr gut die Daten für Sensitivität und Spezifität beziehen sich nur auf eine Studie, in der 45 Patienten untersucht wurden; die anfallenden Kosten sind hoch	100	93
UroVysion (Abbott Labs)***	FISH zur Detektion der Zentromere von Chromosom 3, 7, 17 und 9p21	hohe Spezifität und signifikant höhere Sensitivität als Zytologie [15] die Sensitivität ist für low grade Tumoren niedrig; der Test ist sehr arbeitsaufwendig, es bedarf gut geschultes Personal	73-92	92-100

***Zugelassen von der FDA (US Food and Drug Administration)

1.2 Klassifizierung von Harnblasenkarzinomen

Harnblasenkarzinome entstehen zu etwa 95% aus dem Urothel und werden anatomisch anhand der Infiltrationstiefe in Tumorstadien klassifiziert (pTis, pTa, pT1, pT2a+b, pT3a+b, pT4a+b, Abbildung 1-1). Diese Klassifizierung des Tumors ist entscheidend für die Behandlungsstrategie. Die papillären pTa-Tumoren und die flachen Carcinomata *in situ* bilden die Gruppe der oberflächlichen Tumoren. Der T1-Tumor ist durch eine Infiltration in das subepitheliale Bindegewebe gekennzeichnet und wird, wie die T2- bis T4-Tumoren, zu den invasiven Tumoren gezählt. Neben der Tumorausbreitung (T) wird bei der **TNM**-Klassifizierung der Befall von Lymphknoten (N) sowie das Vorliegen von Fernmetastasen (M) begutachtet (Abb. 1-1). Bei etwa 75% der Patienten mit einem Harnblasenkarzinom wird ein papillärer, oberflächlicher Tumor (pTa- und T1-Tumorstadium) diagnostiziert. Diese Tumorform wächst aus dem Urothel heraus und dehnt sich maximal bis in die Lamina Propria aus. 10–40% der Tumoren entwickeln in Abhängigkeit vom Differenzierungsgrad im weiteren Verlauf ein Muskel-invasives Wachstum, wobei pTa-Tumoren wesentlich seltener progredieren als pT1-Tumoren. Für Tumoren, welche bei der Erstdiagnose ein invasives Tumorwachstum zeigen (Tumorstadium \geq pT2), ist die Prognose schlechter. Das Carcinoma *in situ* (pTis) wächst flach und nicht-papillär im Urothel und weist, ähnlich wie bei invasiven Tumoren, chromosomale Aberrationen auf [16]. Für Carcinomata *in situ* sind die Progressionsraten und Rezidivraten mit über 50% sehr hoch.

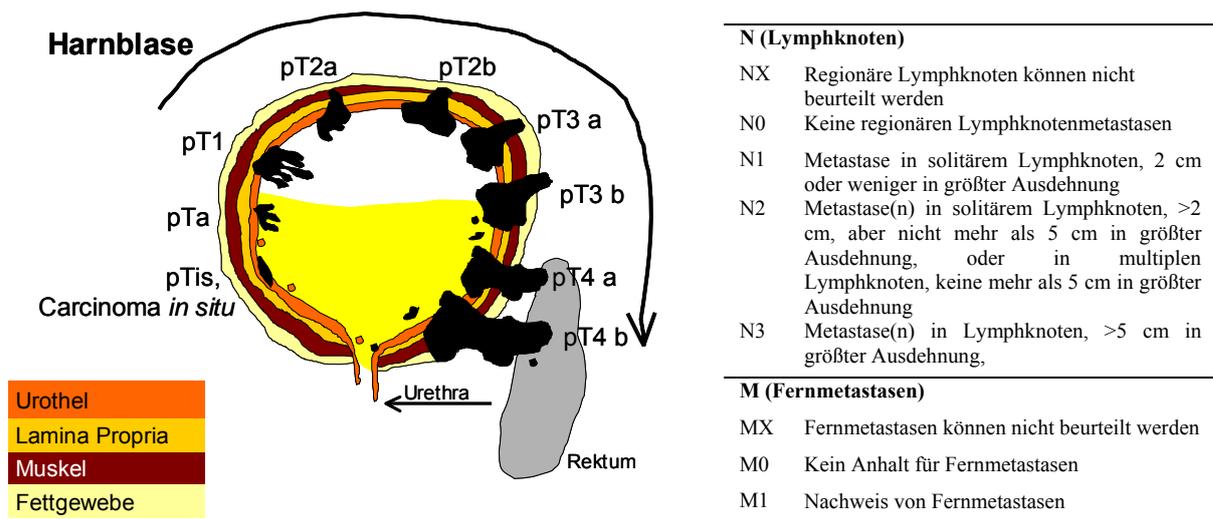


Abb. 1-1 Klassifikation des nicht-invasiven und invasiven Harnblasenkarzinoms nach dem Tumorstadium (Ta-T4, TNM-Klassifikation gemäß Union Internationale Contre le Cancer, UICC, 2002 [modifizierte Darstellung nach Engeler *et al.* [17]).

1. Einleitung

Eine weitere Klassifizierung des Harnblasenkarzinoms erfolgt über das histopathologische Grading. Durch histologische und zytologische Untersuchungen werden Harnblasenkarzinome nach der alten WHO-Klassifizierung aus dem Jahr 1973 in G1-, G2- oder G3-Tumoren eingeteilt. Bei der histologischen Einteilung nach Tumorgrad werden Kriterien wie die Zell- und Kernmorphologie, das Verhältnis zwischen Kern und Zytoplasma sowie die Hyperchromasie des Zellkerns begutachtet. Gut differenzierte G1-Tumoren sind durch mehr als 7 Zelllagen gekennzeichnet. Die epitheliale Schichtung ist in G1-Tumoren erhalten, aber in den unteren Schichten sind Mitosen erkennbar. Außerdem liegt eine geringe Kernhyperchromasie vor, das Verhältnis zwischen Kern und Plasma beträgt 1:4. Bei mäßig differenzierten G2-Tumoren liegen zum Teil mehr als 20 Zelllagen vor, wobei die Schichtung des Epithels nur geringfügig erhalten ist. In allen Zelllagen ist eine mitotische Aktivität nachweisbar, und zum Teil kommt es zu atypischen Mitosen. Das Kern-Plasma Verhältnis liegt in G2-Tumoren bei 1:2. In schlecht differenzierten Tumoren (G3) und undifferenzierten Tumoren (G4) liegt keine Schichtung des Epithels mehr vor. Zudem sind mehr als 5 Mitosen pro Gesichtsfeld nachweisbar und die Kern-Plasma-Relation hat sich mit 3:4 auf die Seite des Kerns verschoben. Die Kernhyperchromasie sowie –Polymorphie ist stark ausgeprägt und es kann die Ausbildung von Riesenzellen beobachtet werden [18]. Mit zunehmendem Tumorgrad nimmt der Differenzierungsgrad der Tumorzellen ab. Mehr als die Hälfte der Harnblasenkarzinome mit einer geringen Infiltrationstiefe sind gut differenziert, progressive Muskel-invasive und metastasierende Tumoren sind mittelmäßig bis schlecht differenziert.

Die Einteilung der Harnblasenkarzinome ist zwar klar definiert, allerdings ist offensichtlich, dass vor allem die Unterscheidung zwischen G2- und G3-Tumoren stark von der subjektiven Beurteilung des Begutachters abhängig ist. In der vorliegenden Arbeit wurden die untersuchten Harnblasenkarzinome noch nach dieser Klassifizierung eingeteilt. Allerdings wurden 1998 von der WHO und der ISUP neue Richtlinien für das histopathologische Grading aufgestellt, wodurch Untergruppen von progressiveren und maligneren Karzinomen innerhalb der verschiedenen Stadien durch genotypische Analysen besser charakterisiert werden sollen [19]. Nach diesen Richtlinien werden die Harnblasenkarzinome in genetisch stabile „*low grade*“ Tumoren sowie genetisch instabile „*high grade*“ Tumoren eingeteilt. Hochdifferenzierte, oberflächliche Tumoren werden nach diesen Richtlinien nicht mehr als maligne eingestuft und werden als „PUNLMP“ (papilläre urotheliale Neoplasie mit niedrig malignem Potential) bezeichnet. In diese Gruppe wird ein Teil der ehemaligen G1-Tumoren eingeordnet. Die nicht-invasiven „*low grade*“ Tumoren sind gekennzeichnet durch eine geringe Schichtungsstörung mit einem ungeordneten Erscheinungsbild und weisen ein niedriges malignes Potential auf. Zu dieser Gruppe werden die übrigen ehemaligen G1-Tumoren sowie ein Teil der ehemaligen G2-Tumoren gezählt. Ehemalige G2- sowie ehemalige G3-Tumoren, welche eine Zell- und Kernpolymorphie und eine erhebliche Schichtungsstörung zeigen, werden als hoch maligne eingestuft und bilden die neue Gruppe der „*high grade*“ Tumoren.

1.3 Tumorigenese des Harnblasenkarzinoms

Wie bei anderen Karzinomen, gibt es auch für Harnblasenkarzinome eine Vielzahl verschiedener genetischer Aberrationen, welche zu diversen Phänotypen führen. Die Komplexität und Vielfalt der molekularen Wege, welche an der Tumorigenese beteiligt sind, limitieren die diagnostische Aussagekraft vieler Tumormarker. Die Transformation von gesunden Zellen in Tumorzellen führt zu einem unkontrollierten Zellwachstum. Aus den vermehrt proliferierenden Zellen kann ein solider Tumor entstehen, welcher in das umgebende Gewebe wächst und aus dem wiederum einige Zellen ausbrechen können, welche zur Metastasierung führen können (Tumorstadium pT2-T4, Abbildung 1-1). Harnblasenkarzinome haben wahrscheinlich einen monoklonalen Ursprung, aber die Ausbreitung ist multifokal. An der Entstehung und dem Fortschreiten von oberflächlichen Harnblasenkarzinomen sind mindestens zwei Wege beteiligt (Abbildung 1-2).

Buyru *et al.* konnten im Urinsediment von 40% der untersuchten Harnblasenkarzinompatienten Mutationen im *HRAS* Gen nachweisen [20]. *HRAS* ist das erste Onkogen, welches in Harnblasenkarzinomen identifiziert werden konnte [21]. Die Mutationen führen zur Aktivierung des *HRAS* Proteins, alternatives Spleißen kann zur Überexpression des Gens führen, wodurch es zur Aktivierung des Ras-Signalwegs kommt. Bei der Entstehung von papillären nicht-invasiven Ta-Tumoren ist der Rezeptor-Tyrosin-Kinase-(RTK)-Ras-Signalweg konstitutiv aktiviert. Neben Mutationen im *HRAS*-Gen wird der Ras-Signalweg vor allem durch eine Mutation in dem Fibroblasten-Wachstumsfaktor-Rezeptor 3 (*FGFR3*), einer RTK, in über der Hälfte der *low grade* Ta-Tumoren aktiviert [22,23]. Dabei ist die häufigste Mutation die Konversion eines in der extrazellulären Schleife des transmembranen Moleküls lokalisierten nicht-Cysteins in ein Cystein. Infolgedessen wird, unabhängig von einem Liganden, die Dimerisierung und Autophosphorylierung der intrazellulären Domäne bewirkt [zusammengefasst in 24]. Zudem liegt oberflächlichen Harnblasenkarzinomen häufig eine partielle oder komplette Deletion auf dem Chromosom 9 vor [25]. Die Mehrheit der Deletionen auf dem Chromosom 9 sind im 9p21 Lokus (*INK4a/ARF* und *INK4b*) lokalisiert, wobei drei der von diesem Bereich kodierten Proteine betroffen sind ($p16^{\text{INK4A}}$, $p14^{\text{ARF}}$ und $p15^{\text{INK4B}}$). Diese Proteine sind Tumor-Suppressor-Gene, da diese den Zellzyklus negativ regulieren [26,27].

Homozygote Deletionen auf Chromosom 9 (*INK4A/ARF* Lokus [28]) sind auch an der Entstehung von *high grade* Ta- und T1-Harnblasenkarzinomen oder Carcinomata *in situ* beteiligt, allerdings ist die Inaktivierung der Funktion von p53 und des Retinoblastoma-Proteins (pRB) der entscheidende Schritt bei der Progression dieser Tumoren. Der Tumor-Suppressor p53 ist eines der Schlüsselproteine in der Tumorigenese. Unter Stressbedingungen, wie bei der Beschädigung der DNA, wird durch die p53-vermittelte Aktivierung von p21 der Zellzyklus an der G₁/S-Phase arretiert und Apoptose eingeleitet. Es wird angenommen, dass erst ein Allel des *p53*-Gens mutiert, gefolgt von einer weiteren Mutation auf dem verbleibenden Allel, was zur kompletten Inaktivierung des Proteins führt [29]. Die Inaktivierung der p53-Funktion kann beispielsweise durch eine homozygote

1. Einleitung

Deletion des p14-Lokus auf dem Chromosom erfolgen [5]. Neben einer p53-Mutation kann häufig eine Mutation im *p21*-Gen bei Harnblasenkarzinomen identifiziert werden [30]. Eine Mutation im *RB*-Suppressorgen ist ebenfalls entscheidend für die Entstehung von *high grade* T1-Harnblasenkarzinomen. Die Hauptfunktion von pRB liegt, ähnlich wie bei p53, in der Inhibition des Zellzyklus und der Induktion von Zelltod. Normalerweise inhibiert pRB die E2F-Transkriptionsfaktoren. In Harnblasenkarzinomen kann es zu einem Verlust der pRB-Expression oder zur Überexpression einer hyperphosphorylierten Form des Proteins kommen [31,32]. Dadurch kommt es zur verstärkten Proliferation.

Eine Dysfunktion von p53 oder dem pRB liegt in mehr als der Hälfte von *high grade* T1-Harnblasenkarzinomen vor. Der p53-Status eignet sich für die Vorhersage der Tumorrezidivbildung, der Progression oder der Überlebensraten von Patienten mit invasiven, progressiven Tumoren [33]. Bei Patienten mit einer p53-Mutation ist die Wahrscheinlichkeit für eine Progression des Tumors höher und die Prognose schlechter. Eine p53-Mutation kann außerdem bei über 65% der Carcinomata *in situ* nachgewiesen werden, wodurch die Prognose für diese Tumorentität schlecht ausfällt.

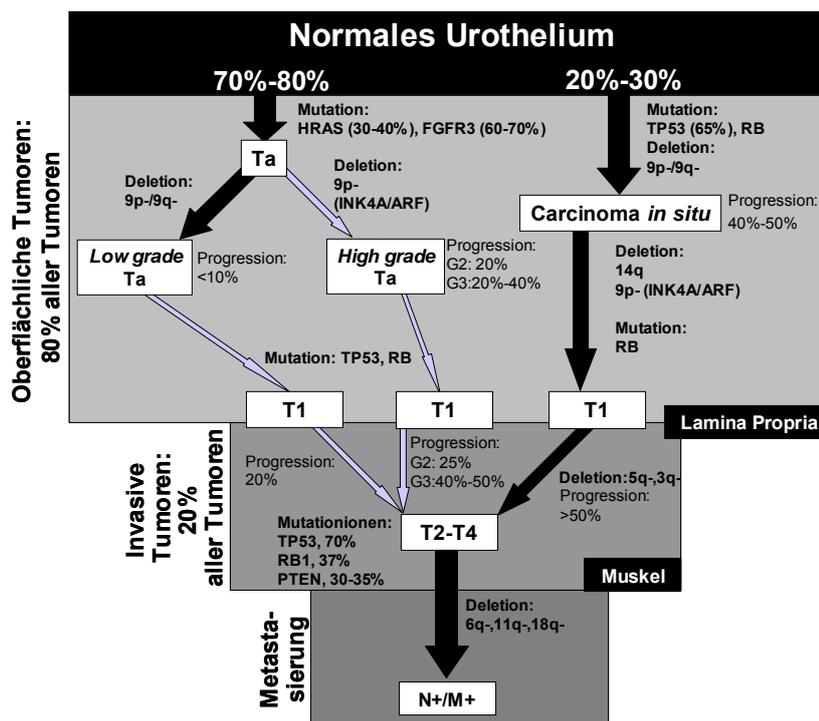


Abb. 1-2

Genetische Aberrationen, Pathogenese und Progressionsraten beim Harnblasenkarzinom. Schwarze Pfeile zeigen einen häufig durchlaufenen Weg an, graue Pfeile indizieren einen weniger häufig durchlaufenen Weg. Die Progressionsrate zu Muskel-invasivem Wachstum oder Metastasierung ist in Prozent angegeben. Die Häufigkeit, mit der eine Mutation bei der entsprechenden Tumorform auftritt, ist ebenfalls in Prozent angegeben. Die Abbildung fasst die in der Literatur beschriebenen Erkenntnisse über die Tumorigenese von Harnblasenkarzinomen zusammen [5,34,35].

1.4 Progression und Invasion des Harnblasenkarzinoms

Die Progression des Tumors zu einem Muskel-invasiven oder metastasierenden Tumor stellt in klinisch-therapeutischer Sicht das Hauptproblem der Erkrankung dar. Bei invasiven Tumoren kommt es zu einer erhöhten Aktivität des Urokinase Plasminogen Aktivators (uPA). Der Urokinase Plasminogen Aktivator ist eine Serinprotease, welche in viele biologische Prozesse wie Zellproliferation, Chemotaxis, Proteolyse, Zelladhäsion, Angiogenese und Zell-Migration involviert ist [36,37,38]. Durch das hoch-affine Binden von uPA an den entsprechenden Rezeptor uPAR auf der Zelloberfläche erfolgt die Konversion von Plasminogen zu Plasmin. Infolgedessen wird eine Kaskade proteolytischer Enzyme, sogenannter Matrixmetalloproteinasen (MMPs), aktiviert [39]. Zur Gruppe der MMPs gehören 13 Enzyme, die sich weiter in 4 Gruppen mit unterschiedlicher Substratspezifität aufspalten (intestinale Kollagenasen, Typ IV Kollagenasen, Stromelysine sowie membrangebundene Matrixmetalloproteinasen, MMP). Die mRNA Abundanzen von MMP-2 und MMP-9 sind in invasiven Harnblasenkarzinomen höher als bei oberflächlichen Tumoren [40,41]. Zudem wurden vorwiegend im Urin von Patienten mit einem invasiven Harnblasenkarzinom erhöhte Proteinmengen von MMP-2 und MMP-9 gefunden [42]. Aktivierte MMPs führen zur Degradation der extrazellulären Matrix (Abb. 1-3), was eine Invasion der Tumorzellen ermöglicht. Die Aktivität von MMPs kann durch die sogenannten *tissue inhibitors of metalloproteinases* (TIMPs) inhibiert werden. Durch die Invasion in und durch die Basalmembran kann der Tumor in histologisch fremde Gewebe eindringen. Auch kann sich der Tumor durch einen Zutritt zum Blut- und Lymphgefäßsystem in entfernten Geweben absiedeln. Neben der Aktivierung von MMPs kommt es durch das Binden von uPA an uPAR zur Initialisierung von Signaltransduktionskaskaden. Die Aktivierung des Phosphatidylinositol 3-Kinase (PI3K)/Akt-Signalwegs bewirkt die Hochregulation der anti-apoptischen Gene Bcl-2 und BCL2L1 [43].

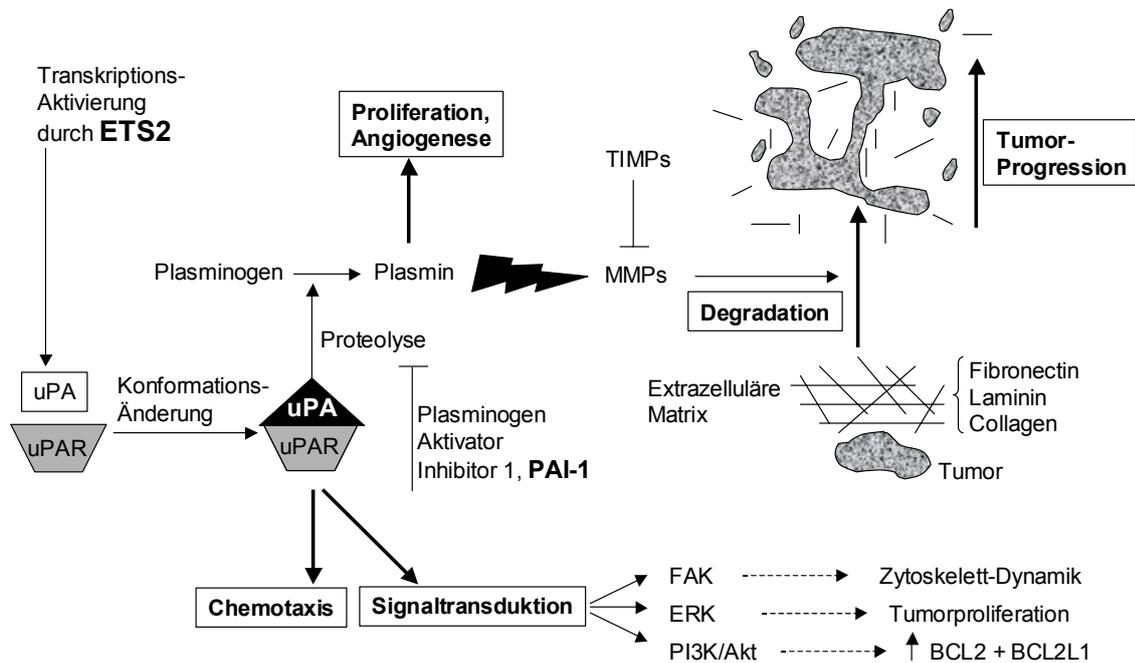


Abb. 1-3 Degradation der Extrazellulären Matrix durch Metalloproteinasen. Modifizierte Darstellung nach Crippa [44].

1.5 Urin-basierte molekulare Diagnostik des Harnblasenkarzinoms

Im Rahmen der nicht-invasiven molekularen Diagnostik von Harnblasenkarzinomen ist die Analyse von Urin das gebräuchlichste Verfahren. Der Grundgedanke einer Urin-basierten nicht-invasiven Diagnostik beim Harnblasenkarzinom ist bereits auf das Jahr 1945 zurückzuführen. Zu diesem Zeitpunkt wurde gezeigt, dass im Urin Tumorzellen vorliegen, welche als Ausgangsmaterial für eine Diagnostik geeignet sind [45].

Erstmals wurde 1991 von Sidransky *et al.* über die molekulare Diagnostik von Harnblasenkarzinomen anhand des Nachweises von p53-Genmutationen bei 61% der untersuchten soliden Tumoren berichtet [46]. Darüber hinaus konnten im Urinsediment die gleichen Mutationen nachgewiesen werden, welche im Primär-Tumor vorlagen. Wenige Jahre darauf konnte durch die Analyse von Mikrosatellitenmarkern im Urinsediment die Sensitivität der molekularen Diagnostik von Harnblasenkarzinomen deutlich auf 95% erhöht werden [47]. Mikrosatelliten sind kurze hoch polymorphe DNA-Sequenz-Wiederholungen, die ubiquitär im humanen Genom vorkommen. Durch die maligne Transformation kann es zu Alterationen in der Mikrosatelliten-Sequenz kommen. Eine häufige Harnblasenkarzinom-assoziierte chromosomale Veränderung ist beispielsweise der Verlust der Heterozygotie (LOH) auf Chromosom 9 [48]. Der Nachteil dieser DNA-

basierten Methode besteht im wesentlichen in der Notwendigkeit einer Multimarker-Mikrosatellitenanalyse [49], da einzelne DNA-Alterationen nicht aussagekräftig genug sind. Dadurch ist die Analyse mit einem hohen Arbeits- und Kostenaufwand verbunden.

Im Gegensatz zu DNA wird bei der Analyse der mRNA-Zusammensetzung direkt die veränderte Genexpression einer Tumorzelle wiedergespiegelt. Anhand von Genexpressionsanalysen können so die molekularen Ereignisse, welche mit der malignen Transformation sowie der Metastasierung einhergehen, untersucht werden. Auf der Grundlage von Microarrays wurde die Expression verschiedenster Gene in humanen Tumoren untersucht, um Einblicke in die Tumorentstehung und Progression zu erhalten [50]. Infolgedessen konnte bereits eine Vielzahl differentiell exprimierter mRNAs identifiziert werden, welche potentielle Tumormarker darstellen. Von Dyrskjøt *et al.* (2003) wurden Tumorstadium-spezifische Gen-Klassen im Harnblasenkarzinom über Mikroarray-basierte Genexpressionsstudien identifiziert [51]. Durch die spezifische Expressions-Signatur konnte eine Klassifikation des Harnblasenkarzinoms in drei verschiedene histopathologische Gruppen ermöglicht werden (1. nicht-invasive Ta-Tumoren, 2. invasive T1-Tumoren, 3. hoch-invasive T2-, T4-Tumoren). Die Validierung dieser Daten mittels Reverser Transkriptase quantitativer PCR (RT-qPCR) schlug allerdings in einer von Schultz *et al.* durchgeführten Studie fehl, obwohl in beiden Studien das gleiche Ausgangsmaterial, solide Tumoren, für die Präparation der Gesamt-RNA verwendet wurde [52]. Zu den Faktoren, welche Genexpressionsanalysen beeinflussen können, gehören unter anderem die Größe der untersuchten Patientenpopulation, die RNA-Präparations-Methode sowie die Menge und insbesondere die Integrität der untersuchten RNA. Daher muss eine große Bedeutung auf die Entwicklung eines standardisierten Protokolls gelegt werden, welches die Generierung der Proben, die Präparation der RNA, die Quantifizierung (Verwendung identischer PCR-Amplikons) sowie die Normalisierung der Genexpression beinhalten sollte. Ein derartiges Protokoll kann den Vergleich von verschiedenen Genexpressionsstudien ermöglichen, auch wenn die Analysen in unterschiedlichen Laboratorien durchgeführt wurden.

1.5.1 Evaluation neuer RNA-Tumormarker

Bei der Evaluation neuer potentieller Tumormarker müssen verschiedene Parameter berücksichtigt werden. Ein wichtiger Punkt hierbei ist die nicht-invasive und leichte technische Zugänglichkeit zum Probenmaterial. Außerdem sollte die Detektion des Tumormarkers robust und vor allem reproduzierbar sein sowie eine geringe Inter- und Intra-Assay Variation aufweisen. Zudem sollte die Interpretation der Testergebnisse einfach und eindeutig sein.

In der Regel wird in der ersten Phase zur Entwicklung eines Tumormarkers das Analyse-System unter Verwendung einer kleinen sogenannten „Trainings“-Population in Hinblick auf Reproduzierbarkeit der Messdaten beschrieben. In der 2. Phase der

Entwicklung wird die klinische Relevanz des Tumormarkers innerhalb einer zweiten, unabhängigen „Test“-Population, die in einer einzigen klinischen Einrichtung rekrutiert wurde, bestimmt. Die klinische Relevanz des Markers wird analog zu anderen diagnostischen Verfahren anhand der erreichten Sensitivität, Spezifität und Prüfgenaugkeit innerhalb der untersuchten Patientengruppe bewertet. In der 3. Phase wird der neu-identifizierte Tumormarker in einer Multicenterstudie untersucht. Anschließend durchläuft der Marker die Validierungsphase.

1.5.2 MicroRNA-basierte Diagnostik des Harnblasenkarzinoms

Ein vielversprechender Ansatz für die Entwicklung eines nicht-invasiven diagnostischen Tests ist die Identifikation Harnblasenkarzinom-spezifischer microRNAs (miRNAs) in Gesamturin. Es wird angenommen, dass Abberationen in der miRNA-Zusammensetzung eine Rolle bei der Tumorigenese spielen [z.B. 53,54,55]. MicroRNAs wurden zuerst in *Caenorhabditis elegans* nachgewiesen. Kurze Zeit später zeigte sich, dass diese Klasse von kleinen nicht-codierenden RNAs auch in Eukaryonten die Expression von Proteinen regulieren. Das primäre Transkript der miRNAs (*pri*-miRNA) mit einer Länge von mehreren kb wird durch das RNase III Enzym Drosha in eine etwa 80 Nukleotide-lange *pre*-miRNA mit einer *Hairpin*-Struktur prozessiert. Die *pre*-miRNAs werden darauf durch Dicer, ein Enzym mit RNase III Aktivität, zu reifen miRNAs mit einer Länge von 18–25 Nukleotiden prozessiert. Ein Strang dieser Duplex-RNA assoziiert mit dem *RNA-induced silencing complex* (RISC) und führt entweder zur Spaltung der Target-mRNA oder zur Hemmung der Translation. Dadurch, dass miRNAs auch an nicht-vollständig komplementäre mRNAs binden können, kann eine miRNA eine Vielzahl von mRNAs regulieren. Schätzungsweise existieren mehr als 1000 unterschiedliche miRNAs [56].

Durch funktionelle Untersuchungen humaner miRNAs konnte gezeigt werden, dass miRNAs im Metabolismus [57], der Zellproliferation sowie der Apoptose [58] involviert sind. Mit der Entdeckung der Herunterregulation von miR-15a und miR-16-1 bei der chronischen lymphatischen Leukämie (CLL) wurden miRNAs mit Krebs in Verbindung gebracht. Eine Herunterregulation von miRNAs in verschiedenen Tumoren wurde ebenfalls von Lu *et al.* beschrieben [59]. Mit dieser Studie wurde gezeigt, dass Tumoren anhand der miRNA-Signatur klassifiziert werden können. Eine weitere umfangreiche Studie zur Analyse von miRNA-Expressions-Signaturen in verschiedenen humanen soliden Tumoren wurde von Volinia *et al.* durchgeführt [60]. Insgesamt wurden hier 363 Gewebeproben von Lungen-, Brust-, Magen-, Prostata-, Darm- und Pankreas-Tumoren im Vergleich zu 177 Normalgeweben analysiert. Im Gegensatz zu Lu *et al.* waren die Expressions-Signaturen dieser Studie aus einer großen Anzahl an überexprimierten miRNAs zusammengesetzt. Vor allem die Überexpression von miR-17-5p, miR-20a, miR-21, miR-92, miR-106a und miR-155 war charakteristisch für mindestens drei der untersuchten sechs Tumorgruppen, wodurch die Rolle dieser miRNAs bei der Pathogenese von soliden Tumoren sehr

1. Einleitung

deutlich wurde. Überraschend war bei der Studie, dass die ausgewählten, im Tumorgewebe überexprimierten miRNAs miR-155, miR-17-5p, miR-92-1 und miR-21 nicht in der Studie von Lu *et al.* als überexprimiert identifiziert wurden und dort für miR-17-5p, miR-20 und miR-92 allgemein eine Herunterregulation im Tumor beschrieben wurde. Die Ergebnisse aus den verschiedenen Studien zur Analyse von miRNA-Expressions-Signaturen in Tumormaterial zeigen, ähnlich wie mRNA-Expressions-Analysen, dass es einer vorsichtigen Interpretation der Daten bedarf. Auch für miRNAs muss bei der Entwicklung eines diagnostischen Tests der Fokus in der Entwicklung eines standardisierten Protokolls zur Präparation und Quantifikation der miRNAs liegen.

1.5.3 Messenger (m)RNA-basierte Diagnostik des Harnblasenkarzinoms

Die Entwicklung einer nicht-invasiven Tumordiagnostik auf der Grundlage von Körperflüssigkeiten wie Urin ist sehr erstrebenswert [61]. Die Verwendung von Urin ohne Vorbehandlung, wie beispielsweise Zentrifugation, ist für einen diagnostischen Test erstrebenswert, da somit Unterschiede in der Generierung von Probenmaterial vermieden werden. In der Abbildung 1-4 wird der Ablauf für die RT-qPCR-basierte Analyse von mRNA-Tumormarkern im Urin dargestellt. Außerdem werden einzelne Punkte aufgeführt, welche die Analyse beeinflussen können.

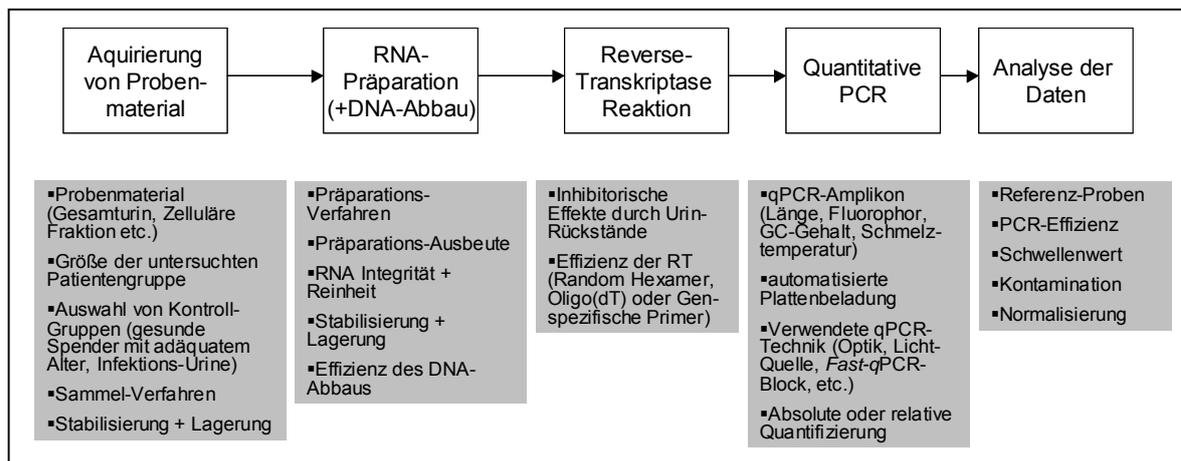


Abb. 1-4 Ablauf zur Präparation- und Quantifizierung von mRNA im Urin. Die Quellen, welche die Inter- und Intra-Assay Varianz beeinflussen, sind in den grauen Kästen aufgeführt. Modifizierte Abbildung nach Cronin *et al.* [62].

Ein großer Vorteil der RT-qPCR-basierten Diagnostik auf der Grundlage von Gesamturin ist die nicht-invasive Gewinnung von Probenmaterial in großen Quantitäten. Damit ist die Verwendung von Urin sehr vorteilhaft gegenüber anderen Körperflüssigkeiten wie Plasma

1. Einleitung

und Serum, welche mit einem höheren technischen Aufwand gesammelt werden müssen und zudem einen höheren, für weitere Analysen störenden, Proteingehalt aufweisen. Allerdings müssen bei der Verwendung von Urin einige kritische Punkte, welche im Folgenden aufgeführt werden, beachtet werden. Der Zellgehalt im Urin kann in Abhängigkeit vom Spender, von körperlichen Aktivitäten oder auch von der Tageszeit stark variieren. Hinzu kommt, dass die Zusammensetzung der Zellen sehr heterogen sein kann, weil neben Tumorzellen auch Zellen aus entzündetem oder normal abgeschilfertem Urothel sowie Leukozyten vorliegen können. Darüber hinaus können die pH-Werte unterschiedlicher Urine eine große Spannweite (pH 5,5–pH 8,0) aufweisen und einen hohen Degradationseffekt auf die Zellen ausüben. Im Urin befindliche apoptotische Zellen können einen hohen Anteil an fragmentierter RNA aufweisen, welche nach der Verpackung in apoptotische Körperchen vor RNasen geschützt ist und somit als zellfreie RNA im Urin vorliegen kann. Der hohe Gehalt an RNasen im Urin führt zu einem mehr oder weniger starken Abbau ungeschützter mRNA in Gegenwart von divalenten Ionen. Eine Degradation der mRNA hat zur Folge, dass in der RT-qPCR geringe Kopienzahlen quantifiziert werden [63], wodurch das Detektionslimit der Methode erreicht werden kann. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass der Ursprung, die Konzentration und die Integrität von Nukleinsäuren im Urin verschiedener Spender und sogar zu verschiedenen Tageszeiten sehr variabel sein können. Ein robuster diagnostischer Test auf der Grundlage von Urin-basierten RNA-Extrakten muß aber nicht aufgrund der Tatsache scheitern, dass eine gute Qualität der präparierten Gesamt-RNA aus den oben aufgeführten Gründen nicht immer gegeben ist. Bei der Verwendung von RT-qPCR-Amplikons unter 100 bp ist der Einfluss der mRNA-Integrität nur gering [64,65]. Einen weiteren Einfluss auf die Quantifizierung der mRNA können mit-aufgereinigte Urinbestandteile im RNA-Extrakt haben (z.B. Salze oder Proteine), welche die enzymatischen Reaktionen im Rahmen der molekularen Diagnostik inhibieren oder verfälschen. Diese technischen Herausforderungen können beispielsweise durch die Zugabe von RNase-Inhibitoren zum frisch abgegebenen Urin sowie durch die Entwicklung von standardisierten RNA-Präparations- und Normalisierungstechniken bewältigt werden [66]; Hanke *et al.*, *in press* [67].

Anhand der PCR wird die spezifische Amplifikation von verschiedensten Nukleinsäuresequenzen aus einer komplexen Probe ermöglicht. Im Jahre 1971 haben Kleppe *et al.* erstmals über die *in vitro* Amplifikation von DNA berichtet, welche der natürlichen Replikation ähnelt [68]. Die für die Reaktion verwendete Klenow-Polymerase war aber nicht hitzebeständig und musste nach jedem Amplifikationsschritt ersetzt werden. Der Durchbruch dieser Methode war im Jahr 1988, als Saiki *et al.* die Entwicklung von Kary B. Mullis vorstellten, bei der eine DNA-Polymerase aus thermophilen Bakterien für die Amplifikation eingesetzt wurde [69]. Neben der DNA-Polymerase sind kurze synthetische Oligonukleotide (Primer) essentiell für die Reaktion, da diese den zu amplifizierenden Sequenzbereich am 5'- und 3'-Ende der Matrizen-(Template)-DNA definieren. In der PCR ist der initiale Schritt die Denaturierung der doppelsträngigen DNA bei 90–95°C.

Anschließend wird die Temperatur für das Hybridisieren der Oligonukleotid-Primer

1. Einleitung

(*Annealing*) an komplementäre Sequenzen der Template-DNA erniedrigt. Die *Annealing*-Temperatur der Primer liegt in der Regel wenige Grad Celsius unter der errechneten Schmelztemperatur der Primer, wobei eine zu gering gewählte Temperatur zu unspezifischen PCR-Produkten führen kann, und bei einer zu hohen *Annealing*-Temperatur die Produktbildung ausbleiben kann. Über die thermostabile DNA-Polymerase, wie beispielsweise diejenige des Bakteriums *Thermus aquaticus* (*Taq* DNA-Polymerase), erfolgt im letzten Schritt der PCR normalerweise bei 72°C die Amplifikation über den Einbau freier Desoxynukleosid-Triphosphate an das 3'-Ende der Primer. Durch Wiederholungen dieses Zyklus entstehen identische Kopien des ausgewählten Template-DNA-Abschnitts. Die konventionelle PCR zeigt aber lediglich die Menge des finalen PCR-Produktes an, die in der Plateau-Phase der PCR unabhängig von der initialen Template-Menge identisch ist. Diese Limitation wurde 1992 beseitigt, indem von Higuchi *et al.* die quantitative PCR (qPCR)-Technik entwickelt wurde [70].

In der qPCR wird die Zunahme der Produktmenge in jedem Zyklus durch die Verwendung eines Fluoreszenzreporters gemessen. Das Fluoreszenzsignal ist proportional zum gebildeten Produkt und ermöglicht die Bestimmung der Zyklenzahl, bei der eine bestimmte Produktmenge vorliegt. Diese Zyklenzahl, der „Ct-Wert“, kann durch die Definition eines Fluoreszenzschwellenwertes, welcher in der linearen Phase der PCR positioniert wird, bestimmt werden. Durch die Mitführung einer Standardreihe unterschiedlicher Kopienzahlen der Zielsequenz kann die Effizienz der qPCR berechnet werden, was die absolute Quantifizierung der initialen Menge an Template ermöglicht. Die Effizienz der Reaktion lässt sich aus der Steigung der Standardreihe ableiten und ist optimal, wenn das Produkt nach jedem Zyklus nahezu verdoppelt wurde. Ein vielverwendeter Fluoreszenzreporter für die qPCR ist SYBR Green I, welcher frei in Lösung vorliegend nur sehr schwach fluoresziert. Bei der weitgehend unspezifischen Bindung an die kleine Furche doppelsträngiger DNA-Moleküle fluoresziert der Farbstoff aber nach der Anregung bei 494 nm sehr stark (Emissionsmaximum = 521 nm). Durch die ausschließliche Bindung von SYBR Green I an doppelsträngige DNA kann die Akkumulation des PCR-Produkts nach jedem Zyklus verfolgt werden [71]. Bei der Verwendung von SYBR Green I können nach dem Lauf der PCR Schmelzkurven aufgenommen werden, indem die Temperatur in den Reaktionsansätzen schrittweise von 60°C auf 95°C erhöht wird. Die Schmelztemperatur des gebildeten Produktes ist durch einen starken Abfall des Fluoreszenzsignals gekennzeichnet. Anhand der Schmelzkurvenanalyse kann untersucht werden, ob die Amplifikation spezifisch verlaufen ist und nur ein einzelnes Produkt gebildet wurde. Unspezifische Produkte und Primer-Dimere tragen bei der SYBR Green I-basierten qPCR ebenfalls zum Fluoreszenzsignal bei und können die Ergebnisse dadurch verfälschen. Eine überaus spezifische Amplifikation wird über die Verwendung von Sequenz-spezifischen Fluoreszenzreportern erreicht. Dazu gehören die Hydrolysesonden (TaqMan®-Sonden), welche zwischen dem *forward* und dem *reverse* Primer positioniert ist. Die TaqMan®-Sonde ist ein Oligonukleotid, welches am 5'-Terminus mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert ist und am 3'-Terminus einen

1. Einleitung

Quencher trägt. Bei einer intakten Sonde wird die Reporterfluoreszenzemission durch den Quencher unterdrückt. Innerhalb der PCR wird die Sonde durch die 5′-, 3′-Exonukleaseaktivität der *Taq*-DNA-Polymerase hydrolysiert, so dass der Fluoreszenzfarbstoff vom Quencher getrennt und die Reporterfluoreszenz freigesetzt wird [72]. Durch die Verwendung unterschiedlicher Fluoreszenzfarbstoffe können Multiplex-Reaktionen durchgeführt werden, wodurch die kostengünstige Quantifizierung von mehreren mRNAs in einer Probe ermöglicht wird [73]. Weitere Beispiele für Fluoreszenzmarkierte qPCR-Sonden sind die Molecular-Beacons [74] sowie Hybridisierungs sonden [75] (Abb. 1-5). Minor-Groove-Binder (MGB) sind Hydrolysesonden mit einem zusätzlichen Molekül, welches die Bindungsaffinität der Sonde für die kleine Furche der DNA erhöht, wodurch die Verwendung kürzerer Sonden ermöglicht wird [76]. Neben der Sonde kann aber auch ein spezieller *stem-loop* Primer (Scorpion-Primer [77], LUX-Primer [78]) mit einem Fluoreszenzfarbstoff und einem Quencher markiert sein. Bei dem *Annealing* des Primers wird die *stem-loop*-Struktur des Primers aufgehoben, wodurch das Fluorophor am 5′-Ende räumlich vom Quencher am 3′-Ende getrennt wird und es nach der Anregung zur Emission von Fluoreszenz kommt. Anhand dieser Technologie wird im Gegensatz zu Fluoreszenz-markierten Sonden die Aufnahme von Schmelzkurven ermöglicht.

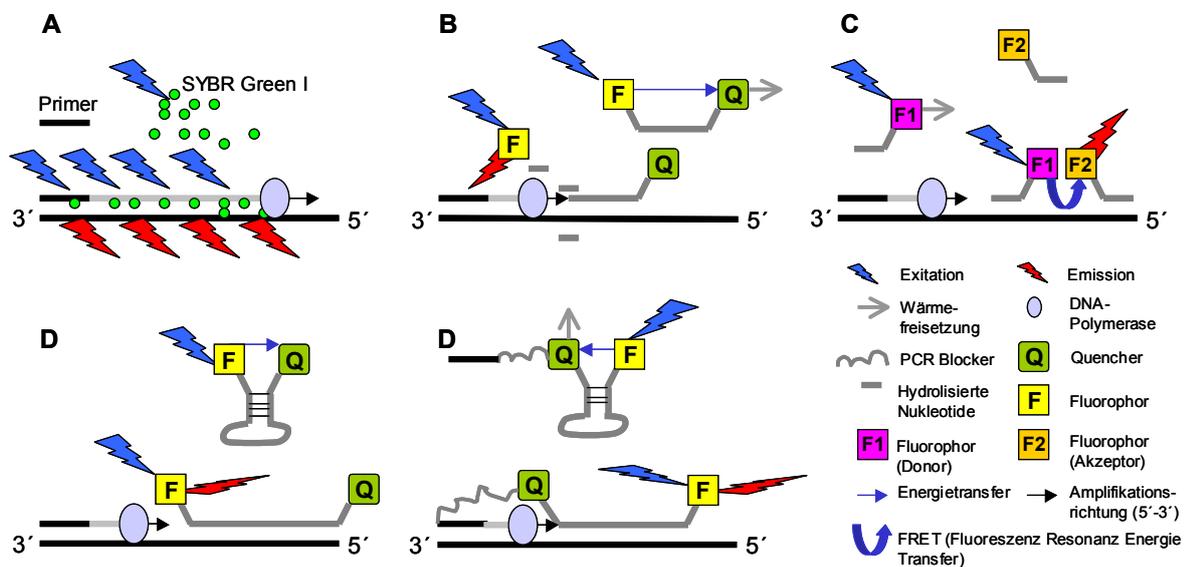


Abb. 1-5 Mechanismen verschiedener in der qPCR verwendeter Fluoreszenzreporter. (A) Sequenzunspezifische Fluoreszenzfarbstoff SYBR Green I, (B) TaqMan®-Sonde, (C) Hybridisierungssonden, (D) Molecular-Beacon, (E) Scorpion-Primer.

Bei der RT-qPCR-basierten Detektion von mRNA-Tumormarkern wird die aus Gesamturin präparierte RNA in einem vorgeschalteten Schritt über eine Reverse Transkriptase in komplementäre DNA umgeschrieben (cDNA) und anschließend über qPCR analysiert. Die Verwendung von Robotern ermöglicht eine besonders leichte und schnelle Durchführung

der RT-qPCR sowie einen hohen Probendurchsatz. Die Verwendung von Pipettierrobotern reduziert darüber hinaus die Variabilität zwischen Replikaten sowie den Eintrag möglicher Kontaminationen in die Probe [79]. Vor allem eine Kontamination der RNA-Extrakte mit genomischer DNA kann zur Verfälschung der Messergebnisse führen. Durch die Verwendung von Primern oder TaqMan®-Sonden, welche auf Exon/Exon-Grenzen liegen oder große Introns überspannen, kann die Amplifikation von genomischer DNA allerdings ausgeschlossen werden. Anhand der RT-qPCR wird durch die vielfache Amplifikation des Signals im Gegensatz zu konventionellen Protein-basierten diagnostischen Techniken, wie beispielsweise dem Nachweis bestimmter Antigene über einen *Enzyme Linked Immunosorbent Assay* (ELISA, Tabelle 1-1) der Nachweis eines einzigen Moleküls ermöglicht. Bei der Durchführung von 30 PCR-Zyklen können theoretisch aus nur einer einzigen Kopie 10^9 Kopien entstehen. Vor allem bei kleinen papillären Tumoren kann der Gehalt an tumorrelevanten Proteinen und Nukleinsäuren sehr gering sein, wodurch die Grenzen eines Protein-basierten diagnostischen Tests schnell erreicht werden.

1.5.4 Strategien zur Normalisierung der mRNA-Abundanz im Gesamturin

Die größte Herausforderung bei der Untersuchung der mRNA-Zusammensetzung in Gesamturin ergibt sich aus der Notwendigkeit zur Normalisierung quantifizierter mRNA-Abundanzen, um verschiedene Proben miteinander vergleichen zu können. Hierbei muss vor allem berücksichtigt werden, dass Urin-basierte RNA sehr unterschiedlichen Ursprungs sein kann (siehe Abschnitt 1.5.3), wodurch sich die aus verschiedenen Urinen präparierte mRNA im Hinblick auf die Integrität und Menge sehr stark unterscheiden kann. Vor allem im Urin von gesunden Spendern oder Patienten mit einem sehr kleinen, nicht-invasiven Harnblasenkarzinom kann die Gesamt-RNA-Menge sehr gering sein, so dass eine Konzentrationsbestimmung über die traditionelle A_{260} -Messung nicht möglich ist. Dementsprechend ist die Normalisierung der Genexpression auf die Gesamt-RNA-Menge nicht geeignet. Allerdings ist auch die Verwendung von sensitiven Nukleinsäure-Farbstoffen wie Ribogreen (Molecular Probes) nicht empfehlenswert, da diese zeit- und kostenaufwendige Technik für die Routine eines diagnostischen Tests nicht realisierbar ist. Darüber hinaus werden bei einer Normalisierung auf die Gesamt-RNA-Menge, inhibitorische Effekte innerhalb enzymatischer Reaktionen nicht berücksichtigt.

Eine alternative Möglichkeit ist die Normalisierung über interne Referenz-mRNAs, der sogenannten *housekeeping* Gene, welche normalerweise konstitutiv in der Zelle exprimiert werden sollten. Für eine Vielzahl von *housekeeping* Genen konnte allerdings gezeigt werden, dass beispielsweise die maligne Transformation einer normalen Zelle in eine Tumorzelle zu einer Regulation der Expression dieser Gene führen kann. Vor allem das häufig verwendete *housekeeping* Gen *GAPDH* (Glyceraldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase) ist an einer Vielzahl zellulärer Prozesse, wie unter anderem dem RNA-

1. Einleitung

Export aus dem Kern, der DNA-Replikation, der DNA-Reparatur sowie dem Aufbau des Zytoskeletts, beteiligt [80]. Dementsprechend können die Kopienzahlen der GAPDH mRNA sehr stark variieren, sogar in Geweben, welche aus einer identischen Erkrankung heraus entstanden sind [81]. Zunehmend wird angenommen, dass alle Gene unter bestimmten Bedingungen reguliert werden und kein universelles *housekeeping* Gen, welches in verschiedenen Geweben konstant exprimiert wird, existiert [64]. Aufgrund dessen wird von verschiedenen Arbeitsgruppen vorgeschlagen, eine Vielzahl unterschiedlicher *housekeeping* Gene zu untersuchen [82–85]. Das stabilste Gen oder die mittlere Expression aller untersuchten Gene wird anschließend zur Normalisierung verwendet. Es ist aber sehr wahrscheinlich, dass die Menge aller untersuchten *housekeeping* Gene in sehr heterogenen *ex vivo* Proben wie Urin stark variieren kann. Zudem ist die Bestimmung von vielen verschiedenen *housekeeping* Genen in einer Probe sehr kostenintensiv und unter Umständen aufgrund der Limitierung von Probenmaterial auch gar nicht möglich. Dies ist bei klinischen Probenmaterialien oftmals der Fall.

In der vorliegenden Arbeit wird der Ausdruck „*housekeeping* Gen“ durch „interne Referenz-mRNA“ ersetzt.

Ein alternatives Verfahren zur Normalisierung der Genexpression ist die Verwendung eines externen RNA-Standards, welcher keine Sequenzhomologien zu internen humanen mRNAs aufweist. Dieser Standard wird nach der Inaktivierung von RNasen durch GuSCN und vor der RNA-Präparation zu den Urinproben in einer genau definierten Menge gegeben. Ein externer RNA-Standard hat den Vorteil, dass die Überwachung des gesamten RNA-Präparations- und Quantifizierungs-Prozesses ermöglicht wird, so dass zum Beispiel inhibitorische Effekte aufgespürt werden können. Darüber hinaus wird die Untersuchung der technischen Robustheit des Systems durch die Zugabe eines externen RNA-Standards ermöglicht.

1.6 Zielsetzung der Arbeit

Der „Goldstandard“ für die Diagnostik von Harnblasenkarzinomen ist nach wie vor die invasive Zystoskopie. Die Identifikation von diagnostischen Markern aus leicht zu gewinnendem Probenmaterial zur präzisen, nicht-invasiven Tumordiagnostik ist daher überaus erstrebenswert.

In diesem Zusammenhang sollte in der vorliegenden Arbeit im Gesamturin von Harnblasenkarzinompatienten nach potentiellen RNA-Tumormarkern gesucht werden. Hierbei wurde das Ziel verfolgt, anhand dieses neuartigen diagnostischen Zugangs ein nicht-invasives Verfahren für eine robuste, sensitive und spezifische Diagnostik von Harnblasenkarzinomen zu entwickeln. Als Methodenplattform diene die Technik der quantitativen PCR, welche eine überaus sensitive, schnelle und höchstgenaue Quantifizierung jeglicher Nukleinsäure-Sequenzen in einem heterogenen Probenmaterial wie Urin ermöglicht.

Zunächst sollten Protokolle zur Präparation und Quantifizierung sowohl von mRNA als auch von miRNA aus Gesamturin aufgestellt und bezüglich ihrer Robustheit systematisch charakterisiert werden. Die Protokolle wurden anschließend unter zusätzlicher Verwendung eines kommerziellen RT-qPCR-Arrays angewendet, um im Urin eines „Training“-Sets an Harnblasenkarzinompatienten nach potentiellen RNA-Tumormarkern zu suchen.

Abschließend galt es, die diagnostische Aussagekraft ausgewählter, potentieller RNA-Tumormarker anhand einer größeren Population von Harnblasenkarzinompatienten hinsichtlich Robustheit, Sensitivität und Spezifität zu vergleichen.

2 Material und Methoden

Für die Herstellung der verwendeten Puffer und Lösungen wurde ausschließlich H₂O aus einer Millipore-Anlage (Millipore GmbH, Eschborn) verwendet. Soweit nicht anders vermerkt, haben alle Substanzen den Reinheitsgrad *p. a.*

2.1 Materialien

2.1.1 Geräte

Tabelle 2-1 Liste verwendeter Geräte

Gerät	Hersteller
Inverses Fluoreszenzmikroskop Axiovert 200M	Carl Zeiss Lichtmikroskopie, Göttingen, Deutschland
ABI PRISM 7900HT, qPCR Gerät	Applied Biosystems
Agarose-Gelkammer WIDE MINI-SUB® CELL GT	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Agarose-Gelkammer MINI-SUB® CELL GT	Bio-Rad
CanoScan N6704	Canon Deutschland, Krefeld
Denver MAXX, Elektronische Präzisionswaage	Denver Instrument GmbH, Göttingen, Deutschland
Elektrophorese Power Supply: Power Pac 300	Bio-Rad
Elektrophorese Power Supply EPS 600	Amersham Pharmacia Biotech Europe GmbH, Freiburg, Deutschland
ELISA-Reader Tecan Sunrise	Tecan Deutschland GmbH, Crailsheim, Deutschland
Feinwaage METTLER PM 480 Delta Range	Mettler-Toledo GmbH, Giessen, Deutschland
Forma Series II <i>Water Jacketed CO₂ Incubator</i> Hepa Class 100	Thermo Electron Deutschland GmbH & Co. KG, Baden-Württemberg, Deutschland
Fluoreszenz-, Lumineszenzphotometer, Fluoroscan	THERMO LABSYSTEMS Vertriebs-GmbH, Engelsbach, Deutschland
Fluoreszenzspektrophotometer FluoroMax-3	HORIBA, JOBIN YVON Inc., USA
Geldokumentationsanlage	PHASE, Lübeck, Deutschland
Heizblock DB-2D Dri-Block	Techne, Cambridge, UK
Invert-Mikroskop ECLIPSE TS100/TS100-F	Nikon, Badhoevedorp, Niederlande
Microprocessor pH meter pH 211	Hanna instruments, Kehl am Rhein, Deutschland
NanoDrop ND-1000 Spektrophotometer	PeqLab, Erlangen, Deutschland
Pipettierroboter, epMotion 5070	Eppendorf AG
Polyacrylamid-Gelelektrophorese System	Biometra, Göttingen, Deutschland
RS-24 Minirotator	Kisker, Steinfurt, Deutschland
Speedvac Concentrator SPD111V	Thermo Savant, Holbrook, USA
Sterile Arbeitsbank "hera safe"	hera Laborsysteme GmbH, Blaufelden, Deutschland
TGradient Thermocycler	Biometra,
Thermobad	GFL, Burgwedel, Deutschland
Thermomixer compact	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Thermoshaker-Laboshake zur Bakterienkultivierung	C. Gerhardt Fabrik und Lager chemischer Apparate GmbH & Co. KG, Königswinter, Deutschland
Western-Blot Elektrophorese System „Mighty Small System Gelsystem SE250/SE260	Hoefler, Amstetten, Österreich
Zentrifuge 5415 D	Eppendorf AG
Zentrifuge 5415 R	Eppendorf AG
Zentrifuge 5702	Eppendorf AG
Zentrifuge, Megafuge 1.0R	Kendro, Hanau, Deutschland
Zweistufige Drehschieber-Vakuumpumpe <i>Trivac E2</i>	Leybold, Köln, Deutschland

2.1.2 Chemikalien

Tabelle 2-2 Liste verwendeter Chemikalien

Chemikalie	Hersteller
40% Acrylamid/Bisacrylamid-Lösung (29:1)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Agar	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Agarose	Biozym, Hess. Oldendorf, Deutschland
Ammonium Persulfat (APS)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Borsäure	Sigma-Aldrich
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich
Bovines Serumalbumin (BSA)	Serva, Heidelberg, Deutschland
Casein	Gibco BRL, Gaithersburg, USA
Chloroform	Merck
Cisplatin-Teva® (<i>cis</i> -diamindichloroplatinum[II]), 0,5 mg/ml	Teva Pharma AG, Aesch, Schweiz
Coomassie Brilliantblau R 250	Sigma-Aldrich
Dansylcadaverin	Sigma-Aldrich
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Merck
Essigsäure	Sigma-Aldrich
Ethanol absolut	Merck
Ethidiumbromid	Roth
Ficoll	Biochrom AG, Berlin
Formamid	Merck
Glycin	Sigma-Aldrich
Glycerol	Sigma-Aldrich
Guanidiniumthiocyanat (GuSCN)	Gerbu, Gailberg, Deutschland
HCl	Merck
Hydroxyethylpiperazinethansulfonsäure (HEPES)	Sigma-Aldrich
Hefeextrakt	Gibco
Isopropanol	Sigma-Aldrich
Kaliumacetat	Sigma-Aldrich
Kaliumchlorid	Sigma-Aldrich
Kanamycin	Serva
KH ₂ PO ₄	Merck
β-Mercaptoethanol	Fluka, Buchs, Deutschland
Methanol	Roth
Milchpulver	Difco Laboratories, Detroit, USA
Natriumacetat	Merck
Natriumchlorid	Roth
Na ₂ HPO ₄ 2 H ₂ O	Merck
Natriumhydroxid	Roth
N-Lauroylnatriumsarcosin	Serva
Phenol (pH 4,5)	Roth
Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1, pH 7,5-8,0)	Sigma-Aldrich
Polyinosinsäure Kaliumsalz [Poly(I)]	Sigma-Aldrich
Rinderserum Albumin	Roth
Rotiphorese Gel 30 (37,5:1)	Roth
<i>Sodium dodecylsulfate</i> (SDS)	Roth
Stains-all	Sigma-Aldrich
Staurosporin	Biomol, Hamburg, Deutschland
TEMED	Roth
Trihydroxymethylaminomethan (Tris)-Base	Gerbu
Tris-HCl	Roth
Triton-X-100	Sigma-Aldrich
Trypton/Pepton aus Casein	Roth
Tween-20 [Poly(Oxyethylen) _n Sorbitan-Monolaurat]	Sigma-Aldrich
Urea	Roth
Xylencyanol	Sigma-Aldrich

2. Material und Methoden

2.1.3 Puffer und Lösungen

Blocking-Puffer (BP) 1x TBS, 0,1% (v/v) Tween-20, 5% (w/v) Milchpulver

Coomassie-Färbelösung 40% (v/v) Methanol, 10% (v/v) Essigsäure, 0,1% (w/v) Coomassie Brilliantblau R250

Denaturierender RNA-Probenpuffer 2,3 M Urea, 1x TBE, 66% (v/v) Formamid, 0,05% (w/v) Bromphenolblau, 0,05% (w/v) Xylencyanolblau

DNA-Probenpuffer in 1x TAE, Glycerin 30% (v/v), 0,25% (w/v) Bromphenolblau, 0,25% (w/v) Xylencyanol

Entfärbelösung 40% (v/v) Methanol, 10% (v/v) Essigsäure

Ficoll Probenpuffer 20% (w/v) Ficoll, 0,1% (w/v) Bromphenolblau, 0,1% (w/v) Xylencyanol

Lysispuffer 5,64 M GuSCN, 50 mM Natrium-Acetat und 0,5% N-Lauroylsarcosin

1x PBS (pH 7,4) 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄ 2H₂O, 1,8 mM KH₂PO₄

Primär-Antikörper-Puffer (PAP) 1x TBS, 0,1% (v/v) Tween-20, 5% (w/v) BSA

Stains-all-Lösung 10 ml Stock-Lösung (10 mg stains-all +10 ml Formamid) 10 ml Formamid, 50 ml Isopropanol, 1 ml 3 M Tris-HCl (pH 8,8), 129 ml H₂O

50x TAE (Tris-Acetat-EDTA) Laufpuffer (pH 8,3) 2 M Tris-Base, 1 M Natrium-Acetat, 0,1 M EDTA

10x TBE Puffer 890 mM Tris, 890 mM Borsäure, 25 mM EDTA

TE-Puffer (pH 7, pH 8) 10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA

10x SDS-Laufpuffer (pH 8,3) 250 mM Tris-Base, 1,92 M Glycin, 1% (w/v) SDS

5x SDS-Probenpuffer (10 ml) 0,1% (x/v) Bromphenolblau, 3,5 ml Glycerol, 3,2 ml 1 M Tris-HCl (pH 6,8), 2,5 ml β-Mercaptoethanol 1,5 g SDS

Transferpuffer (pH 8,3) 25 mM Tris-Base, 200 mM Glycin, 15% (v/v) Methanol

10x TBS (Tris Buffered Saline, pH 7,6) 0,2 M Tris-Base, 1,5 M NaCl

1x T-TBS (Wasch-Puffer) 1x TBS, 0,1% (v/v) Tween-20

2.2 Herkunft, Sammlung, Analyse und Lagerung von Urinproben

Für die Entwicklung eines RT-qPCR-basierten Tests zur Detektion von Harnblasenkarzinomen im Gesamturin wurden Urinproben von Patienten mit einem Harnblasenkarzinom und gesunden Spendern mit dem Einverständnis der Probanden gesammelt. Bei den Urinproben aller gesunder Spender, aller Infektionspatienten, einem Großteil der Harnblasenkarzinompatienten und aller Tumornachsorge-Patienten wurde der Urinstatus mit einem ComburTM Urinstick (Roche) bestimmt. Anhand dieses Tests wurde die Dichte, der pH-Wert, die Leukozytenzahl, die Erythrocytenzahl sowie der Nitrit-, Urobilinogen-, Billirubin- und Glucose-Gehalt bestimmt. Noch in der Klinik bzw. der Praxis wurde der Urin nach der Abgabe in eine Urinmonovette (Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland) mit GuSCN-Pulver aufgezogen (siehe Abschnitt 2.2.2). Außerdem wurde ein steriles 50 ml Polypropylen-Zentrifugenröhrchen (Sarstedt) mit unbehandeltem Urin für die Herstellung verschiedener Urin-Fractionen befüllt. Stabilisierter Urin wurde maximal nach 5 h weiterverarbeitet, der unbehandelte Urin wurde maximal 1 h nach der Abgabe weiterverarbeitet. Die Probanden der Kontrollgruppe wurden so gewählt, dass diese das

2. Material und Methoden

Alter und Geschlecht der Tumorpatienten widerspiegeln. Die Studie wurde von der Ethikkommission geprüft und genehmigt.

2.2.1 Klinische Proben

In der folgenden Tabelle werden die klinischen Daten zu den Probanden aufgeführt, deren Urin als Grundlage für die Detektion ausgewählter mRNA-Tumormarker eingesetzt wurde. Neben 61 Patienten mit einem Harnblasenkarzinom (Männer-Anteil = 72%, Frauen-Anteil = 28%) nahmen 9 Tumornachsorge-Patienten (Männer-Anteil = 67%, Frauen-Anteil = 33%), 15 Patienten mit einer Harnwegsinfektion (Männer-Anteil = 13%, Frauen-Anteil = 87%) und 37 gesunde Spender (Männer-Anteil = 62%, Frauen-Anteil = 38%) an der Studie teil.

Tabelle 2-3 Klinische Charakteristika der Harnblasenkarzinompatienten und der gesunden Probanden

<i>Patienten mit einem Harnblasenkarzinom</i>							
Alter (Median)	Anteil der Population (%)	♂ (n)	♀ (n)	Tumorgrad, - Stadium	Alter (Median)	♂ (n)	♀ (n)
40-60 (57)	24,6	11	4	G1, pTa	70	10	3
61-70 (69)	21,3	10	3	G2+G3, pTa-pTis	72	15	4
71-80 (74)	34,4	18	3	G2+G3, pT1	70	11	1
81-90 (84)	16,4	4	6	G2+G3, pT2-pT3	72	9	8
>90 (95)	3,3	1	1				

<i>Tumornachsorge-Patienten</i>							
Alter (Median)	Anteil der Population (%)	♂ (n)	♀ (n)	Tumorgrad, - Stadium bei Erstdiagnose	Alter (Median)	♂ (n)	♀ (n)
60-69 (65)	56,6	3	2	G1, pTa	60	1	-/-
70-79 (71)	33,3	3	-/-	G2+G3, pTa-pTis	65	2	1
80-89 (80)	11,1	-/-	1	G2+G3, pT1	70	3	2

<i>Kontrollgruppen</i>							
<i>Gesunde Spender</i>				<i>Patienten mit Harnwegsinfektionen</i>			
Alter (Median)	Anteil der Population (%)	♂ (n)	♀ (n)	Alter (Median)	Anteil der Population (%)	♂ (n)	♀ (n)
40-60 (53)	16,2	4	2	20-40 (39)	20,0	1	2
61-70 (65)	51,4	11	8	41-60 (46)	13,3	0	2
71-80 (76)	16,2	6	-/-	61-70 (64)	33,3	0	5
81-90 (82)	16,2	2	4	71-90 (79)	33,3	1	4

2.2.2 Herstellung und Stabilisierung verschiedener Urinfraktionen

Für die systematische Untersuchung der RNA-Präparation und –Detektion auf der Grundlage von Urin wurden verschiedene Urinfraktionen von 21 Spendern (13x ♂, 8x ♀; Alter, Median = 66 Jahre) hergestellt. Zusätzlich wurde Gesamt-Urin (6x ♂, 4x ♀; Alter,

2. Material und Methoden

Median = 31 Jahre) an verschiedenen Tageszeiten gesammelt (morgens, mittags, abends), um ein Tagesprofil von ausgesuchten mRNA-Ratios zu erstellen.

Gesamturin wurde präpariert, indem Spontanurin zur sofortigen Denaturierung von Nukleasen im Urin in eine spezielle Urinmonovette aufgezogen wurde, welche 3,54 g GuSCN Pulver enthielt. GuSCN wurde auch deswegen verwendet, da die Aufreinigung der Nukleinsäuren über eine Silica-Membran erfolgte und Nukleinsäuren die Eigenschaft aufweisen, in Anwesenheit von einem chaotropen Salz wie GuSCN an eine Silica-Matrix zu binden. Der Stempel wurde auf der 7 ml-Skalenmarke der Urinmonovette positioniert. Zusätzlich wurde die Position auf der Monovette mit einer Eichlinie markiert. Unter Verwendung dieser speziellen Urinmonovette wurden 6 ml Urin in die Monovette gefüllt. Das GuSCN-Pulver in der Monovette wurde sofort vollständig in dem Urin gelöst, indem die Monovette nach dem Befüllen in einen Rotator gestellt wurde. Durch die Verwendung einer SOP (*Standard Operating Procedure*, Standardarbeitsanweisung) wurde das Sammeln von Urin mit der GuSCN-Pulver enthaltenden Urinmonovette standardisiert und konnte somit in der Klinik für Urologie und Urologie-Praxen etabliert werden. Die stabilisierte Urinlösung wurde im Labor mit 500 µl 1 M Natriumacetat (pH 7,0) und 143 µl einer 35%igen N-Lauroylsarcosin-Lösung versetzt. Das Volumen wurde mit 1 M HEPES (pH 7,0) auf 10 ml gebracht. In dieser stabilisierten Urinlösung lag eine Konzentration von 3 M GuSCN, 50 mM Natrium-Acetate und 0,5% N-Lauroylsarcosin vor. Die Konzentration an HEPES variierte je nach Dichte des Urins geringfügig. Anschließend wurde die durchmischte Urinlösung in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C bis zur Aufarbeitung gelagert. Vor der Entwicklung der Urinmonovette wurde die Urinprobe für die Herstellung der Gesamturin-Fraktion mit einem Volumen „Lysispuffer“ versetzt, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert.

Die zelluläre Urinfraktion von 21 Spendern wurde präpariert, indem 3 ml Spontanurin bei 400 x g für 5 min zentrifugiert wurde. Der Überstand wurde abgenommen und das Pellet wurde im verdünnten Lysispuffer (1 Volumen Lysispuffer, 1 Volumen 1 M HEPES (pH 7,0) aufgenommen.

Zur Herstellung der zellfreien Urinfraktion wurde Spontanurin durch einen 5 µm Filter (Sartorius, Göttingen, Deutschland) filtriert. Der Durchfluss wurde wie der Gesamturin behandelt.

2.2.3 Quantifizierung der RNase-Aktivität im Urin

Die RNase-Aktivität im Urin von zehn verschiedenen Spendern (♂: n = 5; ♀: n = 5; Alter, Median: 30 Jahre) wurde in Form von RNase A-Äquivalenten unter Verwendung des RNaseAlert® Lab Test Kits (Ambion) bestimmt. Das Prinzip der Technologie ist in der Abbildung 2-1 dargestellt. Ein Reaktionsansatz setzte sich aus 90 µl Nuklease-freiem H₂O und 5 µl des konzentrierten RNaseAlert® Lab Test Puffers (Endkonzentration = 0,5x) zusammen, in welchem das lyophilisierte, spaltbare und Fluoreszenz-markierte RNase-Substrat gelöst wurde. Diese Lösung wurde in eine Mikroküvette überführt, und die Hintergrundfluoreszenz (relative Fluoreszenzeinheiten/sec) wurde über einen Zeitraum von

2. Material und Methoden

3 min bei einer Extinktion von 490 nm und einer Emission von 520 nm und 37°C in einem FluoroMax-3 Spektrofluorometer gemessen. Anschließend wurden 5 µl des RNase A-Standards oder der Urinprobe (1:100 in Nuklease-freiem H₂O verdünnt) zu dem Ansatz gegeben und vermischt. Über einen Zeitraum von mindestens 30 min wurde die Zunahme der Fluoreszenz mit der Software DataMax Version 2.20 (JOBIN YVON) gemessen. Die enzymatische Aktivität (k_{obs}) wurde unter Verwendung der Software Grafit 5.06 (Erithacus Software Ltd., Surrey, UK) anhand der Formel 2-1 berechnet (A_0 = relative Fluoreszenz zum Zeitpunkt 0; e = Eulerische Zahl; k = Geschwindigkeitskonstante; t = Zeit).

Formel 2-1: $y = A_0 \cdot (1 - e^{-kt}) + \text{offset}$

Die k_{obs} -Werte von 6 verschiedenen RNase A-Verdünnungen ($4,63 \times 10^{-7}$ bis $1,85 \times 10^{-8}$ Kunitz Units) wurden für die Bestimmung der RNase A-Aktivität im Urin verwendet. Sowohl die Standardkurve als auch die Bestimmung der RNase-Aktivität im Urin von zehn Spendern wurde in zweifacher Ausführung bestimmt.

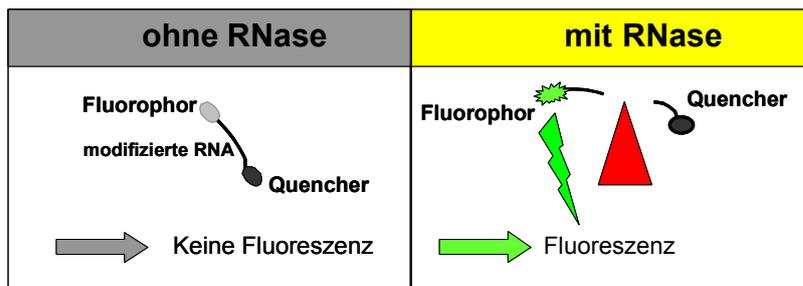


Abb. 2-1 Prinzip zur Bestimmung der RNase Aktivität anhand des RNaseAlert® Lab Test Kits.

2.3 Molekularbiologische Methoden

2.3.1 Verwendete Gelelektrophoresesysteme

In der unten aufgeführten Tabelle sind Längenstandards aufgelistet, welche in allen Gelelektrophoresen zur Bestimmung von Fragmentgrößen mitgeführt wurden.

Tabelle 2-4 DNA-, RNA-Längenstandards

Längenstandard	Verwendetes Gelsystem	Firma
10 bp-DNA-Marker	native Polyacrylamidgelelektrophorese	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
1 Kb-Plus-DNA-Marker	Agarosegelelektrophorese	Invitrogen
High range RNA Marker	Denaturierende Polyacrylamidgelelektrophorese, Agarosegelelektrophorese	MBI Fermentas, St.Leon-Rot, Deutschland
Low range RNA Marker	denaturierende Polyacrylamidgelelektrophorese, Agarosegelelektrophorese	MBI Fermentas

2.3.1.1 Analytische native Agarosegelelektrophorese

Die native Agarosegelelektrophorese wurde zum Überprüfen doppelsträngiger DNA und einzelsträngiger RNA verwendet. Die verwendeten Gele wurden mit einer Agarose-Konzentration von 1–2% in 1x TAE Puffer hergestellt. Zum Lösen der Agarose im Puffer wurde die Lösung kurz aufgeköcht. Anschließend wurde der abgekühlten, noch flüssigen Lösung Ethidiumbromid (1 µg/ml) hinzugefügt. Die Elektrophorese wurde bei einer Spannung von 80–100 V durchgeführt für 1 bis 2 h durchgeführt. Der Fluoreszenzfarbstoff Ethidiumbromid färbte die Nukleinsäuren durch Interkalation in die DNA-Doppelhelix an. Dadurch fluoreszierten diese unter UV-Licht und konnten auf einem Transilluminator fotografiert und mit einer Geldokumentationsanlage digitalisiert werden. Anhand des in der Elektrophorese mitgeführten DNA-Größenstandards konnten die Fragmentgrößen eingeordnet werden.

2.3.1.2 Analytische native Polyacrylamidgelelektrophorese

Unter Verwendung der nativen, vertikalen Polyacrylamidgelelektrophorese wurden DNA-Primer (maximal 30 Basen) und einzelsträngige RNA oder doppelsträngige siRNAs (maximal 21 Basen/-paare) überprüft. Das Gel wurde aus 1x TBE Puffer und 15% Polyacrylamid hergestellt. Zur Polymerisierung wurde die Gellösung mit 0,2% (v/v) TEMED und 2% (v/v) einer 10%igen APS-Lösung versetzt. Der Vorlauf von etwa 30 min und der eigentliche Lauf erfolgten bei 4°C. Vor dem Auftragen wurden die Proben mit einem gleichen Volumen Ficoll-Probenpuffer versetzt. Anschließend wurde die Elektrophorese bei 16 mA durchgeführt. Danach wurden die aufgetrennten Nukleinsäuren im Gel mit Stains-all Lösung etwa 1 h gefärbt. Die unspezifische Hintergrundfärbung des Gels wurde im Tageslicht ausgebleicht und anhand eines Scanners digitalisiert.

Außerdem wurde das System genutzt, um kurze PCR-Produkte (70–100 bp) zu überprüfen. Hierfür wurde eine Polyacrylamidkonzentration von 5% ausgewählt. Nach der Elektrophorese wurden die Nukleinsäuren im Gel mittels Ethidiumbromid (1 µg pro ml 1x TBE) bei RT für 5 min gefärbt und unter Verwendung der Geldokumentationsanlage digitalisiert.

2.3.1.3 Analytische denaturierende Polyacrylamidgelelektrophorese

Die denaturierende Polyacrylamidgelelektrophorese wurde wie unter 2.3.1.2 beschrieben, durchgeführt und für die Auftrennung von RNA eingesetzt. Allerdings setzte sich die Gellösung aus 8 M Urea, 1x TBE und der entsprechenden Acrylamidkonzentration (6% oder 8%) zusammen. Die hohe Harnstoffkonzentration im Gel bewirkt eine Denaturierung der Nukleinsäuren während des Laufs, so dass keine Sekundärstrukturen ausgebildet werden können. Vor dem Lauf wurden die Proben zusätzlich im denaturierenden RNA-Probenpuffer bei 90°C für 2 min inkubiert.

2.3.3 Test auf RNase-Kontamination

Im Umgang mit RNA wurden ausschließlich RNase-freie Puffer, Lösungen und H₂O verwendet. Um eine Kontamination mit RNasen auszuschließen, wurde jeweils ein Aliquot (4 µl) der zu testenden Lösung entnommen und mittels MS2-Test untersucht. MS2 ist eine definierte RNA des Phagen MS2. Für den Test wurde das Aliquot zusammen mit 2 µl MS2 RNA (0,8 µg/µl, Roche, Mannheim, Deutschland) und 10 µl RNase-freiem H₂O für 0, 30 und 60 min bei 37°C inkubiert. An den ausgewählten Zeitpunkten wurden 4 µl des Reaktionsansatzes entnommen, mit 5 µl RNA-Probenpuffer versetzt, im flüssigen Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert. Die Analyse erfolgte in einem denaturierenden, 8%igen Polyacrylamidgel (siehe 2.3.1.3). In RNase-freien Proben liegt eine einzelne, saubere Bande im Gel vor. Im Fall einer Kontamination der Testlösung mit RNasen wird die Degradierung der MS2-RNA in Form kurzer RNA-Fragmente erkennbar.

2.3.3 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentration der Nukleinsäuren wurde am NanoDrop ND-1000 Spektralphotometer (Peqlab, Erlangen, Deutschland) über die Messung der Absorption (A) bei einer Wellenlänge von 260 nm auf der Grundlage des Lambert-Beersches-Gesetzes ($E^{(LB)} = \epsilon \times c \times d$) bestimmt. Dabei steht „ ϵ “ für den Extinktionskoeffizienten, „c“ für die Konzentration der Lösung und „d“ für die Küvettendicke. Für jede Probe wurde eine zweifache Bestimmung durchgeführt. Die Lösung, in welcher die Nukleinsäure aufgenommen und gelagert wurde, wurde als Nullwert gesetzt. Aus den Mittelwerten wurden die Konzentrationen der Nukleinsäurelösungen berechnet. Für RNA entspricht eine A_{260} von 1 einer Konzentration von 40 µg/ml, für DNA 50 µg/ml. Zusätzlich kann durch das A_{260}/A_{280} -Verhältnis eine Aussage zum Reinheitsgrad einer Nukleinsäurelösung gemacht werden, da Proteine monochromatisches Licht bei einer Wellenlänge von 280 nm absorbieren. Bei einer optischen Dichte von < 1,8 liegt eine mögliche Kontamination mit Protein vor.

2.3.4 Ethanol-Präzipitation

Für die Ethanol-Präzipitation wurde die Nukleinsäure-Lösung mit einem Zwanzigstel Volumen 3 M Natriumacetat (pH 4,5) und 2,5 Volumen eiskaltem Ethanol absolut versetzt. Der Ansatz wurde gevortext und zwischen 1 h und 18 h bei -20°C gelagert. Es erfolgte eine Zentrifugation bei 16.000xg für 45 min bei 4°C. Der Überstand wurde verworfen, und das Nukleinsäurepellet wurde mit 70%igem eiskaltem Ethanol gewaschen. Nach einer erneuten Zentrifugation wurde das Ethanol abgenommen, das Pellet getrocknet und in Nuklease-freiem H₂O, 10 mM Tris oder TE-Puffer aufgenommen.

2.3.7 Präparation eines externen RNA-Standards (RNA_{LUC})

Für die Untersuchung des RNA-Präparationssystem wurde ein externer RNA-Standard verwendet, welcher über eine T7-Transkription generiert wurde. Hierfür mussten verwendete Lösungen auf eine mögliche Kontamination mit RNasen hin untersucht werden. Ferner musste eine ausreichende Menge des in die T7-Reaktion eingesetzten T7-Templates, einem Restriktionsfragment des pet24a(+)-*Firefly* Luciferase-Plasmids aus dem Wirtsorganismus *E. coli* hergestellt werden. Nach der T7-Reaktion wurde eine Behandlung mit DNase I durchgeführt, und die RNA wurde aufgereinigt.

2.3.5.1 Kultivierung transformierter Bakterien sowie Präparation von Plasmid-DNA

Für die Aufreinigung der Plasmid-DNA wurden die Bakterien in Luria-Bertani (LB)-Medium kultiviert. LB-Flüssigmedium wurde mit 10 g Trypton, 10 g Hefeextrakt, 5 g NaCl und Millipore-H₂O ad 1000 ml hergestellt. Für die LB-Agarplatten wurden 15 g/l Agar zugefügt. Nach dem Autoklavieren wurde das Antibiotikum bei einer Temperatur von etwa 55°C dazugegeben (Tabelle 2-5).

Tabelle 2-5 Verwendeter Bakterienklon

Klonierte DNA-Sequenz	Stamm	Aufzucht	Vektor	Pasmidhersteller
<i>Firefly</i> Luciferase	<i>E. coli</i> (XL-1 Blue)	LB-Medium + 30 µg/ml Kanamycin	pet24a(+)	Promega, Mannheim, Deutschland

Um ausreichende Mengen der gewünschten Plasmid-DNA zu präparieren, wurden zuerst 3 ml Antibiotika-haltiges LB-Medium mit Bakterien eines Klons angeimpft und über Nacht bei 37°C inkubiert. Von dieser Kultur wurden 1,5 ml abgenommen und bei 4.000xg für 10 min (4°C) zentrifugiert. Das Bakterienpellet wurde in LB-Medium aufgenommen, resuspendiert und zu 100 ml Antibiotika-haltigem LB-Medium gegeben. Die Kultur wurde über einen Zeitraum von 14 h bei 37°C inkubiert. Die Ernte der Bakterien erfolgte durch Zentrifugation bei 4.000xg für 10 min bei 4°C. Das Bakterienpellet wurde mit kaltem 1x PBS gewaschen und erneut zentrifugiert. Die Aufreinigung der Plasmid-DNA wurde mittels einer Plasmid-Maxi-Präparation (Qiagen, Hilden, Deutschland) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Die eluierte Plasmid-DNA wurde durch die Zugabe von 0,7 Volumen Isopropanol bei RT präzipitiert und wie unter beschrieben konzentriert. Zur Verifizierung der DNA-Sequenz wurden 0,6 µg des Plasmids zur Sequenzierung verschickt.

2.3.5.2 In vitro Transkription

Die für die Durchführung der T7-Reaktion benötigten Materialien werden in der folgenden Tabelle aufgelistet.

Tabelle 2-6 Reaktionskomponenten für die Durchführung der T7-Reaktion

	Enzym, Reaktionskomponente, Verbrauchsmaterial	Hersteller
Restriktionsverdau	EcoRV 10x Reaktionspuffer (Sure/Cut Puffer-System B)	Roche, Mannheim, Deutschland Roche
T7-Reaktion	T7 Polymerase (20 units/μl) 5x Reaktionspuffer RNase Inhibitor (20 units/μl) Ribonukleotide	MBI Fermentas MBI Fermentas Ambion, Huntingdon, Cambridgeshire, UK Roche
DNA-Verdau	RNA-free™ DNase I (2 units/μl) 10x Reaktionspuffer Inaktivierungsreagenz	Ambion Ambion Ambion
Aufreinigung	NAP-5 Gelfiltrationssäule	Amersham, Buckinghamshire, UK

Der externe RNA_{LUC} wurde durch *in vitro* "run-off"-Transkription unter Verwendung einer T7-RNA-Polymerase synthetisiert. Das DNA-Template für die T7-Reaktion wurde über einen EcoRV-Restriktionsverdau aus 8 μg des präzipitierten pet24a(+) Vektors mit kloniertem *Photinus pyralis* Luciferase-Gen hergestellt. Der Restriktions-Ansatz mit einem Volumen von 50 μl enthielt 1x Reaktionspuffer und wurde über einen Zeitraum von 2 h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz in einem präparativen 1%igen Agarosegel für 1 h bei 90 V aufgetrennt. Die Bande mit der Luciferase-Sequenz wurde aus dem Gel geschnitten und die DNA wurde anhand des „Wizard® Plus SV Gel and PCR Cleaning Systems“ (Promega) nach Angaben des Herstellers aufgereinigt. Anschließend wurde die Konzentration der aufgereinigten DNA bestimmt. Das Reaktions-Gemisch der T7-Transkription mit einem Volumen von 50 μl setzte sich aus 1x Reaktions-Puffer, jeweils 2 mM Ribonukleotide (UTP, CTP, GTP, ATP), 40 Units RNase-Inhibitor, 30 Units T7-RNA-Polymerase und 0,8 μg DNA-Template zusammen. Nach der einstündigen Synthese von RNA_{LUC} (1570 nt) bei 37°C wurde die Template-DNA durch eine Inkubation mit 2 Units DNase I in 1x Reaktionspuffer bei 37°C für 30 min abgebaut. Danach wurden 0,1 Volumen Inaktivierungsreagenz hinzugefügt, und es erfolgte eine Inkubation von 2 min bei RT. Der Ansatz wurde bei 10.000 rpm für 1,5 min bei 4°C zentrifugiert, und anschließend wurde das Reaktionsgemisch über eine NAP-5 Säule aufgereinigt, um nicht-eingebaute Ribonukleotide abzutrennen. Das Filtrat wurde mit einem Volumen Phenol (pH 4,5) versetzt, gevortext und bei 10.000 rpm für 10 min bei 4°C zentrifugiert. Die wässrige obere Phase wurde abgenommen, mit 1 Volumen Chloroform versetzt, gevortext und erneut zentrifugiert. Die obere wässrige Phase wurde mit Ethanol präzipitiert. Über Agarosegelelektrophorese (1,4% Agarose, 90 V) wurde die Integrität und Länge von RNA_{LUC} untersucht, die Konzentration der RNA wurde über A₂₆₀-Messung bestimmt.

2.3.8 Präparation von Gesamt-RNA aus Urinproben

Zur Präparation von Gesamt-RNA aus Urin wurden verschiedene Systeme untersucht. Vor der RNA-Präparation wurden die aufgetauten Urinlösungen mit 1 M HEPES (pH 7,0) auf einen pH-Wert von 7,0 eingestellt. Zusätzlich wurden 10^7 Kopien RNA_{LUC} hinzugefügt. Bei der Untersuchung der verschiedenen Präparations-Systeme wurde dem Urin eines gesunden Spenders 10^3 ECV-304-Zellen hinzugefügt, um eine ausreichende RNA-Menge zu garantieren. Die RNA-Eluate wurden immer einkonzentriert. Das RNA-Pellet wurde in 20 μ l H₂O aufgenommen und 10 μ l des RNA-Extraktes wurden jeweils in die cDNA-Synthese und non-RT-Reaktion eingesetzt.

2.3.6.1 Standardprotokoll zur Präparation von Gesamt-RNA aus Urin mittels RNeasy® Midi Kit

Das Prinzip zur Präparation und Quantifizierung von Gesamt-RNA aus Urin ist in der folgenden Abbildung dargestellt.

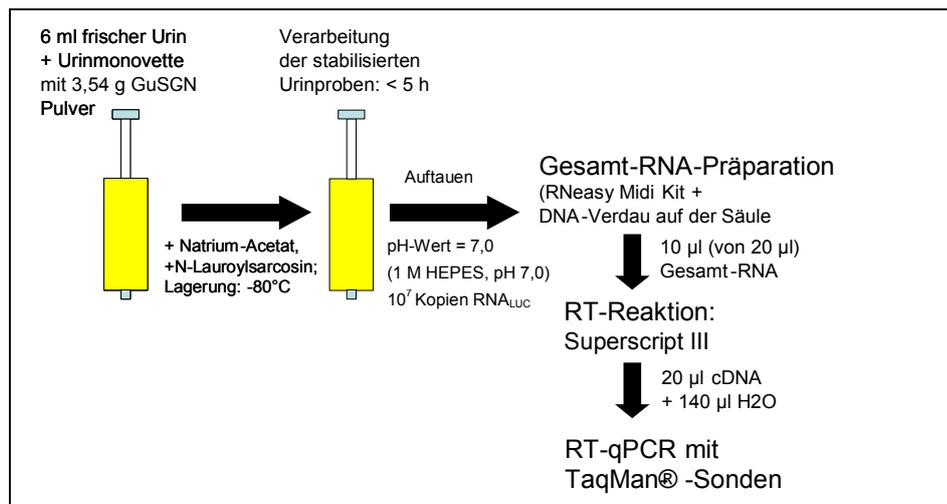


Abb. 2-2 Übersichtsdarstellung zur Aufarbeitung von Urinproben.

Die Präparation der Gesamt-RNA aus allen verschiedenen Urinfraktionen erfolgte mit dem RNeasy® Midi-Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) und beinhaltete einen DNA-Verdau auf der Silica-Membran. In der folgenden Abbildung werden die einzelnen Schritte der Gesamt-RNA-Präparation aufgeführt.

2. Material und Methoden

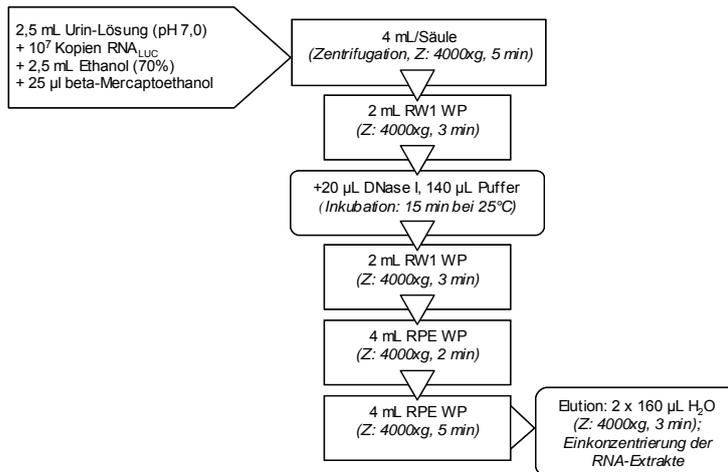


Abb. 2-3 RNA-Präparation mittels modifiziertem RNeasy® Midi-Kit. (WP = Waschpuffer).

2.3.6.2 Präparation von Gesamt-RNA aus Urin mittels RNeasy® Mini Kit

Die RNA-Präparation erfolgte mit dem RNeasy® Mini Kit (Qiagen) nach Angaben des Herstellers mit und ohne DNA-Verdau auf der Säule. Allerdings wurde die aus 1 ml Urin und 1 ml Lysispuffer bestehende Probe mit 1,4 ml Ethanol absolut versetzt und vollständig über Vakuum auf die Säule geladen.

2.3.6.3 Präparation von Gesamt-RNA aus Urin mittels QiAmp MinElute Virus Kit

Die RNA-Präparation erfolgte mit dem QiAmp MinElute Virus Kit (Qiagen). Dafür wurden 2 ml der GuSCN-haltige Urinlösung mit 5,6 µg Carrier-RNA sowie 1,2 ml Ethanol absolut versetzt und über Vakuum auf die Säule geladen. Alle weiteren Schritte erfolgten nach den Angaben des Herstellers einschließlich eines DNA-Verdaus auf der Säule.

2.3.6.5 Präparation von Gesamt-RNA aus Urin mittels QiAmp UltraSens Virus Kit

Für die RNA-Präparation mittels QiAmp UltraSens Virus Kit (Qiagen) wurde purer, eingefrorener Urin verwendet. Nach dem Auftauen wurde 1 ml des Urins mit 800 µl Puffer AC und 5,6 µg Carrier-RNA versetzt. Die weitere Präparation wurde nach den Angaben des Herstellers einschließlich eines DNA-Verdaus auf der Säule durchgeführt.

2.3.6.5 Präparation von Gesamt-RNA aus Urin mittels NucleoSpin® Virus F Kit

Für die RNA-Präparation unter Verwendung des Virus L Kits (Macherey-Nagel, Düren, Deutschland) wurden 3 ml Spontanurin mit 2 ml Lysispuffer vermischt, eingefroren und bei -80°C gelagert. Nach dem Auftauen wurde die Urinlösung nach den Angaben des Herstellers aufgereinigt.

2.3.6.6 Präparation von Gesamt-RNA aus Zelllinien und Reverse Transkription präparierter RNA

Jeweils 1×10^6 Zellen (LnCap, PC-3, ECV-304, RT-4, MCF-7, siehe Tabelle 2-28) wurden bei 400xg für 5 min (25°C) pelletiert. Das Kulturmedium wurde abgenommen und das Zellpellet wurde mit 1x PBS gewaschen (400xg, 5 min, 25°C). Anschließend wurde das Zellpellet in 350 μl RLT Puffer (Qiagen) resuspendiert, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur RNA-Präparation bei -80°C gelagert. Die RNA-Präparation erfolgte mit dem RNeasy™-Mini-Kit (Qiagen) nach Angaben des Herstellers.

Nach der RNA-Präparation wurde ein DNA-Verdau durchgeführt, wobei 55 μl des Eluats mit 5 μl DNase I (5 Units) und 6,6 μl 10x Reaktionspuffer vermischt wurden. Es folgte eine Inkubation von 30 min bei 37°C . Anschließend wurden 6,5 μl 25 mM EDTA zu dem Reaktionsgemisch gegeben und der Ansatz wurde 10 min bei 65°C zur Inaktivierung der DNase I inkubiert. In der unten aufgeführten Tabelle sind die für den DNA-Verdau verwendeten Reagenzien aufgeführt.

Tabelle 2-7 Reaktionskomponenten für den DNA-Verdau

Enzym, Reagenz	Hersteller
Desoxyribonuklease I (DNase I)	MBI Fermentas, St.Leon-Rot, Deutschland
10x Reaktionspuffer (100 mM Tris-HCl [pH 7,5], 25 mM MgCl_2 , 1 mM CaCl_2)	MBI Fermentas
25 mM EDTA	MBI Fermentas

Die RNA wurde anschließend mit ETOH gefällt (siehe Abschnitt 2.3.4). Die RNA wurde in 20–50 μl H_2O aufgenommen und für 15 min bei RT gelöst. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte bei A_{260} . Zur Überprüfung der Integrität wurden 500 ng der RNA in einem Agarosegel (1,4%) analysiert.

2.3.7 Reverse Transkriptase-Reaktion präparierter RNA: Standard Protokoll

Tabelle 2-8 Reaktionskomponenten der Reversen Transkriptase-Reaktion

Konzentration, Volumen pro Reaktion (Σ 20 μ l)	Enzym, Reagenz	Hersteller
40 Units	RNaseOut™ (40 units/ μ l)	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
200 Units	SuperScript™ III Reverse Transcriptase (200 Units/ μ l)	Invitrogen
1x	10x PCR Puffer (250 mM Tris-HCl (pH 8,3), 375 mM KCl, 15 mM MgCl ₂)	Invitrogen
5 mM	0,1 M Dithiothreitol (DTT)	Invitrogen
300 ng	Random Hexamer Primer (RHP, 150 ng/ μ l)	Invitrogen
0,5 mM	Desoxynukleotide (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)	MBI Fermentas

Neben dem RNA-Extrakt wurden 10^7 Kopien RNA_{LUC} direkt in die cDNA-Synthese eingesetzt, um die in den Urin zugegebene Kopienzahl zu verifizieren. Die Zusammensetzung Reverse Transkriptase Reaktion wird in Tabelle 2-8 aufgeführt. Der RNA-Extrakt (10 μ l), RHP und Desoxynukleotid-Triphosphate wurden für 10 min bei 75°C denaturiert und anschließend erfolgte eine Inkubation auf Eis für 1 min. Das *Annealing* der RHP wurde bei 25°C für 10 min durchgeführt. Darauf wurde der Reaktions-Puffer, Superscript™ III Reverse Transkriptase, DTT und RNaseOut™ hinzugefügt. Die Synthese der cDNA wurde bei 50°C für 60 min durchgeführt. Die Inaktivierung der Reverse Transkriptase erfolgte bei 70°C für 15 min. Zur Identifikation von Kontaminationen durch genomische DNA wurde eine non-RT Reaktion mitgeführt, welche H₂O anstelle der Reversen Transkriptase und RNaseOut™ enthielt.

2.3.8 Polymerasekettenreaktion (PCR)

2.3.8.1 PCR Amplikons

Die verwendeten Primer wurden von der Firma Metabion (Martinsried, Deutschland) bezogen. Die TaqMan®-Sonden wurden von der Firma Eurogentec (Seraing, Belgien) bezogen. Die Programme, mit welchen Primer und TaqMan®-Sonden entworfen wurden, sind in der folgenden Tabelle aufgelistet.

Tabelle 2-9 Verwendete Programme für den Entwurf von Primern und Sonden

Programme	Hersteller
PrimerExpress® Version 2.0	Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland
Primer3	Steve Rozen, Whitehead Institute for Biomedical Research, Cambridge, UK
Blast	ww.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST

2. Material und Methoden

Die Schmelztemperatur aller Primer lag bei ca. 62°C, die der Sonden war 8–10°C höher. Über das Programm Blast wurde sichergestellt, dass die Sequenzen der Primer und Sonden nur eine vollständige Sequenzhomologie zur Target-mRNA aufweisen. Die qPCR-Amplikons wurden mit der Voraussetzung entworfen, dass entweder ein Primer oder die TaqMan®-Sonde auf einer Exon/Exon Grenze positioniert war. Diese Voraussetzung gewährleistet, dass genomische DNA in der Reaktion nicht amplifiziert wird. Die Amplifikation der Ubiquitin C, CC3 und TC3 mRNA erfolgte über ein Intron-überbrückendes Primer-Paar. Die BCL2L1 mRNA wurde über Primer amplifiziert, welche in einem Exon positioniert waren. Die entsprechenden Sequenzen und Charakteristika der verwendeten Amplikons werden in den nachfolgenden Tabellen aufgeführt.

Tabelle 2-10 Charakteristika der für die Detektion tumorrelevanter mRNA-Sequenzen verwendeten qPCR-Amplikons.

Target mRNA	Accession Nummer	Sequenz: '5-3'			Amplikon Länge (bp)	E ^B	R ² der Standard Kurve ^C
		1. Forward Primer	2. Reverse Primer	3. TaqMan® Sonde ^A			
BAX	NM_138761			1. TGGAGCTGCAGAGGATGATT 2. AGCTGCCACTCGGAAAAAGA 3. FAM-CCGCCGTGGACACAGACTCCC-BHQ-1	71	1,98	0,9994
BCL2L1	NM_138578			TGCGTGGAAGCGTAGACA GCTCTAGGTGGTCATTCAGGTAAGT FAM-TGGTGAGTCGGATCGCAGCTTG-BHQ-1	88	1,96	0,9992
CC3	NM_006410			GTCTGCAGAGCTGGCAAAAAG TCAACCTTGGCTTCTACTTCTCC YY-TGGAGGGTGCAAAACATTTCAACTTGC-BHQ-1	123	1,98	0,9996
ETS2	NM_005239			CCAAGAAAAGACAGAAGATCAATATGAA GTGCCAAAACCTAATGTATTGCTG FAM-CACCTCACCTCCGTTCCCTCATTGGA-BHQ-1	90	1,96	0,9982
Ki-67 ^D	NM_002417			CGGACTTTGGGTGCGACTT 2.1: CAACTCTCCACTGGGACGAT 2.2: GTCGACCCCGCTCCTTT FAM-ACGAGCGGTGGTTCGACAAGTG-BHQ-1	77 202	2,00 1,96	0,9988 0,9993
OP18	NM_203401			AAAGACGCAAGTCCCATGAAG AGCTTCCATTTGTGGGTCAG FAM-GCAGCTGGCTGAGAAAACGAGAGCA-BHQ-1	146	1,95	0,9992
TC3	AF092095			GGAAGCTCACCTTCGACGAG AGCATTGCAACAGGCACAAA FAM-CAGAGGGAAAGCTGGGGCGG BHQ-1	242	1,95	0,9988
uPA	BC013575			CCTGCCCTCGATGTATAACGAT CCGGATAGAGATAGTCGGTAGAATTC FAM-CCCAGTTGGCACAAGCTGTGAGATCA-BHQ-1	92	2,01	0,9994
UPK1A	NM_007000			CGTCATGATTGAGCAAGAATGC CGGAAGGCTGACGTGAAGT FAM-TGGCACATCTGGTCCCATGGA-BHQ-1	72	1,95	0,9992

^AFAM = 6-Carboxyfluorescein; **BHQ** = Black Hole Quencher™; **YY** = Yakima Yellow

^BE = Effizienz

^CDer Threshold wurde für fast alle Amplikons auf 0,2 gesetzt. Für CC3, OP18 und TC3 lag der Threshold bei 0,1.

^DFür das Ki-67 Amplikon wurden zwei unterschiedliche reverse Primer verwendet

2. Material und Methoden

Tabelle 2-11 Charakteristika für die Normalisierung detektierter mRNA-Kopienzahlen verwendeten qPCR-Amplifikons.

Target mRNA	Accession Nummer	Sequenz: '5-3' 1. Forward Primer 2. Reverse Primer 3. (TaqMan® Sonde)*	Amplikon Länge (bp)	E ^B	R ² der Standard Kurve ^C
18S rRNA	U13369.1	1. CACATCCAAGGAAGGCAGCAG 2. GACTTGCCCTCCAATGGATCC	122	1,85	0,9983
GUSB	NM_000181	1. TTTGGAATTTTGCCGATTTCAT 2. GCCGAGTGAAGATCCCCTTT 3. FAM-AACAGTCACCGACGAGAGTGCTGGG-BHQ-1	78	2,03	0,9994
B2M	NM_004048	CTCCGTGGCCTTAGCTGTG AATCTTTGGAGTACGCTGGATAGC	73	1,94	0,9997
GAPDH	AF261085	GACAGTCAGCCGCATCTTCTT TCCGTTGACTCCGACCTTC YY-CCAGCCGAGCCACATCGCTG-BHQ-1	86	1,99	0,9987
RNA _{LUC}		GAACATCACGTACGCGGAATAC TTTCACTGCATACGACGATTCTG FAM-TCGAAATGTCCGTTTCGGTTGGCA-BHQ-1	104	1,94	0,9984
RP II	NM_000937	GTACGCACCACGTCCAATGA GAGCCATCAAAGGAGATGACG	110	1,97	0,9983
RPLP0	NM_001002	CTGGAGAAACTGCTGCCTCAT CACCTTATTGGCCAGCAACA FAM-CCGGGGGAATGTGGGCTTTG-BHQ-1	99	1,98	0,9988
RPS27A	NM_002954	GAAAACCCTTACGGGGAAGA TGCTTGCCAGCAAAGATCAG	132	1,92	0,9961
UBC	NM_021009	GATTTGGGTGCGGGTTCTT GATGGTGTCACTGGGCTCAA FAM-TGGATCGCTGTGATCGTCACTTGA-BHQ-1	119	1,98	0,9973
YWHAZ	NM_003406	ACAACCTTGACATTGTGGACATCG CCGGTTAATTTCCCCTCT	75	1,97	0,9992

^A**FAM** = 6-Carboxyfluorescein; **BHQ** = Black Hole Quencher™; **YY** = Yakima Yellow

^BE = Effizienz der qPCR

^CDer Threshold wurde für fast alle Amplifikons auf 0,2 gesetzt. Für BGUS und RNA_{LUC} lag der Threshold bei 0,1.

2.3.8.2 Konventionelle PCR

Für alle mRNAs wurden jeweils 2–3 Primerpaare entworfen, welche zuerst anhand einer konventionellen PCR untersucht wurden. In die PCR wurde eine verdünnte cDNA eingesetzt, welche aus Gesamt-RNA aus ECV-304-Zellen synthetisiert wurde. Anhand der konventionellen PCR wird ein bestimmtes DNA-Fragment, welches von sequenzspezifischen Primern flankiert wird, mittels einer thermostabilen DNA-Polymerase und sich wiederholenden, dreiphasigen Zyklen vervielfältigt (Tabelle 2-12). In der Tabelle 2-13 werden die Reaktionskomponenten der PCR aufgeführt. Die PCR wurde mit einer Taq-Polymerase von New England BioLabs (Frankfurt am Main, Deutschland) durchgeführt. Zur Analyse wurden die PCR-Produkte anhand einer Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt.

2. Material und Methoden

Tabelle 2-12 Zusammensetzung der PCR

Komponente	Konzentration, μl
<i>cDNA-Template</i>	2 μl
Senseprimer (10 μM)	200 nM
Antisenseprimer (10 μM)	200 nM
dNTP's (jeweils 10 mM)	200 mM
Magnesium	2 mM
10x Puffer	1x*
Taq-Polymerase (5 Units/ μl)	1 Unit
H ₂ O	<i>ad</i> 25 μl
Σ	25 μl

*10 mM KCl, 10 mM (NH₄)₂SO₄, 20 mM Tris-HCl, 2 mM MgSO₄, 0,1% Triton X-100, pH 8,8 (25°C)

Tabelle 2-13 Temperaturprofil der PCR

Schritt	Bedingungen
Denaturierung	120 sec 94°C
Denaturierung	15 sec 95°C
Hybridisierung	45 sec 60°C
Elongation	30 sec 72°C
Zyklen	35
Finale Elongation	360 sec 72°C

2.3.8.3 Einstellungen des Pipettierroboters

Um eine hohe Präzision und Standardisierung bei der RT-qPCR-basierten Quantifizierung von mRNA-Tumormarkern und miRNAs im Patientenurin oder in RNA-Extrakten transfizierter Zellen zu erreichen, wurde das cDNA-Template sowie der Mastermix der PCR von einem Pipettierroboter (EP Motion 5070) in die 384-well Reaktionsplatten überführt. Hierzu wurde das in der Tabelle 2-14 aufgeführte Programm für die Übertragung des cDNA-Templates erstellt. Die Proben wurden mit einem 8-Kanal-Pipettierkopf („TM_50_8“) im Pipettiermodus von dem Vorratsgefäß, einer 96-well Platte, in die 384-well Reaktionsplatte vorgelegt. Anschließend erfolgte die Zugabe des Mastermixes durch den Roboter über einen Einkanalpipettierkopf („TS_50“) im Multi-Dispensiermodus. Das hierzu erstellte und verwendete Programm wird in der Tabelle 2-15 aufgeführt. Für alle Pipettiervorgänge wurden Filterspitzen verwendet.

Tabelle 2-14 Roboter-Einstellungen für das Pipettieren von cDNA

Parameter	Pipettiermodus
<i>Liquid options</i>	
<i>Speed aspiration</i>	15,4 mm/sec
<i>Speed dispense</i>	50,0 mm/sec
<i>Delay blow</i>	700 msec
<i>Speed blow</i>	40,0 mm/sec
<i>Movement blow</i>	50% of maximal blow
<i>Pewetting</i>	0 cycles
<i>Change tips</i>	After 3 aspirations
<i>Volume</i>	2 μl

Tabelle 2-15 Robotereinstellungen für das Pipettieren von Mastermix

Parameter	Pipettiermodus
<i>Speed aspiration</i>	15,4 mm/sec
<i>Speed dispense</i>	80,0 mm/sec
<i>Delay blow</i>	700 msec
<i>Speed blow</i>	60,0 mm/sec
<i>Movement blow</i>	80% of maximal blow
<i>Pewetting</i>	0 cycles
<i>Change tips</i>	After 4 aspirations
<i>Special</i>	Dispense from top
<i>Volume</i>	8 μl

2.3.8.4 Quantitative PCR (qPCR, Standardprotokoll) und Analyse der Daten

Alle Reaktionen zur quantitativen Detektion von mRNAs wurden mit dem qPCR™ Core Kit +/- SYBR®Green I (Eurogentec, Seraing, Belgien) durchgeführt. Die Zusammensetzung des Reaktionsgemisches ist in der folgenden Tabelle für 384-well Platten aufgeführt. Der Lauf aller durchgeführten qPCRs wurde in einem 7900HT Thermocycler (Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland) durchgeführt. Die Auswertung aller durchgeführten RT-qPCR-Läufe erfolgte über die Software SDS 2.1 (Applied Biosystems).

Tabelle 2-16 Reaktionskomponenten der quantitativen PCR

Reaktionsansatz mit SYBR®Green I		Reaktionsansatz mit TaqMan®-Sonden	
Komponente	Konzentration	Komponente	Konzentration
10x PCR Puffer	1x	10x PCR Puffer	1x
MgCl ₂ (50 mM)	3 mM	MgCl ₂	3 mM
dNTPs (5 mM)	200 µM	dNTPs	200 µM
Hot Goldstar DNA Polymerase (5 Units/µl)	0,025 Units/µl	Hot Goldstar DNA Polymerase	0,025 Units/µl
<i>forward</i> Primer (10 µM)	200 nM	<i>forward</i> Primer	200 nM
<i>reverse</i> Primer (10 µM)	200 nM	<i>reverse</i> Primer	200 nM
SYBR® Green I (1:2000 in DMSO)	0,5 µl	TaqMan®-Sonde	125 nM
Verdünnte cDNA (oder non-RT)	2 µl	DMSO	5%
H ₂ O	<i>ad</i> 10 µl	Verdünnte cDNA (oder non-RT)	2 µl
		H ₂ O	<i>ad</i> 10 µl

Die Amplifikation von cDNA wurde in Triplikaten durchgeführt, die non-RTs wurden in Duplikaten bestimmt. Um Kontaminationen in jedem Lauf einer qPCR auszuschließen, wurde eine non-Template-Kontrolle, bestehend aus H₂O, in die Reaktion eingesetzt. Das in der qPCR verwendete Temperaturprofil ist in der folgenden Tabelle aufgeführt.

Tabelle 2-17 Temperaturprofil der qPCR

Zyklus	Temperatur	Zeit (sec)	Anzahl der Zyklus-Wiederholung
1. Hitzeaktivierung	95°C	600	} 1x
2. Denaturierung	95°C	15	
3. Annealing/Elongation	60°C	60	} 50x

In der PCR wurden für jedes Amplikon aufgereinigte PCR-Produkte als Standard mitgeführt, um die absolute Kopienzahl pro Reaktion errechnen zu können. Diese PCR-Produkte wurden mittels MinElute PCR Purification Kit (Qiagen) nach Angaben des Herstellers aufgereinigt. Der Standard wurde aus sechs seriellen 10-fach Verdünnungen in 10 mM Tris-HCL (pH 8,0), 10 ng/ml Poly (I) hergestellt, so dass in einer Reaktion 10¹–10⁶ Kopien vorlagen. Die Analyse der Daten erfolgte über die SDS 2.1 Software. Nach dem

2. Material und Methoden

qPCR-Lauf wurde über den mitgeführten passiven, internen Referenzfluoreszenzfarbstoff ROX die Reporterfluoreszenz normalisiert ($R_n = [\text{Reporter Signal}/\text{ROX}]$), um eventuelle Pipettier-Ungenauigkeiten zu korrigieren. Anschließend wurde die Basislinie definiert, welche der Hintergrund-Fluoreszenz entsprach. Die Hintergrundfluoreszenz wurde ebenfalls über ROX normalisiert und anschließend, wurde diese von R_n subtrahiert, wodurch man den ΔR_n -Wert erhielt.

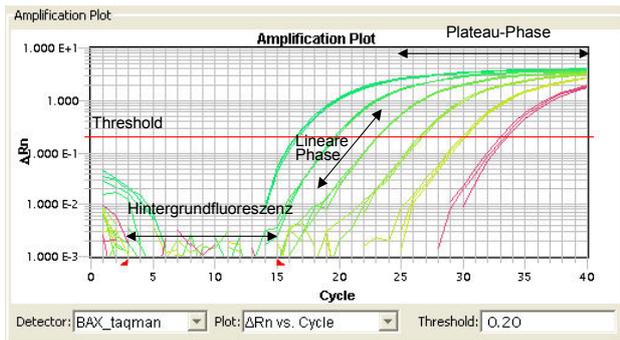


Abb. 2-4

Darstellung eines Amplifikationsplots nach der Vervielfältigung von verschiedenen Kopien eines DNA-Standards. Abgebildet ist die ΔR_n auf der y-Ordinate versus der Zyklus-Zahl auf der x-Ordinate.

In der oben dargestellten Abbildung wird exemplarisch ein Amplifikationsplot des BAX-Amplikons dargestellt. In der qPCR wurden verschiedene serielle Verdünnungen eines DNA-Standards (Abb. 2-5: 10^6 –10 Kopien, von links nach rechts) vervielfältigt. Die erhaltenen Ct-Werte wurden für die Erstellung einer Standardgeraden (Abb. 2-5) zur absoluten Quantifizierung verwendet. Die Basislinie wurde in diesem Fall vom 3. bis zum 15. Zyklus positioniert und wird durch die beiden roten Pfeile markiert. Nach der Basislinie wird der Schwellenwert festgelegt, welche in der Abbildung als rote Linie dargestellt wird. Diese Linie sollte ungefähr in der Mitte der linearen Phase der qPCR liegen, was hier einem ΔR_n -Wert von 0,2 entspricht. Der Ct-Wert entspricht demjenigen Zyklus, bei dem der ΔR_n -Wert den Schwellenwert durchbricht. Die Effizienz der qPCR (E) ergibt sich aus der Steigung der Standardgeraden und wurde über die Formel 2-2 berechnet:

Formel 2-2: $E = 10^{[-1/\text{Steigung}]}$

Die Ct-Werte amplifizierter Targets wurden anhand der mitgeführten Standardkurven in die absolute Kopienzahl transformiert.

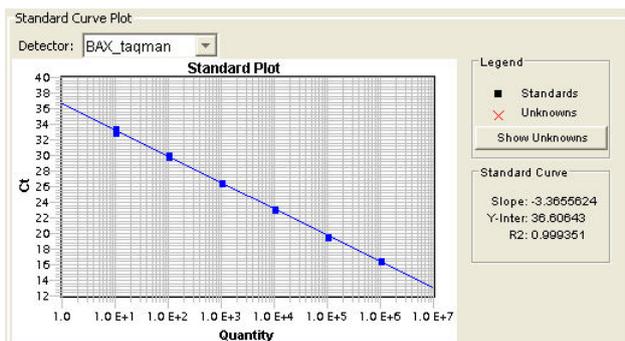


Abb. 2-5

Standardgerade zur absoluten Quantifizierung. Auf der y-Ordinate werden die in Abb. 2-4 dargestellten Ct-Werte abgebildet, auf der x-Ordinate wurden die eingesetzten Kopien-Zahlen aufgetragen.

2.3.8.5 Analyse von Schmelzprodukten

Die PCR-Produkte entwickelter Amplikons wurden über Schmelzkurven mittels SYBR®Green I untersucht. SYBR®Green I ist ein Fluoreszenzfarbstoff, der im Allgemeinen sequenzunabhängig an die kleine Furche von doppelsträngiger DNA bindet. Der gebundene Farbstoff fluoresziert etwa 1000x stärker als ungebundenes SYBR®Green I. Um die Schmelztemperatur zu ermitteln, wurde ein Temperaturprofil an den Lauf der qPCR angeschlossen, welches mit der Denaturierung bei 95°C für 15 sec begann. Anschließend wurde die Temperatur auf 60°C für 15 sec lang erniedrigt und graduell (2%ige Temperaturrampe) wieder auf 95°C erhöht. Die Schmelztemperatur, gekennzeichnet durch maximale Abnahme des Fluoreszenzsignals, wurde mit der Software SDS 2.1 ermittelt. Anhand der Schmelzkurve (Abb. 2-6) konnte untersucht werden, ob innerhalb der qPCR ungewünschte Primer-Dimere oder unspezifische Produkte gebildet wurden. Die Primer-Dimere interferieren mit der Bildung spezifischer PCR-Produkte und verfälschen somit die Messergebnisse. Das Amplikon des Target-Gens schmilzt in der Regel bei höheren Temperaturen als die Primer-Dimere.

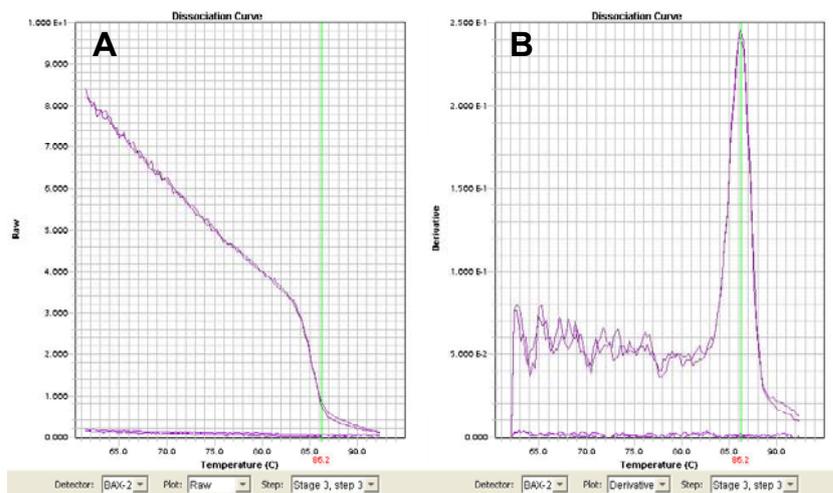


Abb. 2-6

Dissoziationskurven des BAX-Amplikons. Nach der qPCR wurden die PCR-Produkte aufgeschmolzen. In **A** wird die Abnahme der Fluoreszenz (*Raw*; y-Ordinate) bei einer Erhöhung der Temperatur (x-Ordinate) abgebildet. In **B** wird die Fluoreszenzänderung als Funktion der Temperatur ($-dF/dT$) dargestellt.

2.3.8.6 qPCR-Array

Zur Identifizierung Harnblasenkarzinom-spezifischer mRNAs wurde ein RT-qPCR-Array (RT² Profiler™ PCR Array Human cancer PathwayFinder™; SuperArray, Frederick, USA) durchgeführt. Der Array ermöglichte die gleichzeitige Detektion von 86 unterschiedlichen tumorrelevanten mRNAs im 96-well-Format. Hierfür wurde Gesamt-RNA aus 1,2 ml Gesamturin von vier gesunden Probanden und vier Patienten mit einem G1-Harnblasenkarzinom (Tabelle 2-18) anhand des Standardprotokolls präpariert.

2. Material und Methoden

Tabelle 2-18 Patienten-Auswahl für die Array-Analyse

	Patienten mit G1-Tumoren	Gesunde Spender
♂ (n)	2	3
♀ (n)	2	1
Alter, Median	68	61
Tumorgrad (n)	G1 (4)	-/-
Tumorstadium (n)	pTa (4)	-/-

Die Gesamt-RNA wurde anhand des Standardprotokolls in cDNA umgeschrieben, und das gesamte Volumen dieses Reaktionsansatzes (20 µl) wurde mit 80 µl H₂O verdünnt. In der unten aufgeführten Tabelle ist die Zusammensetzung der verwendeten qPCR-Mastermixe aufgeführt.

Tabelle 2-19 Zusammensetzung des Mastermixes für den qPCR-Array

Reaktionskomponente	Mastermix 1 (µl)	Mastermix 2 (µl)
H ₂ O	1703,75	191,3
10x PCR Puffer	235	25
dNTPs	94	10
MgCl ₂	141	15
Hot Gold Star DNA Polymerase	11,75	1,25
Sybr®Green I	70,5	7,5
cDNA	94	

Jeweils 25 µl des Mastermixes 1 wurden in die *wells* A1 bis H5 (siehe Abb. 2-7) pipettiert. Aus Mastermix 1 wurde mit dem Mastermix 2 eine serielle Verdünnungsreihe hergestellt (10⁻¹–10⁻⁶). Jeweils 25 µl der ersten 10-fach Verdünnung wurde in die *wells* H11 und H12 pipettiert, 25 µl der 2. bis 6. Verdünnungsstufe wurden in die *wells* H6 bis H10 pipettiert. Die Ct-Werte der Amplifikationen wurden über die Software SDS 2.1 berechnet. Außerdem wurden Schmelzkurvenanalysen zur Überprüfung auf das Vorliegen eines spezifischen PCR-Produktes hin überprüft. Zusätzlich wurden die PCR-Produkte der mRNAs mit hoher Abundanz anhand von einer Agarosegelelektrophorese analysiert. Über die folgende Formel wurde die relative Abundanz der mRNAs ermittelt.

Formel 2-3:
$$\text{relative Expression} = 2^{(Ct_{\text{Target Gen}})/2^{(Ct_{\text{housekeeping Gen}})}}$$

Da die Effizienz der einzelnen Amplifikationen nicht berechnet werden konnte, wurde eine Effizienz von 2 für alle Reaktionen festgelegt. Zur Normalisierung der Daten diente das *housekeeping* Gen GAPDH. Für die Festlegung geeigneter Tumormarker wurden lediglich Amplikons berücksichtigt, welche anhand der Dissoziationskurve und Agarosegelelektrophorese ein sauberes Produkt ergaben.

Die Belegung des Arrays mit den entsprechenden Primern, welche die entsprechenden mRNAs amplifizierten ist in der folgenden Abbildung dargestellt. Die untersuchten mRNAs werden von an der Transformation oder der Tumorigenese beteiligten Genen codiert. Die Gene können in 6 funktionelle Gen-Gruppen eingeteilt werden, welche durch einen bunten Farbcode unterhalb der Abbildung aufgeführt werden.

2. Material und Methoden

A1 AKT1	A2 ANGPT1	A3 ANGPT2	A4 APAF1	A5 ATM	A6 BAD	A7 BAX	A8 BCL2	A9 BCL2L1	A10 BRCA1	A11 CASP8	A12 CCNE1
B1 CDC25A	B2 CDK2	B3 CDK4	B4 CDKN1A	B5 CDKN2A	B6 CFLAR	B7 CHEK2	B8 COL18A1	B9 E2F1	B10 ERBB2	B11 ETS2	B12 FAS
C1 FGFR2	C2 FOS	C3 GZMA	C4 HTATIP2	C5 IFNA1	C6 IFNB1	C7 IGF1	C8 IL8	C9 ITGA1	C10 ITGA2	C11 ITGA3	C12 ITGA42
D1 ITGAV	D2 ITGB1	D3 ITGB3	D4 ITGB5	D5 JUN	D6 MAP2K1	D7 MCAM	D8 MDM2	D9 MET	D10 MMP1	D11 MMP2	D12 MMP9
E1 MTA1	E2 MTA2	E3 MTSS1	E4 MYC	E5 NFKB1	E6 NFKBIA	E7 NME1	E8 NME4	E9 PDGFA	E10 PDGFB	E11 PIK3R1	E12 PLAU
F1 PLAUR	F2 PNN	F3 RAF1	F4 RB1	F5 S100A4	F6 SERPINB5	F7 SERPINE1	F8 SNCG	F9 SYC	F10 TEK	F11 TERT	F12 TGFB1
G1 TGFB1	G2 THBS1	G3 TIMP1	G4 TIMP3	G5 TNF	G6 TNFRSF10B	G7 TNFRSF1A	G8 TNFRSF25	G9 TP53	G10 TWIST1	G11 UCC1	G12 VEGF
H1 18SrRNA	H2 HPRT1	H3 RPL13A	H4 GAPD	H5 ACTB	H6 ACTB	H7 ACTB	H8 ACTB	H9 ACTB	H10 ACTB	H11 ACTB	H12 ACTB

 Apoptose und Zellseneszenz	 Signaltransduktionsmoleküle und Transkriptionsfaktoren	
 Zellzyklus-Kontrolle und DNA-Reparatur	 Adhäsion	 Angiogenese
 Invasion und Metastasierung	 Housekeeping Gene	

Abb. 2-7 Plattenbelegung des qPCR-Arrays. Die Bezeichnungen relevanter Gene werden im Abkürzungsverzeichnis aufgeführt.

2.3.9 Verdünnungsexperimente zur Bestimmung möglicher inhibitorischer Effekte der RNA-Extrakte („spike-Experimente“)

Für die Quantifizierung der RNA_{LUC}-Ausbeute wurde RNA in Duplikaten aus Gesamturn präpariert (10 gesunde Spender: 5 ♂, 5 ♀; Alter, Median = 30 Jahre), und eine definierte Menge von RNA_{LUC} wurde an 2 verschiedenen Schritten des Protokolls hinzugefügt. Es wurden entweder 10⁷ Kopien von RNA_{LUC} direkt vor der RNA-Präparation (siehe Standardprotokoll, Abschnitt 2.3.7) oder 5x10⁵ Kopien direkt nach der RNA-Präparation hinzugefügt. Zusätzlich wurde die cDNA aus dem ersten *spike*-Experiment vor der qPCR Analyse mit Nuklease-freiem H₂O verdünnt. Fünf verschiedene serielle Verdünnungen (Verdünnungsfaktoren: 2,5; 7,5; 22,5; 67,5; 202,5) wurden hergestellt. Die RNA_{LUC}-Ausbeute wurde über Extrapolation zur eingesetzten Kopienzahl errechnet. Die RNA-Präparations-Prozedur sowie die Konditionen für Reverse Transkriptase-Reaktion und qPCR entsprachen dem Standardprotokoll.

2.3.10 MicroRNA-Analyse

Aufgrund der Tatsache, dass reife miRNAs nur eine Länge von 18–24 Nukleotiden aufweisen, bedarf es im Vergleich zu längeren mRNAs einer besonderen Präparations- und Quantifizierungs-Technik. Bei der Aufreinigung von Gesamt-RNA über eine Silica-Membran werden in der Regel nur Nukleinsäuren gebunden, welche länger als 200 Basen sind. Durch eine Erhöhung des Ethanol/Nukleinsäure-Verhältnis wird das Binden der

2. Material und Methoden

kleinen RNAs an die Silica-Membran ermöglicht. Zusätzlich verhindern modifizierte Waschpuffer das frühzeitige Eluieren gebundener RNA. Die RT-qPCR-basierte Detektion von miRNAs wurde ebenfalls modifiziert, so dass ein ausreichend großes Amplikon in der qPCR vorliegt, was ein Binden von Primern und Sequenz-spezifischen TaqMan®-*minor groove binder* (MGB) gewährleistet.

2.3.10.1 Präparation von miRNA aus Gesamturin sowie RT-PCR-Analyse

Die Präparation von Gesamt-RNA einschließlich miRNAs aus Gesamturin erfolgte anhand des miRNeasy-Kits (Qiagen). Die verwendeten Komponenten zur Präparation und Quantifizierung von miRNA aus Gesamturin werden in der unten aufgeführten Tabelle aufgelistet.

Tabelle 2-20 Verwendete Materialien zur Detektion von miRNAs

Schritt	Komponente	Hersteller
miRNA-Präparation	miRNeasy-Kit	Qiagen
	Homogenat Additiv	Ambion
	DNase I	Qiagen
miRNA RT-qPCR	TaqMan® MicroRNA Assays	Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland
Reverse Transkriptase Reaktion	TaqMan® MicroRNA Reverse Transcription Kit	Applied Biosystems
	RNase-Inhibitor	Applied Biosystems
	TaqMan® Universal PCR Master Mix	Applied Biosystems

Es wurden drei modifizierte Protokolle erstellt. Das Aufarbeitungsschema des Protokolls 1 wird in der Abb. 2-8 aufgeführt. Nach der Urinabgabe wurde Gesamturin durch GuSCN, wie unter 2.2.2 beschrieben, stabilisiert.

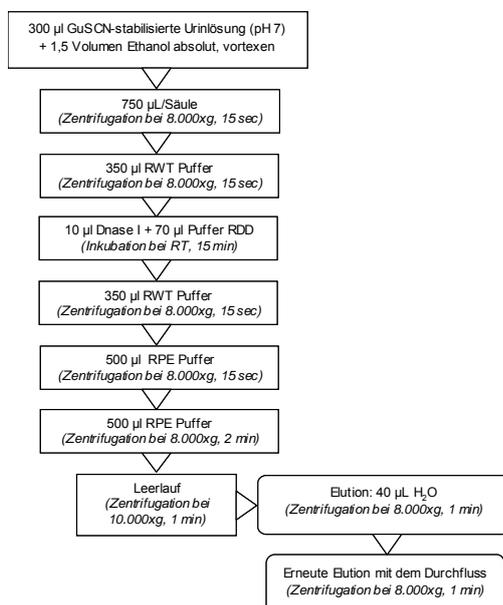


Abb. 2-8

Aufarbeitungsschema des Protokolls 1 zur Präparation von miRNA aus Gesamturin.

2. Material und Methoden

Für das Protokoll 2 und 3 wurde vor der Beladung der Silica-Membran mit der Probe eine Phenol-Chloroform-Aufreinigung durchgeführt. Hierfür wurden 300 µl der GuSCN-stabilisierten Urinlösung mit 1/10 Volumen miRNA-Homogenat-Additiv (Ambion) versetzt. Die Proben wurden gevortext und für 10 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde den Proben 1 Volumen saures Phenol-Chloroform hinzugefügt. Der Ansatz wurde 30–60 sec lang gevortext und darauf bei 16.000xg für 5 min bei RT zentrifugiert. Für das 3. Protokoll wurde nach der Extraktion mit Phenol-Chloroform zusätzlich 1 Volumen Chloroform zur wässrigen Phase gegeben, und die Proben wurden erneut gevortext und zentrifugiert. Dieser Schritt wurde eingeführt, um potentielle Phenol-Kontaminationen in der wässrigen Phase zu entfernen. Die obere, wässrige Phase wurde mit 1,5 Volumen Ethanol absolut vermischt und anschließend entsprach die weitere Aufarbeitung der des Protokolls 1, allerdings ohne DNA-Abbau auf der Säule. Dafür wurde ein Volumen von 700 µl RWT-Puffer einmalig auf die Säule gegeben. Von dem RNA-Extrakt wurden 5 µl in die Reverse Transkriptase-Reaktion (Tabelle 2-21, 2-22) eingesetzt.

Tabelle 2-21 Reaktionskomponenten der RT-Reaktion

Komponente	Konzentration, Volumen [Array]
dNTPs (100 mM)	0,15 µl
Multiscribe™ RT (50 U/µl)	50 Units
10x RT Puffer	1x
spezifischer Primer (5x)	1x**
RNase Inhibitor (20 U/µl)	0,19 µl
RNA-Extrakt	5 µl [1,3 µl]
Nuklease-freies H ₂ O	ad 15 µl

**Bei dem Array wurde anstelle des Primers H₂O in den Master-Mix gegeben, da dieser lyophilisiert in den einzelnen Vertiefungen der Platte vorlag.

Tabelle 2-22 Reaktionsbedingungen der RT-Reaktion

Schritt	Temperatur (°C)	Zeit (min)
1. Annealing	16	30
2. Transkription	42	30
3. Hitze-Inaktivierung	85	5

Für das Austesten der drei Protokolle wurden die Abundanzen von miR-16, miR-17-5p, miR-21 und RNU6B-RNA (U6-RNA) mittels RT-qPCR bestimmt (Tabelle 2-23). Die Laufbedingungen werden in der Tabelle 2-24 aufgeführt. Die Reaktionen wurden in einer 384-well PCR-Platte durchgeführt. Das Pipettieren der Proben wurde von dem Roboter durchgeführt. Alle weiteren Aufarbeitungen wurden unter Verwendung des Protokolls 3 durchgeführt. Es wurde außerdem anhand der Detektion von miR-16 untersucht, ob die mit dem Protokoll 3 hergestellten RNA-Extrakte von zwei verschiedenen Urinen inhibitorisch auf die nachfolgenden Enzymreaktionen wirken. Diesbezüglich wurden unterschiedliche Volumina des RNA-Extraktes (0,3; 1; 3, 5, 7 µl pro cDNA-Synthese) in die Reverse Transkriptase-Reaktion eingesetzt.

2. Material und Methoden

Tabelle 2-23 Reaktionskomponenten der quantitativen PCR

Komponente	Volumen (µl)
2x PCR Mastermix	10
Primer/Sonden-Mix (20x)	1x**
cDNA	1,33
Nuklease-freies H ₂ O	ad 20 µl

**Bei dem Array wurde anstelle der Primer und Sonde H₂O in den Master-Mix gegeben, da diese lyophilisiert in den einzelnen Vertiefungen der Platte vorlagen.

Tabelle 2-24 Reaktionsbedingungen für die PCR

Zyklus	Temperatur	Zeit (sec)	Zyklus-Wiederholung
1. Hitzeaktivierung	95°C	600	} 1x
2. Denaturierung	95°C	15	
3. Annealing/Elongation	60°C	60	} 40x

2.3.10.2 RT-qPCR-Array und Einzelanalyse ausgewählter miRNAs

Für die Detektion von 157 unterschiedlichen miRNAs wurde der „TaqMan® MicroRNA Assay, Human Panel– Early Access Kit“ miRNA-RT-qPCR Array (Applied Biosystems) angewendet. Zur Durchführung des Array-Experimentes wurde RNA aus jeweils 9 Urinen von 4 unterschiedlichen Patientengruppen untersucht. Darauf wurde die Abundanz der U6-RNA in 10 µl RNA-Extrakt bestimmt. Zur Berechnung der relativen U6-RNA-Abundanz wurde in jeder Patientengruppe die Probe mit dem kleinsten Ct-Wert der U6-RNA ausgewählt (Formel 2-4).

Formel 2-4: relative U6-RNA-Abundanz = $2^{-Ct_{Probe}} / 2^{-Ct_{minimal}}$

Die RNA-Extrakte von neun Urinen jeder Gruppe wurden vereinigt, indem gleiche U6-RNA-Mengen eingesetzt wurden (Tabelle 2-25).

Tabelle 2-25 Patienten-Auswahl für die Array-Analyse

Patientengruppe	♂ (n)	♀ (n)	Alter, Median	Tumorgrad, Tumorstadium (n)
Patienten mit G1-Tumoren	7	2	67	G1, pTa
Patienten mit G2- oder G-Tumoren	6	3	72	G2, pTa (2); G2, pT1 (2); G3, pTa (1); G3, pT1 (2); G3, pT2 (1); G3, pT3 (1)
Patienten mit Harnwegsinfektionen	1	8	76	-/-
Gesunde Spender	5	4	69	-/-

Das Volumen wurde mit H₂O auf 281 µl gebracht. Anschließend wurde ein Aliquot von einem µl abgenommen, und es wurde die U6-RNA-Abundanz in den vereinigten Proben vermessen. Auf diese U6-RNA-Menge wurden die Array-Daten normalisiert. Das restliche Volumen von 280 µl wurde in das Array-Experiment eingesetzt, wobei ein Master-Mix für

2. Material und Methoden

220 Proben für die Reverse Transkriptase-Reaktion hergestellt wurde (Tabelle 2-21). Dieser Mastermix wurde auf zwei 96-well-Platten verteilt, welche bereits die lyophilisierten Primer für die cDNA-Synthese von 157 unterschiedlichen miRNAs enthielten. Nach der Reversen Transkriptase-Reaktion wurden 1,33 µl der miRNA-spezifischen cDNA in die qPCR eingesetzt (Tabelle 2-23). Für die Auswertung der Array-Daten wurden alle möglichen miRNA-Ratios unter Verwendung der Formel 2-5 gebildet.

Formel 2-5: Target A/Target B = $2^{-\Delta Ct}$

In dieser Formel zur relativen Quantifizierung der RT-qPCR-Daten wird theoretisch angenommen, dass die PCR optimal abläuft und die Produkte nach jedem Zyklus verdoppelt werden, das heißt, die Effizienz der PCR gleich 2 ist. Außerdem wurde die relative Abundanz der miRNAs bestimmt, indem die Ct-Werte der detektierten miRNAs über die vor dem Array-Experiment ermittelte U6-RNA-Abundanz normalisiert wurde (Formel 2-6).

Formel 2-6: relative miRNA-Abundanz = $\frac{2^{\Delta Ct \text{ Target-miRNA (Ct Kontrollen - Ct Tumoren)}}}{2^{\Delta Ct \text{ U6-RNA (Ct Kontrollen - Ct Tumoren)}}$

Auf der Grundlage der Array-Daten wurden miRNAs (miR-126, miR-152, miR-182, miR-184, miR-199a, miR-203) für die Analyse in einzelnen Urinproben ausgewählt. Aus dem Array wurden die miRNAs für die Analyse in einzelnen Urinproben ausgewählt. Die Abundanz dieser miRNAs und der U6-RNA wurde in den 47 Urinproben der in der folgenden Tabelle aufgeführten Patienten mittels RT-qPCR nach dem im Abschnitt 2.3.10.1 beschriebenen Protokoll bestimmt. Die Auswertung der Daten erfolgte über die Formel 2-6.

Tabelle 2-26 Patienten-Auswahl für die Analyse der miRNA-Zusammensetzung in einzelnen Urinproben

Patientengruppe	♂ (n)	♀ (n)	Alter, Median	Tumorgrad, Tumorstadium (n)
Patienten mit G1-Tumoren	8	3	71	G1, pTa
Patienten mit G2- oder G-Tumoren	13	5	72	G2, pTa (6); G2, pT1 (5); G3, pTa (2); G3, pTis (1); G3, pT1 (1); G3, pT2 (2); G3, pT3 (1)
Patienten mit Harnwegsinfektionen	2	5	73	-/-
Gesunde Spender	8	3	69	-/-

2.4 Zellkultur

Das Arbeiten mit verschiedenen humanen Zelllinien wurde ausschließlich unter einer Steril-Werkbank ausgeführt. Die verwendeten Zellkulturmedien und Zellkulturflaschen werden in der folgenden Tabelle aufgeführt.

Tabelle 2-27 Verwendete Zellkulturmedien und Zellkulturzusätze

Zellkulturmedium und -Zusätze	Firma
Dulbecco's PBS (<i>Phosphate buffered saline</i>)	PAA, Pasching, Österreich
RPMI 1640 + 25 mM HEPES + L-Glutamin	PAA
Medium 199 + Earle's Salze + L-Glutamin	PAA
HAM'S F12 + Natriumbicarbonat, + L-Glutamin + HEPES	PAA
MEM nicht-essentielle Aminosäuren (NEA, 100x)	PAA
Humanes Insulin (10 mg/ml)	Roche, Mannheim, Deutschland
Fötales bovines Kälberserum Gold (FKS Gold)	PAA
0,4% Trypanblau-Lösung (in 0,81%NaCl, 0,06% Kalium-Phosphat)	Sigma-Aldrich
Natrium Pyruvat Lösung (100 mM)	PAA
10x Trypsin/EDTA (0,5/0,2%ig in 1x PBS ohne Ca ²⁺ /Mg ²⁺)	Linaris, Bettingen, Deutschland
Dimethylsulphoxid (DMSO) HYBRI-MAX®	Sigma-Aldrich
75 cm ² -Zellkulturflasche für adhärenente Zellen mit Filter	Sarstedt
12-well-Zellkulturplatten, Flachboden für adhärenente Zellen	Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland
96-well-Zellkulturplatten, Flachboden für adhärenente Zellen (weiss, transparent)	Greiner bio-one

Bei einer Konfluenz von etwa 80% wurden die Zellen umgesetzt. Dafür wurde der Zellkulturüberstand entfernt. Die Zellen wurden mit 1x PBS gewaschen und es erfolgte die Zugabe von 1x Trypsin/EDTA, so dass der Boden der Kulturflasche bedeckt war. Zur Ablösung wurden die Zellen bei 37°C für maximal 5 min inkubiert. Die Zellsuspension wurde in ein steriles Zentrifugenröhrchen überführt, und die Flasche wurde mit Zellkulturmedium gespült. Im Folgenden wurden die Zellen bei 400xg für 4 min zentrifugiert. Danach wurde der Überstand abgenommen, und das Pellet mit 1–3 ml Medium versetzt. Nach der Resuspension der Zellen wurde ein Aliquot der Zellsuspension in Trypanblau-Lösung verdünnt, und es wurde die Zellzahl in einer Neubauerzählkammer (0,100 mm Tiefe, 0,0025 mm²) mikroskopisch bestimmt. Die unterschiedlichen adhärenenten Zelllinien wurden, wie in der unten aufgeführten Tabelle angegeben, ausgebracht und kultiviert.

2. Material und Methoden

Tabelle 2-28 Verwendete Zelllinien und Wachstumsbedingungen

Zelllinie	Ursprungsgewebe/Herkunft	VZ ^A (h)	Kultivierung	ZZ ^B
ECV-304	Etabliert aus einem primären Harnblasenkarzinom (G3). In dem Tumor lag eine p53 Mutation vor. Derivat der Zelllinie T24.	ca. 25	Medium 199, 10% FKS	5x10 ⁵
LnCap	Etabliert aus Metastasen im linken supraclavikulären Lymphknoten eines Mannes mit einem Prostatakarzinom.	n.d.	90% RPMI 1640, 10% FKS,	
MCF-7	Etabliert aus einer pleuralen Effusion eines metastasierenden Brustkarzinoms.	ca. 71	90% RPMI 1640, 10% FKS, 1% Natriumpyruvat, 1x NEA, 10 µg/ml humanes Insulin	2x10 ⁶
PC-3	Post-Mortal etabliert aus Knochenmarkmetastasen eines schlecht differenzierten Prostatakarzinoms (<i>grade</i> 4). In dem Tumor lag eine p53 Mutation vor	n.d.	HAM's F12, 7% FKS	1x10 ⁴
RT-4	Etabliert aus einem gut differenzierten Harnblasenkarzinom (G1, T2)	ca. 38	RPMI 1640, 10% FKS	1x10 ⁶

^AVZ = Verdopplungszeit

^BZZ = Ausgebrachte Zellzahl pro 75 cm²-Flasche

Ein Medienwechsel erfolgte alle zwei Tage, umgesetzt wurden die Zellen abhängig von ihrer Verdopplungszeit. Die Kultivierung der Zellen erfolgte im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂ ohne Zusatz eines Antibiotikums. Eine Infektion der Zellkultur mit Mykoplasmen wurde durch die regelmäßige Durchführung des „VenorGeM® Mykoplasmen Detektions-Kit für konventionelle PCR“ (Minerva Biolabs, Berlin Deutschland) nach den Angaben des Herstellers ausgeschlossen. In der folgenden Tabelle werden die verwendeten Zellkulturmedien und Zusätze aufgeführt. Die Verdopplungszeit (VZ) wurde über die Formel 2-7 berechnet.

Formel 2-7: $VZ = \text{Wachstumszeit} / [\ln(\text{Zellzahl } t_x / \text{Zellzahl } t_0) / \ln 2]$

2.5 Suppression von mRNA mittels siRNA

2.5.1 Messenger RNA Strukturanalyse und Entwurf von siRNAs

Die mRNA-Sequenzen der Target-mRNA UPK1A und OP18 wurden in überlappende Fenster eingeteilt (11 Fenster für die 1730 Basen lange OP18 mRNA, 6 Fenster für die 1223 Basen lange für UPK1A mRNA). Die Fenster hatten eine Größe von 800 Nukleotiden und wurden schrittweise jeweils um 100 Nukleotide versetzt. Für jedes Fenster wurden 10 mRNA-Strukturen mit der geringsten freien Energie ($-\Delta G$) unter Verwendung der Software mfold 2.3 kalkuliert [86]. Die mfold-Analysen wurden von Michael Schütt durchgeführt, einem Mitarbeiter aus dem Institut für Molekulare Medizin. Als Target-Region wurden diejenigen Sequenzbereiche definiert, welche laut mfold mit hoher Wahrscheinlichkeit den größten ungepaarten Bereich besitzen [87]. Elbashir *et al.* beobachteten die effizienteste Hemmwirkung bei siRNAs, welche aus einem 21-Nukleotid langen *sense* und *antisense* Strang mit einem 2-Nukleotid-Überhang am 3'-Ende bestehen [88]. Daher wurden für jede

2. Material und Methoden

mRNA jeweils zwei geeignete, 21 bp lange, siRNAs mit 3'-TT-Überhängen entworfen, welche homolog zu diesen ungepaarten Sequenz-Bereichen waren. Des Weiteren wurde darauf geachtet, dass die Target-Region nicht im 5'-UTR liegt, damit eine Interferenz zwischen dem RISC-Komplex mit UTR-bindenden Proteinen sowie des Translationsinitiationskomplexes verhindert wird. Zur Vermeidung von *off-Target*-Effekte, wurden die ausgewählten siRNA-Sequenzen mit dem Programm *blastn* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>) auf Homologien zu bisher bekannten Nukleotidsequenzen untersucht. Als Kontrolle wurde in allen Experimenten eine *scramble*-siRNA (Kontroll-siRNA) ohne Zielsequenz in der Zelle in gleicher Konzentration verwendet, welche zusammen mit den 3'-TT-Überhängen 23 bp lang ist. Die Kontroll-siRNA wurde von Rosel Kretschmer-Kazemi Far aus dem Institut für Molekulare Medizin zur Verfügung gestellt. Die Sequenzen der getesteten siRNAs sind in der folgenden Tabelle aufgeführt. Bei dem Entwerfen einer gegen OP18 mRNA-gerichteten siRNA wurde die Transkriptvariante 1 (1730 Basen) als Vorlage genommen. Der Bereich zwischen der 299. bis 1712. Base ist homolog zu den Transkriptvarianten 2 und 3. Für die UPK1A mRNA ist nur eine Transkriptvariante bekannt, welche eine Länge von 1223 Basen aufweist.

Tabelle 2-29 Sequenzen eingesetzter siRNAs

siRNA	Target-mRNA (Accession No.)	siRNA-Sequenz des <i>sense</i> -Stranges (5'-3'-Richtung)	siRNA-Sequenz des <i>antisense</i> - Stranges (5'-3'-Richtung)
<i>siOP18-1</i>	OP18 (NM_203401)	AAAGACCCUGCUGACGAGAdtdt*	UCUCGUCAGCAGGGUCUUUdtdt
<i>siOP18-2</i>	OP18	ACGAGACUGAAGCUGACUAdtdt	UAGUCAGCUUCAGUCUCGUdtdt
<i>siUPK1A-1</i>	UPK1A (NM_007000)	AACAUACACACCCCGGACUdtdt	AGUCCGGGGUGUGUAUGUUdtdt
<i>siUPK1A-2</i>	UPK1A	ACACCCCGGACUCCUCCGCdtdt	GCGGAGGAGUCCGGGGUGUdtdt
<i>si-scr3</i>	Kontroll-siRNA	CGGACGCACUGGUCUGACCGGdtdt	CCGGUCAGACCAGUGCGUCCGGdtdt

*unterstrichene Bereiche markieren 2'-Deoxynukleotide im 3'-Überhang

Das *Annealing* von jeweils 20 μ M *antisense* und *sense* siRNAs erfolgte in 50 mM KOAc, 1 mM Mg(OAc)₂, 15 mM HEPES (pH 7,4) bei 90°C für 2 min und einer anschließenden Inkubation bei 37°C für 1 h. Die Herstellung der siRNAs-Doppelstränge wurde auf einem 15%igen, nativen Polyacrylamidgel überprüft. Die Nukleinsäuren wurden mittels Stains-All-Lösung gefärbt.

2.5.2 Standardprotokoll zur Transfektion von siRNAs

In der Tabelle 2-30 ist das Standardprotokoll für die Transfektion von siRNAs mittels Lipofectaminee 2000 in OPTI-MEM® I aufgeführt. Von der siRNA wurden zuerst verschiedene Konzentrationen ausgetestet (3, 30, 90 nM), wobei alle folgenden Transfektionen unter maximaler Hemmwirkung bei einer Konzentration von 30 nM durchgeführt wurden. Die Transfektion wurde über einen Zeitraum von 4 h durchgeführt, anschließend wurde der Transfektionsansatz abgenommen und durch Vollmedium ersetzt.

2. Material und Methoden

Bei einem mehrtägigen Untersuchungszeitraum wurde das Medium 2 Tage nach Transfektion durch frisches ersetzt. Im 96-well Format wurde jedoch nur die Hälfte (50 µl) des Mediums abgenommen und durch frisches Medium ersetzt.

Tabelle 2-30 Standardprotokoll zur Transfektion von siRNAs.

Schritt		Inkubationszeit (min, Temperatur)
1	OPTI-MEM I (Gibco) + 1/100 Lipofectamine 2000 (Invitrogen)	5, RT
2	Zugabe eines Volumens an OPTI-MEM + siRNA	20 min, RT
3	2-maliges (96-well: 1-maliges) Waschen der Zellen mit OPTI-MEM und Zugabe des Transfektionsansatzes:	
	25 cm ² Flasche: 2 ml	
	12-well Platte: 400 µl	4 h, 37°C (5% CO ₂)
	96-well Platte: 50 µl	

2.6 Charakterisierung siRNA-behandelter Zellen

2.6.1 Denaturierende SDS Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) sowie Nachweis spezifischer Proteine (Western-Blot)

Für den Nachweis von Proteinen wurde eine SDS-PAGE mit anschließendem Western-Blot durchgeführt. Für die Elektrophorese wurde ein vertikales Gelsystem verwendet. Das Gel setzte sich aus einem Sammelgel und einem Trenngel (siehe Tabelle 2-31) von jeweils 0,75 mm dicke zusammen.

Tabelle 2-31 Zusammensetzung des Trenn- und Sammelgels für 2 Polyacrylamidgele

Komponente	Trenngel (µl)	Sammelgel (µl)
H ₂ O	2000	4200
30% Acrylamidlösung	5333 (16%)	1000 (5%)
1,5 M Tris-HCL (pH 8,8)	2500	-/-
1 M Tris-HCL (pH 6,8)	-/-	760
10% (w/v) SDS	100	60
10% (w/v) APS	100	60
TEMED	8	6

Es erfolgte zuerst ein Vorlauf des Gels für 30 min bei 15 mA in 1x SDS-Laufpuffer. Die Proben wurden in dem denaturierenden 1x SDS-Probenpuffer bei 95°C für 5 min aufgekocht. Anschließend wurden die Proben bei 20.000xg für 1 min zentrifugiert, auf Eis gestellt und aufgetragen. Zusätzlich wurde ein Molekulargewichtsmarker (*Page Ruler Prestained Protein ladder*, MBI Fermentas) aufgetragen. Die Elektrophorese wurde bei 15 mA für 1,5 h durchgeführt. Darauf wurden die im Gel aufgetrennten Proteine auf eine PVDF-Membran übertragen. Hierzu wurde die PVDF-Membran (Immobilon-P, Millipore) vor dem Elektro-Blotten für 2 min mit Methanol aktiviert und anschließend im Transferpuffer für

2. Material und Methoden

15 min äquiliert. Außerdem wurden pro Gel 6 Whatman-Papiere (GB003, Schleicher & Schuell/Whatman GmbH, Dassel, Deutschland) für 15 min in Transferpuffer inkubiert. Das Gel wurde für etwa 1 min im Transferpuffer äquiliert. Die Membran und das Gel wurden zwischen jeweils 3 Whatman-Papiere gelegt und in die Blotting-Kammer positioniert, in welcher das *Semi-Dry* Elektro-Blotting bei $0,8 \text{ mA/cm}^2$ für 1,5 h durchgeführt wurde. Danach wurde die Membran für 1 h bei Raumtemperatur im Blocking-Puffer inkubiert. Es folgten ein dreimaliges Waschen für jeweils 5 min in 1x T-TBS und eine Inkubation mit dem Primär-AK (Tabelle 2-32) im Primär-Antikörper-Puffer über Nacht bei 4°C . Die Membran wurde erneut 3x mit T-TBS für jeweils 5 min gewaschen und mit dem Sekundär-AK (Tabelle 2-32) für 1 h bei RT inkubiert.

Tabelle 2-32 Verwendete Antikörper

Antikörper	Erzeuger-Tier	Verdünnung	Firma
Stathmin (OP18) polyklonaler Antikörper (AK)	Hase	1:1000 in PAP	Cell Signaling Technology, (New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main, Deutschland)
Beta-Aktin polyklonaler AK	Hase	1:1000 in PAP	Abcam (Acris Antibodies, Hiddenhausen, Deutschland)
HRP-konjugierter AK Ziege IgG anti-Hase IgG	Ziege	OP18: 1:2000 in BP β -Aktin: 1:4000 in BP	Dako (Glostrup, Dänemark)

Schließlich wurde die Membran 3x mit T-TBS für jeweils 5 min gewaschen und für 1 min mit Chemolumineszenzreagenz (1 Volumen Lösung I + 1 Volumen Reagenz II, Pierce, Thermo Scientific, Karlsruhe, Deutschland) inkubiert. Für die Detektion von Beta-Aktin wurde ein Film (HyperfilmTM ECL, Amersham Biosciences) für 15 sec exponiert, für die Detektion von OP18 wurde ein Film für 30 min exponiert und entwickelt. Außerdem wurde die Proteine über Nacht bei RT mit Coomassie angefärbt und anschließend mit Entfärbelösung entfärbt.

2.6.2 Mikroskopische Aufnahmen

Die Morphologische Charakterisierung der Zellen erfolgte über inverse Mikroskopie. Dafür wurden die Zellen entweder mit dem LD A-Plan 10x Objektiv (Kontrastierung: ph1) oder mit dem LD A-Plan 40x Objektiv (Kontrastierung: Ph2) 100-fach bzw. 400-fach vergrößert. Die Bilder wurden mit der Software AxioVision 4.1 LE (Zeiss) aufgenommen und digitalisiert.

Außerdem wurden inverse fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen zum Nachweis von Autophagosomen durchgeführt. Hierfür wurden 5.000 ECV-304-Zellen in eine Vertiefung eines Kammerdeckglases (*8-well chambered coverglasses*, NuncTM, Rochester, USA) ausgebracht und, wie unter 2.6 beschrieben, kultiviert. Nach 24 h erfolgte die Transfektion mit siRNAs nach dem Standardprotokoll. Am 3. Tag nach der Transfektion wurden die Zellen 2x mit OPTI-MEM I gewaschen und mit dem Autophagosomen-spezifischen Fluoreszenzfarbstoff Monodansylkadaverin ($50 \mu\text{M}$; Extinktion: 335 nm; Emission: 508 nm) sowie mit dem Fluoreszenzfarbstoff SYTO-16 ($25 \mu\text{M}$, Extinktion: 488 nm; Emission: 518

2. Material und Methoden

nm, Molecular Probes, Invitrogen) zur Anfärbung des Kerns für 15 min im Dunkeln bei 37°C, 5% CO₂ behandelt. Die Zellen wurden 5x mit OPTI-MEM I gewaschen, mit Medium überdeckt und unverzüglich untersucht. Die blaue Fluoreszenz von MDC wurde zur deutlicheren Erkennung hinter dem dunklen Hintergrund über die das Programm AxioVision 4.1 LE durch ein rotes Farbsignal ersetzt.

2.6.3 Bestimmung der Zellviabilität anhand des MTS-Assays

Die Zellviabilität von ECV-304-Zellen wurde an verschiedenen Zeitpunkten (1, 2, 3, 4 Tage) nach der Transfektion mit siRNAs gegen OP18 mRNA, UPK1A mRNA sowie der Kontroll-siRNA im 96-*well*-Format bestimmt. Um zu überprüfen, welche Zelldichten im linearen Bereich des Assays liegen, wurden die ECV-304-Zellen zuerst in unterschiedlicher Dichte (300, 1.000, 3.000, 10.000, 20.000 Zellen) in eine Vertiefung einer 96-*well*-Platte ausgebracht. Nach 24 h wurde der MTS-Assay (Tabelle 2-33) durchgeführt. MTS [3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-Carboxymethoxyphenyl)-2-(4-Sulfophenyl)-2H-Tetrazoliumsalz] ist eine gelbe, lösliche Verbindung, welche durch mitochondriale Succinatdehydrogenasen in lebenden Zellen zu einem magentafarbenen Formazansalz umgesetzt wird. Dabei ist die Menge an gebildetem Farbstoff proportional zur Zellviabilität. In der unten aufgeführten Tabelle sind die Reagenzien des MTS-Assays aufgelistet. Die MTS-Lösung wurde mit einer Konzentration von 1,9 mg/ml PBS und 0,044 mg PMS (Phenazin-Methosulfat) pro ml PBS angesetzt (pH 6,2) und anschließend steril filtriert. Für die Durchführung des Assays wurde das Zellkulturmedium abgenommen und durch 100 µl MTS-Medium ersetzt. Das MTS-Medium setzte sich aus 16,7 µl der MTS-Lösung, 75 µl RPMI 1640 und 8,3 µl FKS zusammen. Anschließend wurden die Zellen für 2,5 h bei 37°C (5% CO₂) inkubiert. Die Intensität des Farbumschlags wurde bei einer Wellenlänge von 490 nm in einem ELISA-Reader vermessen. Die Hintergrund-Absorption (MTS-Medium ohne Zellen) wurde von jedem Ansatz subtrahiert.

Tabelle 2-33 Reaktionskomponenten für den MTS-Assay

Medium, Reagenz	Hersteller
RPMI 1640 ohne Phenolrot, mit L-Glutamin	PAA
CellTiter 96® AQueous MTS Reagent Powder (Owen's Reagenz), 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-Carboxymethoxyphenyl)-2-(4-Sulfophenyl)-2H-Tetrazolium	Promega
Phenazin-Methosulfat	Sigma-Aldrich

2.6.4 Nachweis von Apoptose

Der Nachweis von Apoptose erfolgte über die Caspase 3/7-Aktivität unter Verwendung des Caspase Glo 3/7 Substrats (Promega). Um zu überprüfen, ob Caspase 3/7 Aktivität anhand dieser Methode nach der Induktion von Apoptose in ECV-304-Zellen gemessen

2. Material und Methoden

werden kann, wurden die Zellen in unterschiedlicher Dichte (250, 2.500, 5.000, 10.000, 20.000 Zellen) in eine Vertiefung einer weißen 96-well Platte ausgebracht. Nach circa 18 h wurden die Zellen mit Staurosporin (1 μM) über einen Zeitraum von 24 h behandelt (Duplikate). Als Positiv-Kontrolle für den Apoptose-Nachweis wurden ECV-304-Zellen verwendet, welche in Serum-depletiertem Medium (1% FKS) mit einer Konzentration von 1 μM Staurosporin über einen Zeitraum von 24 h inkubiert wurden [89]. Im Kontroll-Ansatz wurden die Zellen in 2 Parallel-Ansätzen mit Medium inkubiert. Anschließend wurden 50 μl des Zellkulturüberstands durch 50 μl Caspase 3/7-Glo-Substrat ersetzt. Die Platte wurde für 15 sec bei 300 rpm geschüttelt, und es folgte eine Inkubation im Dunkeln bei RT über einen Zeitraum von 1,5 h. Anschließend wurde die Biolumineszenz mit einem Fluorometer (LabSystems Fluoroscan Ascent) gemessen. Bei der Messung wurde eine Kontrolle ohne Zellen mitgeführt, die nur Medium und das Caspase Substrat enthielt. Die daraus resultierende Hintergrund-Biolumineszenz wurde von den Messdaten subtrahiert.

Um OP18- und UPK1A-siRNA behandelte ECV-304-Zellen auf die Aktivierung von Caspase 3/7 hin zu untersuchen, wurden 4.000 ECV-304-Zellen in eine Vertiefung einer 96-well Platte aus weißem Kunststoff ausgebracht. Die entsprechenden siRNAs sowie eine Kontroll-siRNA wurden ca. 18 h nach der Aussaat nach dem Standardprotokoll transfiziert. Nach 2 Tagen wurden 50 μl des Zellkulturüberstandes abgenommen und durch frisches Medium ersetzt. Die Messung der Caspase 3/7-Aktivität erfolgte 3 und 4 Tage nach der Transfektion, indem zuerst die Zellviabilität anhand einer FDA-Messung bestimmt wurde. Für diese Messung wurden 55 μl des Zellkulturüberstandes abgenommen und es folgte die Zugabe von 5 μl FDA (200 μM FDA in Medium) auf Eis. Die Platte wurde für 15 sec bei 300 rpm geschüttelt und anschließend wurde die Fluoreszenzzunahme in einem Fluorometer über einen Zeitraum von 20 min bei einer Extinktion von 485 nm und einer Emission von 538 nm gemessen. Die Steigung des linearen Anstiegs der Fluoreszenz in den ersten Minuten der Messung wurde berechnet, welche für die Normalisierung der Caspase Aktivität auf die Zellviabilität verwendet wurde. Nach der FDA-Messung wurden 50 μl Caspase 3/7-Glo-Substrat zu den Zellen gegeben und die Caspase-Aktivität wurde wie oben beschrieben nach 1,5 h bestimmt. Die gemessene Caspase 3/7-Aktivität wurde durch die FDA-Messung auf die Zellviabilität normalisiert.

2.6.5 Chemosensibilisierung siRNA-behandelter Zellen

3000 ECV-304-Zellen wurden in eine Vertiefung einer 96-well Platte ausgebracht und nach 24 h mit siRNA nach dem Standardprotokoll (Tabelle 2-30) transfiziert. Außerdem wurde ein Ansatz mit Zellen mitgeführt, welche bei der Transfektion nur mit Lipofectamine 2000 in OPTI-MEM I ohne Nukleinsäuren behandelt wurden. Nach weiteren 48 h wurden die Zellen mit unterschiedlichen Konzentrationen an Cisplatin (0, 1, 3, 6, 9, 12 $\mu\text{g}/\text{ml}$) behandelt. Hierfür wurde das Medium komplett abgenommen und durch \pm Cisplatin-haltiges Medium ersetzt. Es folgte eine Inkubation über einen Zeitraum von 24 h. Anschließend wurde die Zellviabilität anhand der Inkubation mit MTS über einen Zeitraum von 2,5 h bestimmt.

2.7 Datenanalyse und statistische Auswertung

Tabelle 2-34 Verwendete Programme für die Analyse erhobener Daten

Programme	Hersteller
Sigma Plot 2000 für Windows, Version 6.0	SPSS Science Software GmbH, Erkrath, Deutschland
SPSS (Statistical Package for the Social Sciences) Version 13.0	SPSS GmbH Software, München, Deutschland

Die Verteilung von RNA-Tumormarker Ratios innerhalb untersuchter Patientenproben wurde unter anderem in einem Box-Plot dargestellt. Der Box-Plot besteht aus einer Box, welche vom ersten und dritten Quartil (25. und 75. Perzentil) begrenzt wird. Die Linie innerhalb der Box repräsentiert den Median. Die Fehlerbalken begrenzen das 10. und 90. Perzentil. Außerdem werden außerhalb dieser Perzentilen liegende Werte durch ein Symbol dargestellt.

Der nicht-parametrische Krustal-Wallis Test wurde angewendet, um Unterschiede in den mRNA-Tumormarker Ratios zwischen den einzelnen Harnblasenkarzinomgruppen (gruppiert nach dem Tumorgrad oder dem Tumorstadium) zu untersuchen.

Die Unterschiede dieser Tumormarker in Urinproben von gesunden Patienten und solchen von Harnblasenkarzinompatienten wurden auf statistische Signifikanz hin unter Verwendung des nicht-parametrischen Mann-Whitney-U-Tests untersucht. Nicht-parametrische Tests wurden immer dann angewendet, wenn die Annahme der Normalverteilung der Daten nach der Analyse mit dem Kolmogorov-Smirnov-Test nicht aufrechterhalten werden konnte. Dabei besteht eine Abweichung in der Normalverteilung, wenn die Irrtumswahrscheinlichkeit $p < 0,05$ ist.

Um die diagnostische Aussagekraft der untersuchten RNA Tumormarker Kombinationen zu untersuchen, wurden *Receiver Operating Characteristic* (ROC) Kurven unter Verwendung der Software SPSS angefertigt. Mit dieser Auswertung kann die diagnostische Aussagekraft eines Tumormarkers untersucht werden. In einer ROC-Kurve repräsentiert jeder einzelne Datenpunkt einen möglichen Schwellenwert, da die Sensitivität (richtig-positive, y-Ordinate) zum Komplementärwert der Spezifität (falsch-positive, x-Ordinate) aufgetragen ist. Je größer die Fläche unter der Kurve ist (*area under the curve*, AUC), desto größer ist die diagnostische Aussagekraft des analysierten Tumormarkers. Wenn ein Tumormarker keine diagnostische Aussagekraft besitzt, nähert sich die ROC-Kurve der Diagonalen und weist eine AUC von etwa 0,5 auf.

Für den Vergleich der RNA_{LUC}-Ausbeuten und den Vergleich von *housekeeping*-Gen-Ratios an verschiedenen Tageszeiten wurde der nicht-parametrische Wilcoxon-Test angewendet.

Die Korrelationsanalysen verschiedener Urin-assoziiertes mRNAs wurden anhand des Korrelationskoeffizientens nach Spearman untersucht. Die Korrelationsanalysen verschiedener mRNAs nach siRNA-vermittelter Suppression der UPK1A mRNA und OP18 mRNA *in vitro* wurden anhand des Korrelationskoeffizientens nach Pearson untersucht.

2. Material und Methoden

Für einen Vergleich der Zellviabilität oder der Caspase 3/7 Aktivität in UPK1A- bzw. OP18-siRNA behandelten ECV-304 Zellen im Vergleich zur Kontrolle wurde der Student's t-Test angewendet.

Wenn die Irrtumswahrscheinlichkeit $p \leq 0,05$ war, wurde das Ergebnis des durchgeführten Tests als statistisch signifikant angesehen und mit einem "*" für "signifikant" markiert. Eine Irrtumswahrscheinlichkeit von $p \leq 0,01$ (sehr signifikant) wurde durch "**" angezeigt, und eine Irrtumswahrscheinlichkeit von $p \leq 0,001$ (höchst signifikant) wurde durch "***" markiert.

3 Ergebnisse

Das Hauptziel der vorliegenden Arbeit bestand darin, RNA-basierte Tumormarker im Urin von Patienten mit einem Harnblasenkarzinom zu suchen und hieraus anschließend ein neuartiges Diagnoseverfahren für Harnblasenkarzinome zu entwickeln. Hierdurch sollte eine nicht-invasive, sensitive und spezifische Tumordiagnostik ermöglicht werden.

Da reife microRNAs (miRNAs) gegenwärtig als vielversprechende Marker für normales bzw. malignes Zellwachstum gelten, wurden im Rahmen dieser Arbeit zunächst miRNAs untersucht. Reife miRNAs haben wegen ihrer geringen Größe von nur 18 bis 25 Nukleotiden im Vergleich zu langen mRNAs den Vorteil, weniger anfällig gegenüber Degradation zu sein. Insbesondere im Urin sollte dies ein robusteres Nachweisverfahren gegenüber länger-kettigen RNA-Molekülen ermöglichen.

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurde die diagnostische Aussagekraft von miRNAs mit länger-kettigen *messenger* RNA-Fragmenten verglichen. Zusätzlich wurden Zellkulturexperimente zur tumorbiologischen Charakterisierung ausgewählter mRNAs durchgeführt.

3.1 Analyse von miRNAs im Urin von Harnblasenkarzinompatienten

Aus einer Studie von Lu *et al.* geht hervor, dass Tumoren anhand der miRNA-Expressions-Signatur sehr genau klassifiziert werden können, wodurch diese überaus informativ für die Tumordiagnostik sind [59]. Da diese Untersuchungen auf der Grundlage von Tumorgewebe durchgeführt wurden, ergab sich die Frage, ob solche miRNAs auch in nicht-invasiv gewonnenem Probenmaterial -Urin- nachzuweisen sind und ob bei Harnblasenkarzinompatienten die Zusammensetzung von miRNAs im Urin unterschiedlich zu gesunden Spendern ist. Hierzu musste zuerst untersucht werden, ob miRNAs aus dem Urin präpariert und über RT-qPCR detektiert werden können. Zunächst sollten einige in Tumoren überexprimierte miRNAs untersucht werden. Nach erfolgreicher Quantifizierung Urin-assoziiierter miRNAs sollte anhand eines RT-qPCR-Arrays ein großes Set von verschiedenen miRNAs im Urin sowohl von Harnblasenkarzinompatienten als auch von Harnwegsinfektionspatienten und gesunden Spendern untersucht werden. Schließlich sollten differentiell detektierbare miRNAs in einer größeren Anzahl an Proben auf eine mögliche diagnostische Relevanz hin untersucht werden.

3.1.2 Methodologie zur Detektion von miRNAs im Urin

Zuerst wurde untersucht, ob miRNAs aus Gesamturin präpariert und über RT-qPCR nachgewiesen werden können. Die Präparation von Gesamt-RNA einschließlich miRNAs aus Gesamturin erfolgte anhand des miRNeasy-Kits (Qiagen). Es wurden drei modifizierte

3. Ergebnisse

Protokolle für die RNA-Präparation erstellt, welche im Material und Methoden Teil dieser Arbeit beschrieben werden (Abschnitt 2.3.10.1). Für das Protokoll 1 wurden GuSCN-stabilisierte Urinproben mit Ethanol versetzt und für die weitere Aufreinigung über eine Silica-Membran aufgereinigt. Für das Protokoll 2 wurde die RNA zuerst aus den GuSCN-stabilisierten Urinproben mittels Chloroform-Phenol extrahiert, mit Ethanol versetzt und auf die Silica-Membran der Aufreinigungssäule gegeben. Das Protokoll 3 unterschied sich insofern von dem Protokoll 2, als dass eine zusätzliche Extraktion mit Chloroform durchgeführt wurde. Dieser Schritt wurde eingeführt, weil mögliche Phenol-Kontaminationen zur Inhibierung der nachfolgenden Enzymreaktionen führen können. Anhand der Präparationsprotokolle wurde Gesamt-RNA inklusive miRNA aufgereinigt. Das spezielle Anreicherungsprotokoll für miRNA wurde nicht verwendet, weil eine selektive Anreicherung sequenzspezifischer miRNAs nicht ausgeschlossen werden konnte. Nach der RNA-Präparation wurden miR-16, miR-17-5p, miR-21 sowie RNU6B-(U6)-RNA über RT-qPCR detektiert (Abb. 3-1 A und B).

MiR-17-5p und miR-21 wurden ausgewählt, da Volinia *et al.* zeigen konnten, dass diese miRNAs in 5 bzw. 6 von insgesamt 6 untersuchten Tumorentitäten überexprimiert wurden [60]. Diese Beobachtung deutet darauf hin, dass diese miRNAs in fundamentale Signalwege verschiedener Tumoren involviert sind. Beispielsweise ist der Tumorsuppressor *PTEN* ein direktes Target von miR-21 [90]. MiR-16 wurde ausgewählt, weil die Expression vielen verschiedenen Geweben sehr hoch ist [91]. Die U6-RNA wurde zur Normalisierung der miRNA-Expressionen ausgewählt. Aus der Abb. 3-1 geht hervor, dass alle der ausgewählten miRNAs und die U6-RNA in den Urinproben der beiden Harnblasenkarzinompatienten detektiert werden konnten. Die ausgewählten RNAs zeigten die höchste Abundanz im Urin des Patienten mit einem G3-Harnblasenkarzinom. MiR-16 und miR-21 wiesen im Urin der beiden Patienten die höchste Abundanz von allen detektierten miRNAs auf. Die geringste Abundanz wies die U6-RNA auf.

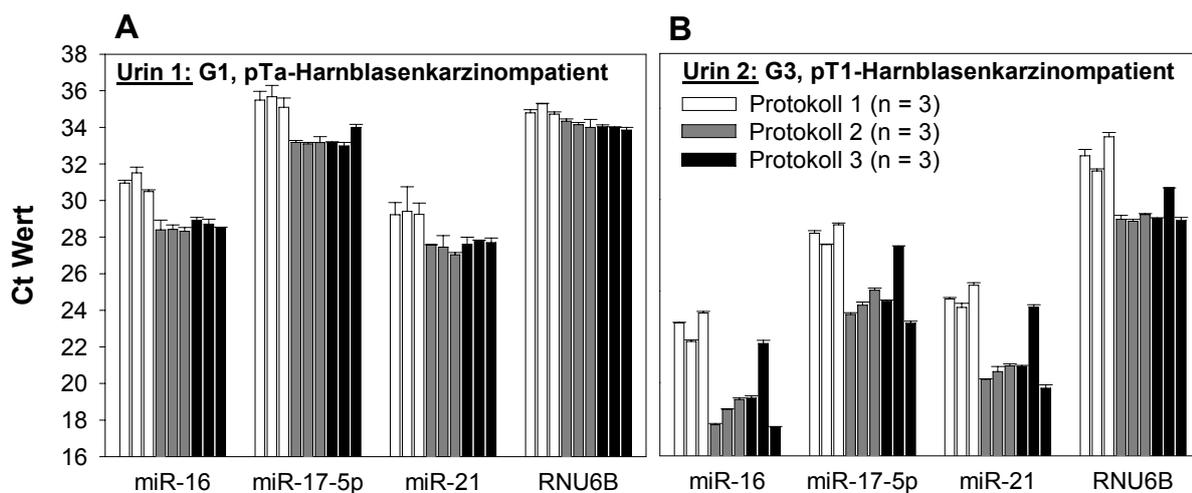


Abb. 3-1 Vergleich verschiedener Protokolle zur Präparation von miRNAs. RNA wurde aus Gesamturin von zwei Patienten mit einem Harnblasenkarzinom präpariert (Abb. A = Patient 1, Abb. B = Patient 2). Hierbei wurden 3 verschiedene Protokolle (1–3) angewendet. Die angegebenen miRNAs sowie die U6-RNA wurden nach Aufreinigung in Duplikaten mittels RT-qPCR bestimmt.

3. Ergebnisse

Die Intra-Assay-Varianz (Varianz zwischen Duplikaten der qPCR) war für das Protokoll 1 am höchsten ($CV_{\text{Intra-Assay}} = 0,923\%$). Für das Protokoll 2 lag der $CV_{\text{Intra-Assay}}$ bei 0,651%. Am geringsten war der $CV_{\text{Intra-Assay}}$ für das Protokoll 3 (0,473%), was möglicherweise auf die zusätzliche Extraktion mit Chloroform zurückgeführt werden kann. Die Aufarbeitung ohne eine vorherige Phenol-Chloroform-Extraktion (Protokoll 1) führte insgesamt zu einer geringeren Abundanz untersuchter miRNAs, so dass die Ct-Werte in diesen Ansätzen höher waren. Das Protokoll mit vorheriger Phenol-Chloroform-Extraktion der Urinproben (Protokoll 2) erwies sich als am Robustesten. Der über alle vier miRNAs gemittelte Variationskoeffizient für die dreifache RNA-Präparation und -Quantifizierung ($CV_{\text{Inter-Assay}}$) betrug für dieses Protokoll 0,463% (Patient 1) bzw. 2,240% (Patient 2). Eine zusätzliche Chloroform-Extraktion (Protokoll 3) führte vor allem bei der 2. Patientenprobe teilweise zu großen Abweichungen zwischen den drei RNA-Präparationen (Patient 1: $CV_{\text{Inter-Assay}} = 0,752\%$; Patient 2: $CV_{\text{Inter-Assay}} = 8,638\%$). Für alle Protokolle war die Inter-Assay-Varianz für die 2. untersuchte Patientenprobe höher (Tabelle 3-1).

Für die weiteren Untersuchungen wurde das Protokoll 2 ausgewählt.

Tabelle 3-1 Technische Charakteristika des miRNA-Präparations- und Quantifizierungs-Systems

Detektierte RNA	Intra-Assay CV (%)			Intra-Assay CV (%)			Inter-Assay CV (%)			Inter-Assay CV (%)		
	Patient 1			Patient 2			Patient 1			Patient 2		
	RNA-Präparationsprotokoll 1	1	2	RNA-Präparationsprotokoll 1	2	3	RNA-Präparationsprotokoll 1	2	3	RNA-Präparationsprotokoll 1	2	3
U6-RNA, Extraktion 1	0,509	0,396	0,303	1,077	0,756	0,140	0,888	0,488	0,290	2,890	0,651	3,383
U6-RNA, Extraktion 2	0,043	0,333	0,160	0,354	0,340	0,015						
U6-RNA, Extraktion 3	0,347	1,305	0,449	0,690	0,183	0,546						
miR-16, Extraktion 1	0,509	1,919	0,556	0,150	0,397	0,620	1,656	0,177	0,693	3,431	3,771	11,877
miR-16, Extraktion 2	1,016	0,846	0,922	0,443	0,047	0,829						
miR-16, Extraktion 3	0,341	0,710	0,096	0,399	0,514	0,335						
miR-17-5p, Extraktion 1	1,357	0,327	0,172	0,509	0,382	0,289	0,831	0,142	1,632	1,930	2,745	8,632
miR-17-5p, Extraktion 2	1,722	0,255	0,600	0,106	0,716	0,125						
miR-17-5p, Extraktion 3	1,437	1,000	0,477	0,365	0,458	0,462						
miR-21, Extraktion 1	2,289	0,028	1,420	0,330	0,118	0,359	0,338	1,047	0,392	2,472	1,792	10,658
miR-21, Extraktion 2	4,560	2,285	0,066	0,921	1,366	0,523						
miR-21, Extraktion 3	2,111	0,463	0,942	0,560	0,480	0,944						

Zur weiteren Charakterisierung der Robustheit des ausgewählten Präparationsprotokolls 2 sollte untersucht werden, ob möglicherweise inhibitorische Substanzen aus dem Urin mitaufgereinigt werden. Derartige Substanzen sind störend, weil die Effizienz nachfolgender Enzymreaktionen beeinträchtigt und dadurch die tatsächliche Abundanz der untersuchten miRNA verfälscht werden kann. Zur Erkennung inhibitorischer Effekte wurden

3. Ergebnisse

verschiedene Volumina der präparierten RNA-Extrakte in die Reverse Transkriptase-Reaktion eingesetzt. Anschließend wurde miR-16 mittels qPCR detektiert (Abb. 3-2). Aus den Amplifikations-Effizienzen, welche über die Steigung der Geraden berechnet wurden, lassen sich mögliche inhibitorische Effekte ableiten. Die Amplifikation von der hier untersuchten miR-16 würde bei einer Effizienz von 2 optimal verlaufen. Da aus den Verdünnungsreihen der RNA-Extrakte Effizienzen von 2,03 (Patient 1) und 1,95 (Patient 2) berechnet wurden, kann davon ausgegangen werden, dass die RT-qPCR nicht oder nur minimal (Patient 2) durch inhibitorische Substanzen aus dem Urin beeinträchtigt wurde. Zudem wichen die einzelnen Messpunkte nur geringfügig von der Ausgleichsgeraden ab, was an den Regressionskoeffizienten für die beiden Geraden abgelesen werden kann ($r^2_{\text{Patient 1}} = 0,9984$; $r^2_{\text{Patient 2}} = 0,9944$). Dementsprechend wurde die Quantifizierung von miRNAs nicht von dem Volumen des eingesetzten RNA-Extraktes beeinflusst.

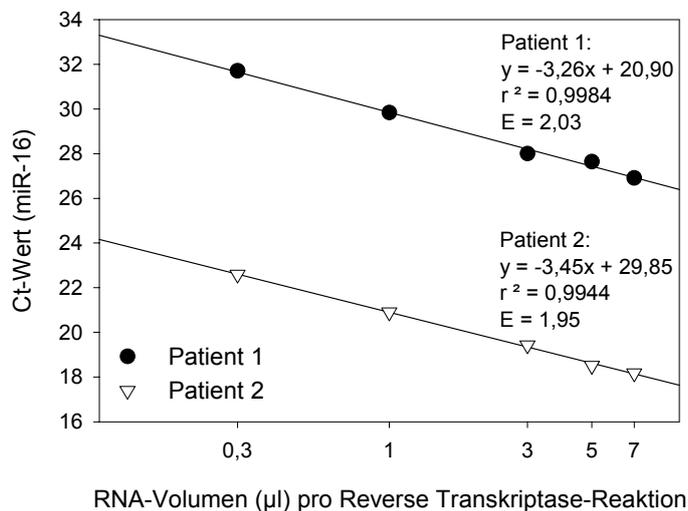


Abb. 3-2

RT-qPCR-basierte Detektion von miR-16 im Gesamturin von zwei Harnblasenkarzinompatienten. In die Reverse Transkriptase Reaktion wurden unterschiedliche Volumina (0,3, 1, 3, 5 und 7 µl, logarithmisch auf der x-Ordinate dargestellt) RNA-Extrakt eingesetzt. Die gemittelten Ct-Werte aus den Duplikaten der qPCR sind auf der y-Ordinate dargestellt. Der Regressionskoeffizient (r^2) und die Effizienz (E) der Ausgleichsgeraden wird jeweils unter der Geradengleichung angegeben.

3.1.3 RT-qPCR-Array-basierte Analyse der miRNA-Zusammensetzung im Urin von Harnblasenkarzinompatienten

Das aufgestellte Protokoll für die Präparation von miRNAs aus Gesamturin wurde im Folgenden zur näheren Untersuchung der Zusammensetzung der miRNAs im Urin von Harnblasenkarzinompatienten eingesetzt. Als Methodenplattform zur Erstellung von miRNA-Expressionsmustern wurde ein kommerzieller RT-qPCR-Array verwendet (TaqMan® MicroRNA Assay, Human Panel – Early Access Kit, Applied Biosystems). Anhand des Arrays sollten Urinproben von 4 unterschiedlichen Patientengruppen untersucht werden: 1. G1-Harnblasenkarzinompatienten, 2. G2-, G3-Harnblasenkarzinompatienten, 3. Patienten mit einer Harnwegsinfektion, 4. gesunde Spender. Hierzu wurde RNA aus jeweils neun verschiedenen Urinproben der ausgewählten Patientengruppen präpariert. Zur Normalisierung wurde in den Proben die

3. Ergebnisse

Menge an U6-RNA über RT-qPCR bestimmt. Anschließend wurden die neun RNA-Extrakte einer Gruppe vereinigt, indem von jedem RNA-Extrakt gleiche Mengen der U6-RNA eingesetzt wurden. Dabei war der RNA-Extrakt mit der geringsten U6-RNA-Menge determinierend.

Anschließend wurden 157 verschiedene miRNAs über RT-qPCR im Rahmen des Arrays detektiert. Die aus dem Array-Experiment resultierenden Ct-Werte wurden über die U6-RNA Menge normalisiert, welche vor dem Experiment in den vereinigten RNA-Extrakten der vier Gruppen bestimmt wurde (Abb. 3-3 A). Dadurch konnten die relativen Abundanzen der miRNAs bezogen auf die Kontroll-Urine bestimmt werden (siehe Anhang, Tabelle 7-1). Zur weiteren Untersuchung wurden miRNAs ausgewählt, die eine höhere Abundanz bei Harnblasenkarzinompatienten als bei Patienten mit einer Harnwegsinfektion oder gesunden Spendern aufwiesen (Abb. 3-3). Diese miRNAs (miR-126, miR-182 und miR-199a) wurden als potentielle tumorrelevante miRNAs betrachtet. Zusätzlich wurde miR-152 ausgewählt, da diese in Kontroll-Urinen und im Urin von Tumorpatienten eine vergleichbare Abundanz aufwies und zudem im Urin von Patienten mit Infektionen nicht detektiert wurde. MicroRNA-203 lag in allen untersuchten Gruppen mit vergleichbarer Abundanz vor und wurde wie miR-152 zur Normalisierung ausgewählt.

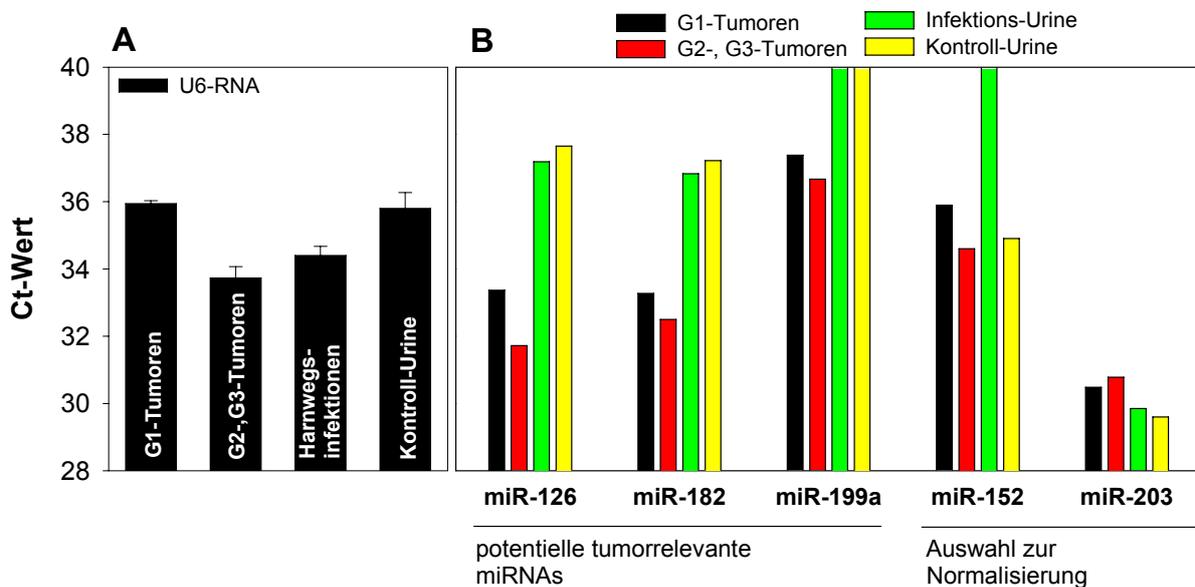


Abb. 3-3 RT-qPCR-basierte Suche nach tumorrelevanten miRNAs im Gesamturin. Gesamt-RNA wurde aus Urinproben von gesunden Spendern, von Patienten mit Harnwegsinfektionen und Patienten mit einem Harnblasenkarzinom (G1-, G2-, G3-Tumoren) präpariert. U6-RNA wurde über RT-qPCR detektiert und für jede der Gruppen wurden adäquate RNA-Mengen aus neun Urinen vereinigt. Dabei wurden alle neun U6-RNA-Mengen dem geringsten Wert innerhalb der Gruppe angepasst. Nach der Vereinigung wurde erneut der Ct-Wert für die RNU6B-RNA über RT-qPCR bestimmt (A). Anschließend erfolgte die Detektion von 157 verschiedenen miRNAs über einen RT-qPCR Array. Dargestellt werden die Ct-Werte ausgewählter miRNAs (B).

3.1.3 Einzelanalyse ausgewählter miRNAs im Urin von Harnblasenkarzinompatienten

Im Folgenden wurde untersucht, ob die aus dem gepoolten Array-Experiment ausgewählten, semi-quantitativ bestimmten miRNAs (miR-126, miR-182 und miR-199a) auch in einzelnen Proben von Harnblasenkarzinompatienten eine erhöhte Abundanz gegenüber Kontroll-Urinen aufweisen und somit für die Identifikation von Harnblasenkarzinomen geeignet sind. Diesbezüglich wurden diese miRNAs sowie miR-152, miR-203 und die U6-RNA in 47 verschiedenen Urinproben von Harnblasenkarzinompatienten, Infektionspatienten und gesunden Spendern mit Hilfe der RT-qPCR quantifiziert. MicroRNA-126 wurde sehr robust mit einer mittleren Intra-Assay-Varianz von 0,56% in allen Proben detektiert (Spannweite der gemessenen Ct-Werte: 21,8–39,1). Der mittlere Ct-Wert lag bei $30,9 \pm 4,3$. MicroRNA-152 wurde ebenfalls robust ($CV_{\text{Intra-Assay}} = 0,49\%$) in allen Proben mit einem mittleren Ct-Wert von $31,7 \pm 2,5$ detektiert (Spanne der gemessenen Ct-Werte: 25,5–37,2). Für miR-182 wurde ein mittlerer Ct-Wert von $30,8 \pm 3,7$ bestimmt ($Ct_{\text{min}} = 22,8$; $Ct_{\text{max}} = 39,0$; $CV_{\text{Intra-Assay}} = 0,56\%$). Micro-RNA-199a konnte hingegen nach 40 gefahrenen PCR-Zyklen in 7 von 11 untersuchten Kontroll-Urinen und in 5 von 29 Harnblasenkarzinom-Urinen nicht detektiert werden. Zudem konnte im Urin von 8 Spendern in einer Reaktion der qPCR-Duplikat-Ansätze ebenfalls keine miR-199a detektiert werden. Die geringe Abundanz dieser miRNA war bereits im Array-Experiment (Kontroll-Urine) zu sehen. Aufgrund dieser Ergebnisse wurde diese miRNA nicht weiter untersucht. Die miRNA mit der höchsten Abundanz war miR-203 mit einem mittleren Ct-Wert von $25,9 \pm 3,0$ ($Ct_{\text{min}} = 18,8$; $Ct_{\text{max}} = 33,4$). Zudem war bei miR-203 die mittlere Intra-Assay-Varianz mit 0,35% am geringsten. Die U6-RNA wurde mit einer geringen Abundanz in allen Urinproben detektiert (gemittelter Ct = $33,0 \pm 3,3$; $Ct_{\text{min-max}} = 25,3\text{--}40,0$; $CV_{\text{Intra-Assay}} = 0,44\%$).

Um einen weiteren Vergleich von Proben unterschiedlicher Spender zu ermöglichen, wurden miRNA-Ratios gebildet. Das Verhältnis von miR-182/miR-152 sowie miR-126/miR-152 ist im Gesamturin von Harnblasenkarzinompatienten (G1, G2 und G3, $n = 29$) höher als bei Gesunden ($n = 11$) oder Patienten mit einer Harnwegsinfektion ($n = 7$).

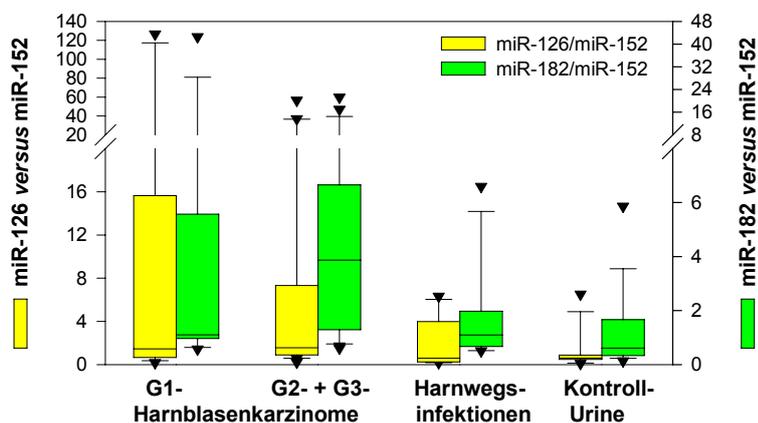


Abb. 3-4

Urin-assoziierte miRNA-Ratios: miR-126/miR-152 und miR-182/miR-152. Box-Plot identifizierter miRNA-Ratios im Gesamturin von gesunden Spendern ($n = 11$), Patienten mit Infektionen ($n = 7$) und Patienten mit einem Harnblasenkarzinom (G1-Tumoren, $n = 11$; G2- + G3-Tumoren, $n = 18$). Die Linie innerhalb der Boxen repräsentiert den Median, die Boxen repräsentieren das 25. und 75. Perzentil. Fehlerbalken begrenzen das 10. und 90. Perzentil. Außerhalb liegende Werte werden durch ein Symbol angezeigt.

3. Ergebnisse

Um die diagnostische Aussagekraft der Ratios miR-126/miR-152 und miR-182/miR-152 zu bestimmen, wurden Receiver Operating Characteristic (ROC)-Kurven erstellt (Abb. 3-5). In dieser Darstellungsform wird die Sensitivität gegen den Komplementärwert der Spezifität zu 1 dargestellt. Ein Test ohne diagnostische Vorhersagekraft ergibt eine ROC-Kurve, welche sich der Diagonalen annähert. Je größer und bauchiger die Fläche unter der Kurve, desto größer ist die diagnostische Aussagekraft des Tests.

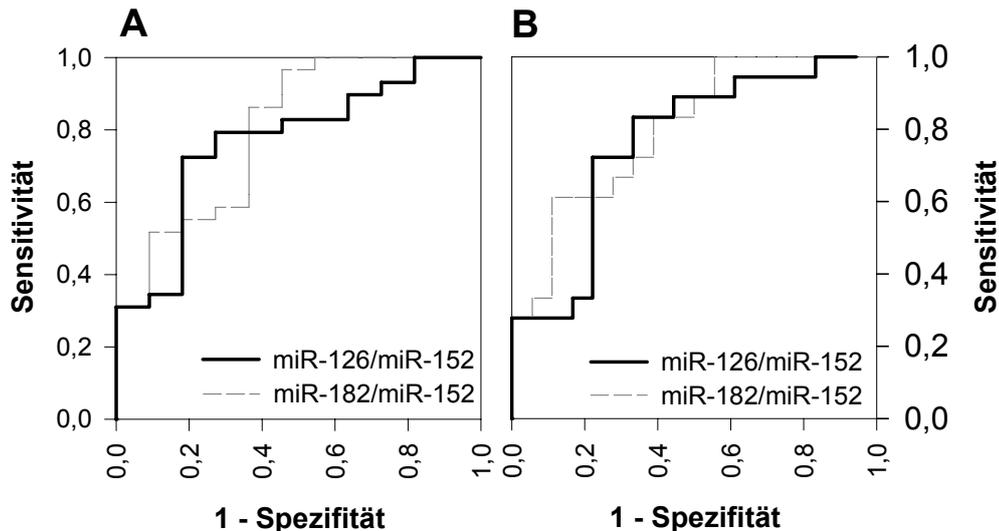


Abb. 3-5 **Diagnostische Aussagekraft von miR-126/miR-152 und miR-182/miR-152.** RNA wurde aus Urinproben von gesunden Spendern ($n = 11$) und Patienten mit einem Harnblasenkarzinom (G1-Tumoren, $n = 11$; G2- + G3-Tumoren, $n = 18$) präpariert. Anschließend wurden die miRNAs anhand RT-qPCR in Duplikaten detektiert. **A** ROC-Kurven der miRNA-Ratios. Dargestellt ist die Sensitivität gegen den Komplementärwert der Spezifität zu 1 für die Trennung der gesunden Spender von Patienten mit Harnblasenkarzinomen (G1-, G2-, G3-Tumoren). In **B** werden die ROC-Kurven für die Trennung von gesunden Spendern sowie Spendern mit Harnwegsinfektionen von Patienten mit G2- + G3-Tumoren dargestellt.

Über die miR-126/miR-152-Ratio werden die Harnblasenkarzinompatienten mit einer Spezifität von 82% und einer Sensitivität von 72% von gesunden Spendern getrennt (Schwellenwert_{miR-126/miR-152} = 0,99), Abb. 3-5 A. Die ROC-Kurve der Ratio miR-126/miR-152 weist eine Fläche von 0,768 unter der Kurve auf (Tabelle 3-2). Eine spezifische und sensitive Trennung der Gruppen war auch dann noch gegeben, wenn die Kontrollgruppe um die Urine der Harnwegsinfektionspatienten erweitert wurde. Beispielsweise können G2- und G3-Harnblasenkarzinomen mit einer Spezifität von 78% und eine Sensitivität von 72% detektiert werden (Abb. 3-5 B).

Die miR-182/miR-152-Ratio ermöglicht eine noch spezifischere Unterscheidung zwischen den Patienten mit einem G2- oder G3-Harnblasenkarzinom und Infektionspatienten und gesunden Spendern (Spezifität = 89%, Sensitivität = 61%; Schwellenwert = 2,44), Abb. 3-5 B. Die größte AUC wurde erzielt, indem die gemessene miR-182/miR-152 Ratio im Urin von Patienten mit einem G2- oder G3-Harnblasenkarzinom den Kontroll-Urinen gegenübergestellt wurde (AUC = 0,838, Tabelle 3-2). Die miR-

3. Ergebnisse

126/miR-152 Ratio bzw. miR-182/miR-152 Ratio unterschied sich allerdings nicht signifikant im Urin von gesunden Spendern und Patienten mit einem Harnblasenkarzinom ($p > 0,05$, Tabelle 3-2).

Tabelle 3-2 Diagnostische Aussagekraft der Marker miR-126/miR-152 bzw. miR-182/miR-152

MicroRNA Kombination	Untersuchte Gruppen	AUC	Signifikanz nach Mann-Whitney-U-Test (p -Werte)	Asymptotisches 95% Konfidenz Intervall	
				Untere Grenze	Obere Grenze
miR-126/miR-152	Kontrollen und Infektionen vs alle Tumoren	0,747	0,005	0,601	0,993
	Kontrollen vs alle Tumoren	0,768	0,010	0,605	0,931
	Kontrollen vs G1-Tumoren	0,736	0,061	0,518	0,953
	Kontrollen vs G2- + G3-Tumoren	0,799	0,007	0,629	0,969
miR-182/miR-152	Kontrollen und Infektionen vs alle Tumoren	0,753	0,004	0,609	0,896
	Kontrollen vs alle Tumoren	0,799	0,004	0,638	0,961
	Kontrollen vs G1-Tumoren	0,719	0,082	0,501	0,937
	Kontrollen vs G2- + G3-Tumoren	0,838	0,003	0,686	0,991

3.2 Messenger RNAs im Urin von Harnblasenkarzinompatienten

In diesem Abschnitt wird die Identifizierung und Charakterisierung von Urin-assoziiierter RNA-Sequenzen beschrieben, deren Ursprung m- (*messenger*-) RNAs sind. Hierzu war es notwendig, analog zu der Analyse von miRNAs (siehe Kapitel 3.1.1), zuerst ein Protokoll für die Präparation und Quantifizierung von mRNA mittels RT-qPCR auf der Grundlage von Gesamturin zu erstellen. Unter Verwendung dieses Protokolls wurde ein RT-qPCR-Array durchgeführt, mit dem Ziel, mRNAs zu finden, welche eine erhöhte Abundanz im Urin von Harnblasenkarzinompatienten aufweisen. Schließlich wurde untersucht, ob ausgewählte mRNA-Kandidaten für die Diagnostik von Harnblasenkarzinomen relevant sind. Wesentliche Teile der nachfolgenden Ergebnisse wurden veröffentlicht [67].

3.2.1 Methodologie zur Detektion von RNA im Urin mittels RT-qPCR

Die reproduzierbare Aufarbeitung von Urin zur Gewinnung von RNA mit möglichst konstanter Zusammensetzung und Qualität ist aufgrund zahlreicher Unabwägbarkeiten technisch und handwerklich äußerst schwierig. Die Zusammensetzung von Nukleinsäuren im Urin kann in Abhängigkeit vom Spender, der Tageszeit sowie der Probengewinnung schwanken [67]. Unter anderem sind die pH-Werte und der Gehalt an Salzen, Proteinen, Zellen sowie Nukleasen sehr unterschiedlich in den zu analysierenden Urinproben. Zudem können im Urin befindliche Zellen lysieren, wodurch es zum zusätzlichen Abbau von Nukleinsäuren durch Nukleasen kommen kann. Demzufolge war es notwendig, ein standardisiertes Protokoll für das Sammeln, Stabilisieren (sofortige Inaktivierung von Nukleasen), Lagern sowie die Aufarbeitung der Urinproben zu entwickeln. Ferner mussten

qPCR-Amplikons mit einer möglichst kleinen Länge entworfen werden um zu verhindern, dass die Sensitivität für die Detektion spezifischer mRNAs aufgrund einer geringen Integrität der präparierten Gesamt-RNA zu niedrig war. Darüber hinaus musste die Amplifikation von genomischer DNA in der qPCR technisch ausgeschlossen werden, da aus einigen Urinproben mit geringem Zellgehalt nur niedrige Konzentrationen an Nucleinsäuren präpariert werden konnten und schon kleinste Konzentrationen an genomischer DNA das Messergebnis verfälschen könnten. Des Weiteren wurde durch die Entwicklung eines externen RNA-Standards untersucht, welche Parameter die RT-qPCR-basierte Quantifizierung von mRNA beeinflussten. Im Folgenden werden die Ergebnisse zur technischen Charakterisierung des mRNA-Analyse-Systems vorgestellt.

3.2.1.1. Effizienz entwickelter qPCR-Amplikons am Beispiel von Ki-67

Die Qualität eines RT-qPCR-Amplikons hat einen entscheidenden Einfluss auf die Quantifizierung Urin-assoziiierter Sequenzen. Für jedes mRNA-Target, welches mittels RT-qPCR detektiert werden sollte, wurden zwei oder drei Amplikons entworfen. Hierbei wurde darauf geachtet, dass entweder ein Primer oder die TaqMan®-Sonde eine Exon-Exon-Grenze überdeckt, so dass die Amplifikation von genomischer DNA ausgeschlossen werden konnte. Am Beispiel der Ki-67 mRNA soll das Vorgehen bei dem Entwurf von RT-qPCR-Amplikons erläutert werden. Um einen Vergleich von RNA-Präparations-Protokollen bezüglich Kontaminationen mit genomischer DNA zu ermöglichen, wurden für den Nachweis der Ki-67 mRNA zwei unterschiedliche Amplikons verwendet. In der Abb. 3-6 A sind die beiden Amplikons zur Detektion der Ki-67 mRNA dargestellt. Ganz oben in der Abbildung ist die Verteilung der Exons und Introns des Gens auf dem dazugehörigen Chromosom dargestellt.

Die mittlere Abbildung zeigt das Transkript der mRNA mit den entsprechenden Längen und Grenzen der Exons. Unter der mRNA ist das längere, Intron-überspannende Ki-67 qPCR-Amplikon abgebildet. In der unteren Hälfte der Abb. 3-6 A ist das kürzere qPCR-Amplikon abgebildet, welches durch einen *reverse* Primer auf der Exon/Exon-Grenze charakterisiert ist. Dadurch kann, im Gegensatz zum langen Amplikon, keine genomische DNA in der Reaktion vervielfacht werden, was anhand mitgeführter non-RT-Kontrollen bestätigt wurde. In der Abb. 3-6 B & C werden die PCR-Produkte dargestellt. Die obere Abbildung zeigt ein PCR-Produkt, welches über das lange Amplikon vervielfältigt wurde. In die PCR wurde eine cDNA als Template eingesetzt, welche mit genomischer DNA aus der RNA-Präparation kontaminiert war, was aus den mitgeführten non-RTs hervorging. Die aufgetrennte Bande im Gel ist zwischen der 600 bp und der 500 bp Bande des Markers positioniert und weist somit die entsprechende Länge des PCR-Produkts aus genomischer DNA (mit Intron) auf (545 bp). Im Gelbild darunter ist die Amplifikation einer cDNA ohne Kontamination mit genomischer DNA dargestellt. Die im Gel aufgetrennte Bande lag im Bereich der zu erwartenden Länge von 202 Basen. Das im Polyacrylamidgel aufgetrennte PCR-Produkt (Abb. 3-6 D) wurde mit dem kurzem Ki-67-Amplikon generiert und lag im Bereich der zu erwartenden Länge von 77 Basen.

3. Ergebnisse

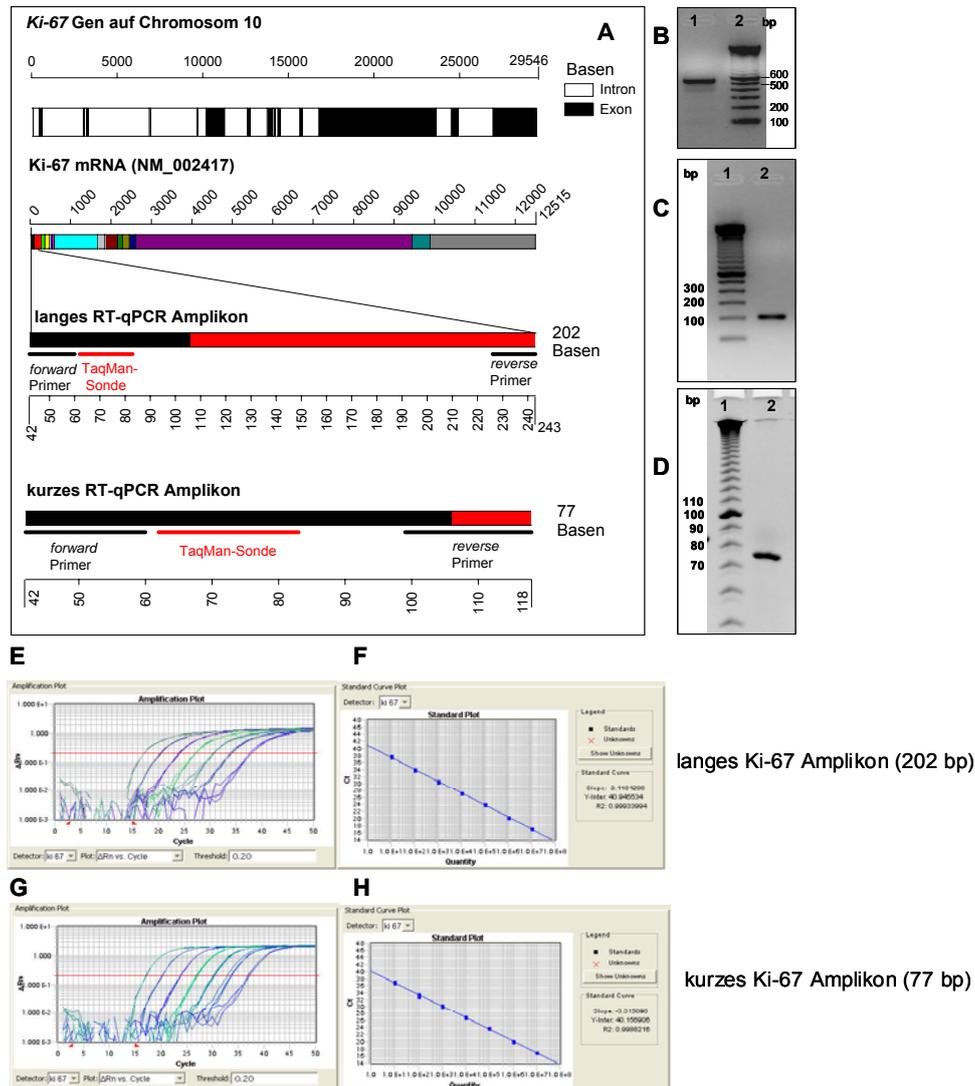


Abb. 3-6

Entwurf und Charakterisierung von qPCR-Amplikons am Beispiel der *Ki-67* mRNA. (A) In der oberen Bildhälfte ist die genomische DNA des *Ki-67*-Gens mit der Verteilung von Exons und Introns dargestellt. In der mittleren Bildhälfte ist die nach der Transkription der DNA vorliegende mRNA mit der Größenverteilung der fünfzehn verschiedenen Exons abgebildet. In der unteren Bildhälfte werden die entworfenen qPCR-Amplikons, bestehend aus *forward* und *reverse* Primer sowie der TaqMan®-Sonde dargestellt. Die Sequenzen werden jeweils in der 5'-3'-Richtung präsentiert. (B-D) Darstellung der PCR-Produkte nach der Amplifikation der *Ki-67* mRNA über RT-qPCR anhand einer nativen Agarosegel- (B+C) oder Polyacrylamidgelelektrophorese (D). In der Bahn 2 (B) bzw. Bahn 1 (C+D) wurde der DNA-Größenmarker (B+C: 100 bp DNA-ladder, D: 10-bp DNA-ladder) aufgetrennt, wobei die daneben angegebenen Zahlen die jeweilige Fragmentlänge in Basen angibt. In der weiteren Bahn wurde das PCR-Produkt aufgetrennt. (E+G) Abbildung des Amplifikationsplots nach dem Lauf der quantitativen PCR mit dem langen (E) oder kurzen Amplikon (G). Dargestellt ist die normalisierte Fluoreszenz *versus* der Anzahl gefahrener qPCR-Zyklen. Die Kurven gehen aus Triplikaten der Amplifikation von sechs seriellen Verdünnungen des qPCR-Standards hervor (10^7 – 10^1 Kopien pro Reaktion, von links nach rechts). Die rote Linie repräsentiert den Schwellenwert an normalisierter Fluoreszenz, welcher zur Berechnung der Ct-Werte diente. (F+H) Abbildung der aus dem in (E bzw. G) dargestellten Amplifikationsplot resultierenden Standardkurve. Auf der y-Ordinate wurden die Ct-Werte aufgetragen, auf der x-Ordinate die eingesetzten Kopienzahlen pro Reaktionsansatz.

3. Ergebnisse

Die Abb. 3-6 E und D zeigt die Amplifikationsplots eines seriell verdünnten, in Triplikaten über qPCR bestimmten Ki-67-DNA-Standards (10^7 –10 Kopien pro Reaktion, von links nach rechts) für das lange bzw. das kurze Amplikon. Auf der Grundlage der Amplifikationskurven wurde eine Standardreihe erstellt, aus welcher eine qPCR-Effizienz von 1,96 für das lange und 2,00 für das kurze Amplikon abgeleitet werden kann (Abb. 3-6 F bzw. H). Aufgrund dessen wurde das kurze Amplikon für die Detektion der Ki-67 mRNA ausgewählt. Das lange Amplikon wurde verwendet, um verschiedene Systeme zur Präparation von Gesamt-RNA aus Urin zu untersuchen, weil hiermit eine Kontamination durch genomische DNA sofort identifiziert werden konnte. Alle in dieser Arbeit verwendeten qPCR-Amplikons werden im Anhang aufgeführt (Siehe Abschnitt 7.2).

3.2.1.2 Vergleich verschiedener Systeme zur RNA-Präparation aus Urin

Im Urin liegen in Abhängigkeit vom Spender teilweise sehr geringe Konzentrationen an Nucleinsäuren vor. Deswegen bedurfte es eines RNA-Präparations-Systems mit einer hohen RNA-Ausbeute, wodurch Sensitivitätsprobleme bei den qPCR-Messungen vermieden werden sollten. Ferner war es notwendig, ein „robustes“ RNA-Präparationssystem mit einer geringen Variation zwischen den einzelnen Aufarbeitungen zu erstellen. Bei dem Vergleich verschiedener modifizierter Systeme zur Präparation von Gesamt-RNA aus Urin, zeigte sich, dass bei der Verwendung des RNeasy Midi Kits die höchsten Ki-67 mRNA-Kopien pro ml Urin mittels RT-qPCR nachgewiesen werden konnten (Abb. 3-7). Im Vergleich zu den anderen verwendeten RNA-Präparations-Techniken (QIAamp MinElute Virus Kit, Qiagen; Ultra Sens, Qiagen; Virus L, Macherey & Nagel) wurde mit dieser Methode in etwa die zweifache Abundanz an Ki-67 mRNA detektiert.

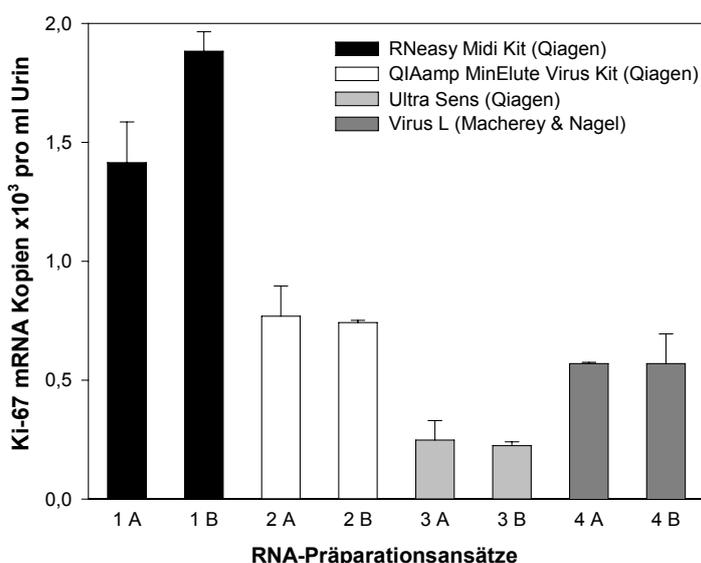


Abb. 3-7
Vergleich verschiedener modifizierter Systeme zur Präparation von Nucleinsäuren aus Gesamturin. Zu der Urinprobe eines Spenders wurden 10^3 Zellen ECV-304 hinzugefügt. Anschließend wurden die Urinproben mit GuSCN-haltigem Lysispuffer versetzt, eingefroren und bei -80°C bis zur Präparation der Nucleinsäuren gelagert. Für das 3. RNA-Präparationsprotokoll wurde frischer Urin eingefroren. Die Quantifizierung der Ki-67 mRNA in den Gesamt-RNA-Extrakten erfolgte über RT-qPCR in Triplikaten. Die RNA-Präparation erfolgte jeweils in zweifacher Ausführung.

3. Ergebnisse

Das ausgewählte System (RNeasy Midi Kit) wurde anschließend in Hinblick auf eine mögliche Co-Präparation von kontaminierender genomischer DNA untersucht. Dadurch, dass für die CC3, TC3 und UBC mRNA Intron-überspannende Amplikons entworfen wurden, konnte nicht ausgeschlossen werden, dass mitaufgereinigte genomische DNA die Ergebnisse verfälschen könnte. Die Mitführung einer non-RT-Kontrolle und die Verwendung des Intron-überspannenden Ki-67 qPCR-Amplikons ermöglichten das Erkennen einer Kontamination mit genomischer DNA. Verunreinigungen mit genomischer DNA waren bei allen verwendeten RNA-Präparationssystemen nachweisbar. Durch eine zusätzliche Behandlung der DNA mittels DNase I ließen sich die Kontaminationen deutlich reduzieren. Das wird vor allem deutlich, wenn die Urinproben unter Verwendung des RNeasy Mini Kits ohne DNA-Verdau auf der Säule aufgearbeitet wurden (Abb. 3-8, Proben 3A und 3B). In diesem Fall konnten die über RT-qPCR detektierten Kopien der Ki-67 mRNA fast ausschließlich auf genomische DNA zurückgeführt werden. Durch einen DNA-Verdau auf der Säule wurde aber nur ein Teil der genomischen DNA eliminiert (Abb. 3-8, Proben 3C und 3D). Der Abb. 3-8 (Proben 2C und 2D) kann außerdem entnommen werden, dass unter Verwendung eines 3 M GuSCN-Lysis-puffers die höchste Kopienzahl der Ki-67 mRNA erreicht werden konnte. Hier waren in den non-RTs weniger als 2% der Ki-67 mRNA Kopienzahl im Vergleich zu den cDNA-Ansätzen nachweisbar. Aufgrund dieser Ergebnisse wurde für die weiteren RNA-Präparationen aus Urin der RNeasy Midi Kit mit dem 3 M GuSCN-Lysis-puffer und einem zusätzlichen DNA-Verdau auf der Säule verwendet.

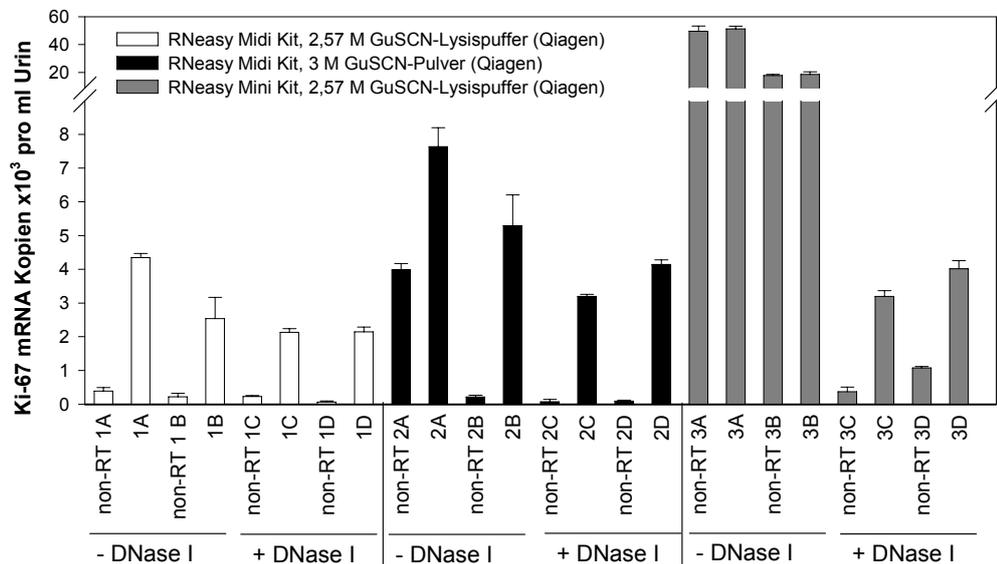


Abb. 3-8

Identifikation von Kontaminationen mit genomischer DNA in Urin-basierten RNA-Extrakten. Zu einer Urinprobe wurden 10^3 ECV-304-Zellen gegeben. Der Urin wurde mit einem Volumen eines 2,57 M GuSCN-haltigen Lysis-puffers versetzt (Protokoll eins und zwei) oder mit GuSCN-Pulver vermischt, so dass eine Endkonzentration von 3 M gelöstem GuSCN vorlag. Die Proben wurden eingefroren und bis zur RNA-Präparation bei -80°C gelagert. Bei der Präparation wurden die drei aufgeführten Systeme verwendet, wobei jeweils 2 Proben unter Verwendung eines Protokolls aufgearbeitet wurden, 2x ohne DNA-Verdau und 2x mit DNA-Verdau auf der Silica-Membran. Es wurde für jede Präparation eine non-RT-Kontrolle mitgeführt. Ein Vergleich der verschiedenen RNA-Präparationssysteme erfolgte über die Detektion von Ki-67 mRNA mittels RT-qPCR.

3.2.1.3 Technische Analyse des RNA-Präparations- und Quantifizierungssystems

Die Entwicklung eines robusten diagnostischen Tests verlangt eine präzise und reproduzierbare Analyse. Aufgrund dessen musste das Analysesystem zur Präparation und Quantifizierung von mRNA auf der Basis von Gesamturin charakterisiert werden. Die in diesem Zusammenhang durchgeführten Experimente sind in der Abbildung 3-9 dargestellt. Zuerst wurde ein externer RNA-Standard (RNA_{LUC}) entwickelt, welcher zur Kontrolle des gesamten Analyseprozesses eingesetzt wurde. Die Zusammensetzung verschiedener interner Referenz-mRNAs im Urin wurde zu unterschiedlichen Tageszeiten untersucht (Morgen-, Mittags- und Abend-Urin: Tages-Profile). Es wurde ebenfalls die Variabilität der Zusammensetzung diverser interner Referenz-mRNAs in verschiedenen Urinfraktionen bestimmt. Darüber hinaus wurde der Einfluss der Urin-Zusammensetzung auf individuelle Schritte des Prozesses anhand von RNA_{LUC} untersucht, welcher an zwei verschiedenen Positionen des Analyse-Protokolls in einer definierten Kopienzahl zu den Proben gegeben wurde (Abb.3-9: "Spike"-Experimente, schwarze, horizontale Pfeile). Die Quantifizierung erfolgte über TaqMan®-basierte RT-qPCR.

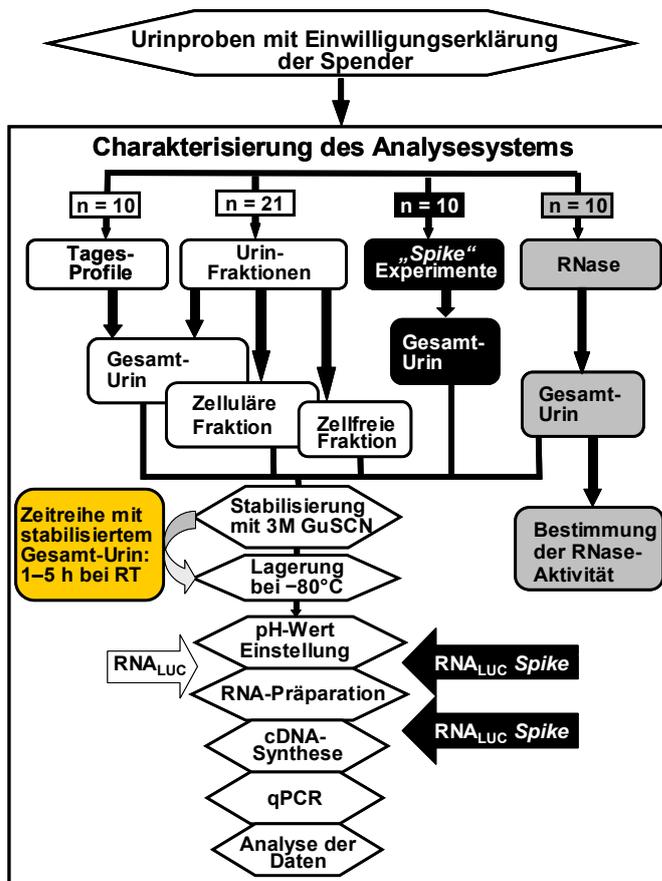


Abb. 3-9 Experimenteller Aufbau zur Charakterisierung des Analysesystems. Im Standardprotokoll wird der externe RNA-Standard (RNA_{LUC}) erst vor der RNA-Präparation zu den Proben gegeben (weißer Pfeil), während bei den "Spike"-Experimenten die Zugabe von RNA_{LUC} entweder vor der RNA-Präparation oder vor der cDNA-Synthese erfolgte (schwarze, horizontale Pfeile). Die Bestimmung der RNase-Aktivität (graue Boxen) erfolgte im unbehandelten Urin.

3.2.1.3.1 Entwicklung eines externen RNA Standards

Eine Standardisierung des RNA-Präparations- und Quantifizierungs-Prozesses erfolgte durch die Entwicklung von RNA_{LUC}, mit welchem einzelne Schritte innerhalb des Verfahrens auf Inhibition durch Bestandteile des Urins hin untersucht werden konnten. Für die Verwendung des externen RNA-Standards war es notwendig, die Robustheit der Detektion von RNA_{LUC} zu untersuchen. Dafür wurde mittels qPCR eine cDNA-Standardgerade eines revers-transkribierten RNA_{LUC} T7-Transkripts sowie eine DNA-Standardgerade eines aufgereinigten RNA_{LUC} PCR-Produkts hergestellt. Die Amplifikation der verschiedenen Verdünnungsstufen des cDNA-Standards war sehr effizient ($E = 1,99$), was aus der Steigung der Regressionsgeraden von $-3,34$ hervorgeht (Abb.3-10). Die Amplifikations-Effizienz des DNA-Standards war gering niedriger ($E = 1,97$). Somit war die Amplifikation über alle Verdünnungsstufen bei einem Regressionskoeffizienten von 0,9959 für den cDNA-Standard und 0,9980 für den DNA-Standard sehr präzise. Die aus der qPCR resultierenden Ct-Werte des cDNA-Standards wurden unter Verwendung der DNA-Standardkurve in Kopienzahlen transformiert. Bei drei Verdünnungen wurden vergleichbare RNA_{LUC} Kopienzahlen über die beiden Standardgeraden berechnet, bei 125 und $12,5 \times 10^4$ in die cDNA-Synthese eingesetzten RNA_{LUC} Kopien waren die anhand der DNA-Standardgerade errechneten Kopienzahlen etwas geringer (Faktor 1,4 bzw. 1,3).

Zur Normalisierung interner mRNAs wurden jeweils 10^7 Kopien von RNA_{LUC} vor der RNA-Präparation zur GuSCN-stabilisierten Urinprobe gegeben. Diese Menge war ausreichend, um auch bei schlechten RNA-Präparations-Ausbeuten von unter 1% eine sensitive Detektion von RNA_{LUC} über qPCR zu gewährleisten. Ein Aliquot von RNA_{LUC} (10^7 Kopien) wurde direkt in die cDNA-Synthese eingesetzt, um die Kopienzahl zu verifizieren. Aus 15 verschiedenen cDNA-Synthesen dieser Aliquots, welche in unterschiedlichen qPCR-Läufen in Triplikaten amplifiziert wurden, ergab sich eine gemittelte Kopienzahl von $7,03 \times 10^6$ und ein durchschnittlicher Intra-Assay Variationskoeffizient (CV) von 6,16%. Der Inter-Assay-CV war mit 10,62% ebenfalls gering, wodurch die Detektion von RNA_{LUC} sehr robust war.

3. Ergebnisse

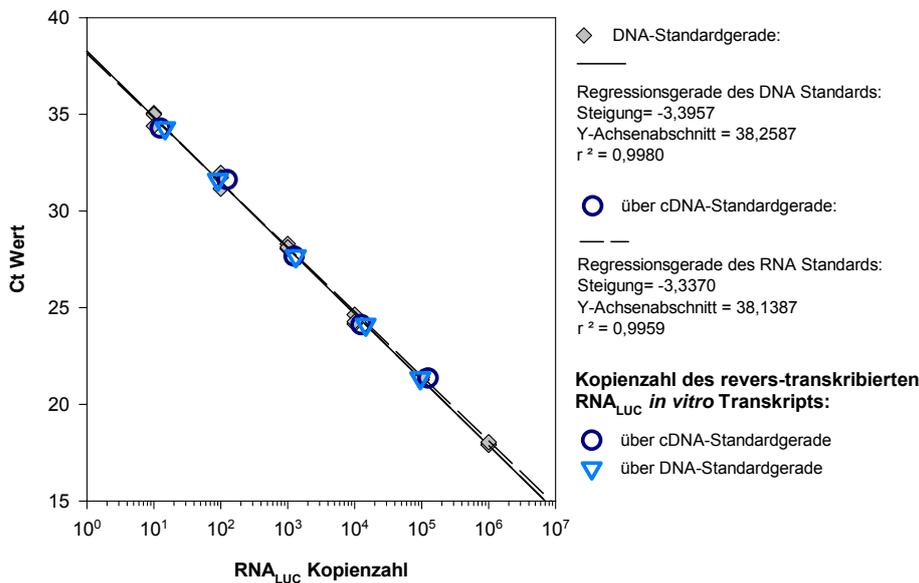


Abb. 3-10 Präzision des externen RNA Standards (RNA_{LUC}). Über A₂₆₀-Messung wurde die Konzentration von RNA_{LUC} bestimmt. Aus der Konzentration der Nukleinsäurelösung wurde die Kopienzahl errechnet, und verschiedene Kopien (12,5; 125; 1250; 12500; 125000) wurden in die cDNA-Synthese eingesetzt. Darauf wurden die Ct-Werte in Triplikaten mittels qPCR bestimmt. Die Messpunkte werden durch offene, dunkelblaue Kreise, die resultierende Standardgerade wird durch eine gestrichelte Linie dargestellt. Analog dazu wurde ein DNA Standard von RNA_{LUC} aus einem aufgereinigtem PCR-Produkt hergestellt, und in sechs seriellen Verdünnungen von 10–10⁶ Kopien in die qPCR eingesetzt. Die DNA-Standardkurve wurde in Triplikaten bestimmt (graue Rauten). Die resultierende Regressionsgerade wird durch eine durchgezogene schwarze Linie dargestellt. Die anhand der DNA-Standardgerade errechneten Kopien der RNA_{LUC}-cDNA werden durch offene, hellblaue Dreiecke dargestellt.

In der Abb. 3-11 wird die Abundanz von drei internen Referenz-mRNAs (GAPDH, RPLP0, UBC) im Urin von zehn verschiedenen Spendern mit und ohne Normalisierung über RNA_{LUC} dargestellt. Auf der Basis dieser Spender wurde außerdem die tagesabhängige Varianz der mRNA-Ratios dieser internen Referenz-mRNAs (Abschnitt 3.2.1.3.3) untersucht. Die analysierten Urinproben in den Abbildungen A–C wurden nach steigender RNA_{LUC}-Ausbeute angeordnet (von links nach rechts), welche in der Tabelle 3-3 aufgeführt werden. Es wurde eine Korrelation nach Pearson durchgeführt, da die über RT-qPCR detektierten Kopienzahlen der mRNAs nach dem Kolmogorov-Smirnov-Test normalverteilt waren. Dadurch konnte untersucht werden, inwiefern die Kopien interner Referenz-mRNAs mit der RNA_{LUC}-Ausbeute korrelieren. Die Analyse zeigte, dass die GAPDH Kopien pro ml Urin nur gering mit der RNA_{LUC}-Ausbeute korrelierten ($r = 0,414$; $p = 0,07$). Die RPLP0 bzw. UBC Kopien pro ml Urin zeigten aber eine mittlere Korrelation ($r = 0,659$; $p = 0,002$) bzw. eine hohe Korrelation ($r = 0,792$; $p < 0,001$) mit der RNA_{LUC}-Ausbeute.

3. Ergebnisse

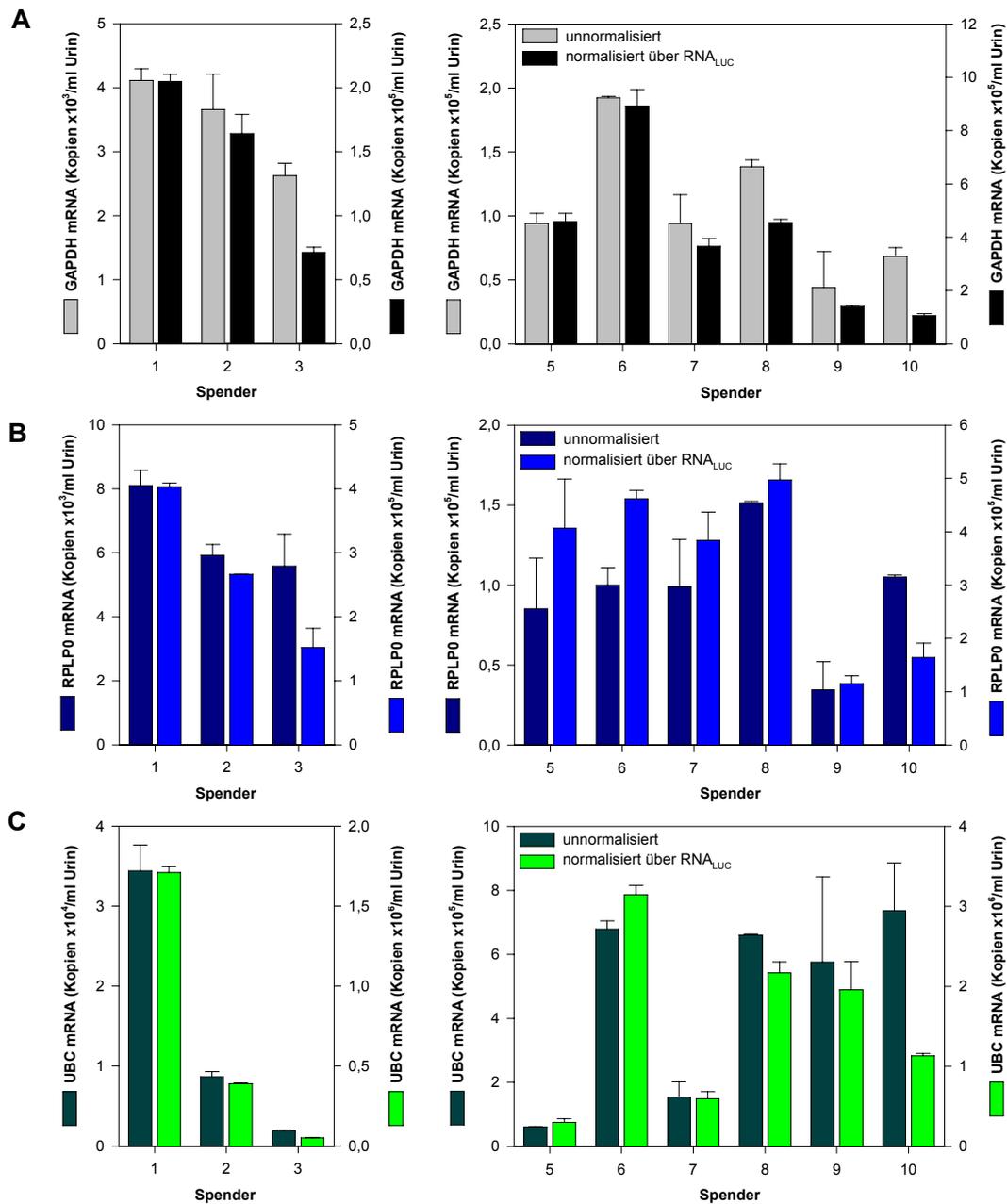


Abb. 3-11 Normalisierung von mRNAs interner Referenzgene über RNA_{LUC} . Vor der RNA-Präparation wurden GuSCN-stabilisierten Urinproben von zehn Spendern jeweils 10^7 Kopien RNA_{LUC} hinzugefügt. Die Gesamt-RNA wurde in Duplikaten präpariert, und die mRNAs der Referenzgene GAPDH, UBC, RPLP0 sowie RNA_{LUC} wurden in Triplikaten über RT-qPCR detektiert. Die dargestellten Balken repräsentieren die Mittelwerte \pm Standardabweichung aus den in Duplikaten durchgeführten RNA-Präparationen mit (helle Balken) und ohne (dunkle Balken) Normalisierung über RNA_{LUC} .

Der Inter-Assay CV war bei der Urinprobe des Spenders 9 am größten (Tabelle 3-3). Bei dieser Probe lag der gemittelte CV der drei detektierten internen Referenz-mRNAs ohne Normalisierung bei 53,80%. Nach der Normalisierung mit RNA_{LUC} konnte der CV auf

3. Ergebnisse

11,24% reduziert werden. Besonders deutlich wurde die Notwendigkeit einer Normalisierung über RNA_{LUC} bei der Detektion der GAPDH mRNA mit dem höchsten CV von 64,17% (Spender 9). Zwischen den in Duplikaten aus Urinproben weiterer Spender (4, 5, 7) präparierten Gesamt-RNA Extrakten gab es ebenfalls große Varianzen bezüglich der in der qPCR detektierten Kopienzahlen. Durch die Normalisierung über RNA_{LUC} konnten aber auch hier die über die drei detektierten mRNAs gemittelten CVs beim Spender 4 und 7 um etwa die Hälfte reduziert werden. Bei den Urinproben der Spender 1 und 2, welche eine geringe mittlere Varianz zwischen den RNA-Präparationen aufwiesen, konnte der CV durch die Normalisierung noch weiter auf etwa ein Drittel reduziert werden. Bei den Spendern 3, 5, 6 und 10 wurde die mittlere Varianz aber nur minimal verringert. Die niedrigste Varianz zwischen den RNA-Präparationen lag bei dem Spender 8 ohne eine Normalisierung über RNA_{LUC} vor (CV = 1,72%). Bei dieser Probe war die Varianz nach der Normalisierung höher (CV = 5,09%). Im Mittel wurden die CVs der mRNA-Abundanzen in den zehn verschiedenen Urinen durch die Normalisierung über RNA_{LUC} um 24% erniedrigt (GAPDH: CV-RNA_{LUC} = 87,86%, CV+RNA_{LUC} = 75,91%; RPLP0: CV-RNA_{LUC} = 81,69%, CV+RNA_{LUC} = 45,66%; UBC: CV-RNA_{LUC} = 102,25%, CV+RNA_{LUC} = 79,66%; n = 10). Demzufolge lag nach der Normalisierung über RNA_{LUC} für die RPLP0 mRNA der geringste maximale Faktor zwischen den Abundanzen der zehn untersuchten Urine vor (RPLP0: Faktor_{Max/Min} = 4,31; GAPDH: Faktor_{Max/Min} = 12,52; UBC: Faktor_{Max/Min} = 61,14).

Tabelle 3-3 Inter-Assay Variabilität der RT-qPCR-basierten Detektion interner Referenz-mRNAs

Spender	RNA _{LUC} Ausbeute (% ± Standard- abweichung)	GAPDH (n = 2)		RPLP0 (n = 2)		UBC (n = 2)		Mittelwert	
		CV _{Inter-Assay} (%)		CV _{Inter-Assay} (%)		CV _{Inter-Assay} (%)		CV _{Inter-Assay} (%)	
		ohne RNA _{LUC}	mit RNA _{LUC}						
1	2,01 ± 0,15	4,47	2,81	5,85	1,42	9,44	2,18	6,59	2,14
2	2,22 ± 0,13	15,09	9,12	5,71	0,29	7,17	1,167	9,33	3,53
3	3,68 ± 0,07	7,44	5,60	17,99	19,80	6,47	4,63	10,63	10,01
4	16,82 ± 6,35	24,63	13,74	27,55	10,74	22,73	15,68	24,97	13,39
5	20,61 ± 3,10	8,40	6,67	37,19	22,80	0,38	15,40	15,32	14,96
6	21,61 ± 1,62	0,58	6,93	10,95	3,45	3,85	3,66	5,13	4,68
7	25,51 ± 4,18	24,07	7,83	29,86	13,81	31,04	15,04	28,32	12,23
8	30,48 ± 2,07	3,87	2,93	0,73	6,08	0,55	6,25	1,72	5,09
9	31,15 ± 19,21	64,17	3,11	50,10	12,67	46,31	17,92	53,83	11,24
10	64,90 ± 11,42	10,31	7,36	1,19	16,42	20,28	2,73	10,59	8,84

3.2.1.3.2 Stabilisierung und Lagerung von Urinproben

Um einen diagnostischen Test für den Nachweis von Harnblasenkarzinomen für die klinische Anwendung praktikabel zu gestalten, muss ein standardisiertes Verfahren zum Sammeln, Lagern und Aufarbeiten von Urinproben entwickelt werden. Daher wurden die Urinproben nach der Abgabe sofort durch die Zugabe von GuSCN-Pulver (Endkonzentration 6 M) stabilisiert, wodurch instabile RNAs vor der Degradation durch Nukleasen geschützt wurden und Sensitivitätsprobleme in der RT-qPCR verringert wurden. Durch die Einführung von *Standard Operating Procedures* (SOPs) für das Sammeln und die Aufarbeitung von Urinproben wurde eine reproduzierbare Aufarbeitung der Urinproben

3. Ergebnisse

erreicht. Zur Überprüfung der stabilisierenden Wirkung von GuSCN und um herauszufinden, wie lange diese Urinlösungen bei Raumtemperatur gelagert werden können, wurde eine Zeitreihe erstellt. Es zeigte sich, dass die Konzentration an GuSCN ausreichend war, um RNasen im Urin über einen Zeitraum von 5 h zu inhibieren (Abb. 3-12). Über RT-qPCR wurden die mRNAs der internen Referenz-mRNAs GAPDH, RPLP0 und UBC detektiert, welche über den untersuchten Zeitraum mit geringen Schwankungen detektiert werden konnten (GAPDH: 85%–100%; RPLP0: 81%–100%; UBC: 86%–100%; RNA_{LUC}: 92%–100%).

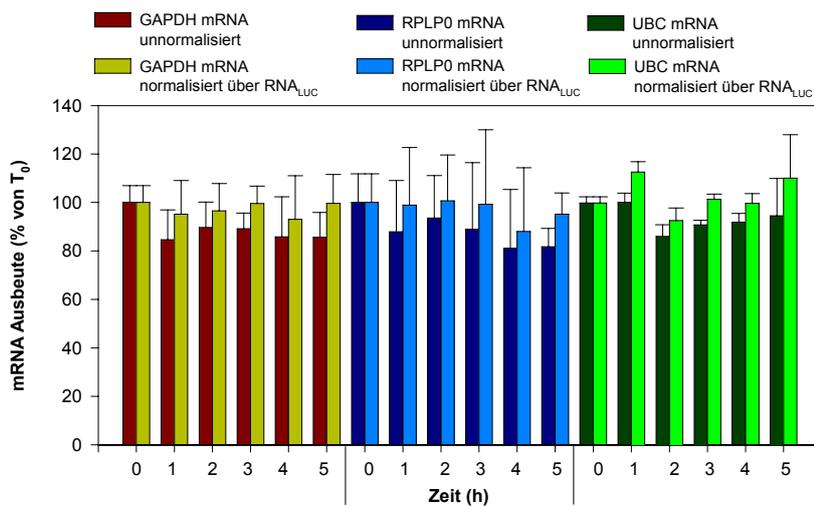


Abb. 3-12
Stabilität GuSCN-stabilisierter Urinproben.
 Der Urin eines Spenders wurde nach der Stabilisierung 5h bei RT gelagert. Jede Stunde wurde ein Aliquot entnommen und bei -80°C gelagert. Anschließend erfolgte die RNA-Präparation und Quantifizierung der angegebenen mRNAs über RT-qPCR in Triplikaten.

In der Tabelle 3-4 wird die Inter-Assay Variabilität der verschiedenen RNA-Präparationen und –Quantifizierungen für die sechs verschiedenen Zeitpunkte angegeben. Für RNA_{LUC} wurde ein CV von 5,27% berechnet, für die endogenen mRNAs GAPDH, RPLP0 und UBC wurden etwas höhere CVs berechnet. Durch die Normalisierung über RNA_{LUC} verbesserte sich der CV für die GAPDH und RPLP0 mRNA um den Faktor 2,2 bzw. 1,6. Für die UBC-mRNA verschlechterte sich der Faktor nur minimal um 1,2. Die Ergebnisse zeigen, dass die RNA in GuSCN-stabilisiertem Urin zumindest über einen Zeitraum von fünf Stunden bei Raumtemperatur ausreichend stabil transportiert oder gelagert werden kann.

Tabelle 3-4 Präzision der RNA-Präparation und Quantifizierung

Detektierte RNA	Anzahl der Replikate	CV*(%) Ohne RNA _{LUC} Normalisierung	CV*(%) Mit RNA _{LUC} Normalisierung	Experimenteller Aufbau
Kopien RNA _{LUC}	n = 6	5,27		Zugabe von RNA _{LUC} zu einer Urinprobe
Kopien der endogenen GAPDH mRNA	n = 6	6,39	2,94	Aliquots einer Urinprobe
Kopien der endogenen RPLP0 mRNA	n = 6	8,08	4,96	Aliquots einer Urinprobe
Kopien der endogenen UBC mRNA	n = 6	5,80	7,18	Aliquots einer Urinprobe

*Inter-Assay Variationskoeffizient

3. Ergebnisse

3.2.1.3.3 Interne Referenz-mRNAs im Urin

Die Normalisierung der Abundanz von RNA-Tumormarkern über „konstitutiv“ exprimierte *housekeeping* Gene (hier als interne Referenz-mRNAs bezeichnet) ist eine Standard-Strategie, um Probenmaterial verschiedener Tumorpatienten sowie gesunder Spender miteinander vergleichen zu können. Allerdings kann die Expression solcher interner Referenzgene, wie beispielsweise GAPDH, in Tumorgewebe reguliert sein [zusammengefasst in 92]. Als Konsequenz hieraus wurde in einer Vielzahl von Studien vorgeschlagen, viele unterschiedliche interne Referenz-mRNAs parallel zu untersuchen. Für die Verwendung von Gesamturin als RNA-Quelle muss zudem berücksichtigt werden, dass der Zellgehalt sowie die Zusammensetzung von verschiedenen Zelltypen im Urin unterschiedlich sein kann und somit die Ratio interner Referenz-mRNAs stark variieren kann. Aufgrund dessen wurde die Variabilität der Zusammensetzung interner Referenz-mRNAs an unterschiedlichen Tageszeiten und in drei verschiedenen Urinfraktionen (zelluläre Fraktion, zellfreie Fraktion, Gesamturin) untersucht. Für diese Experimente wurde zuerst ein Set von neun internen Referenz-mRNAs im Gesamturin untersucht.

Zur Untersuchung, ob die Abundanz eines Urin-assoziierten Tumormarkers über interne Referenz-mRNAs normalisiert werden kann, wurden neun verschiedene, in der Literatur beschriebene, interne Referenz-mRNAs ausgewählt (Tabelle 3-5). Die ausgewählten Referenz-mRNAs wiesen in den angegebenen Studien eine geringe Variabilität im untersuchten Probenmaterial verschiedenen Ursprungs auf und schienen daher als geeignet für die Normalisierung Urin-assoziiierter mRNAs. Die internen Referenz-mRNAs sowie der für Harnblasenkarzinome beschriebene Tumormarker Urokinase Plasminogen Aktivator (uPA) [39] wurden im Urin mit Hilfe der RT-qPCR nachgewiesen.

Tabelle 3-5 Auswahl interner Referenz-mRNAs zur Normalisierung der mRNA-Tumormarker-Abundanz

Name des Gens (Symbol)	Funktion/ Beschreibung; Auswahlkriterium
18S rRNA	Ribosomale RNA ; von 11 getesteten Referenz-mRNAs wies die Expression der GUSB mRNA und 18S rRNA die geringste Variabilität in den von Aerts <i>et al.</i> untersuchten humanen Tumorzelllinien und embryonalen Zelllinien auf (n = 26) [93]
Beta-Glucuronidase (GUSB)	Lysosomale Exoglycosidase ; von 11 getesteten Referenz-mRNAs wies die Expression der GUSB mRNA und 18S rRNA die geringste Variabilität in den von Aerts <i>et al.</i> untersuchten humanen Tumorzelllinien und embryonalen Zelllinien auf (n = 26) [93]
Beta-2-Mikroglobulin (B2M)	Beta-Kette des MHC I-Moleküls ; von 13 getesteten Referenz-mRNAs wies die Expression der B2M mRNA eine geringe Variabilität in den von Dheda <i>et al.</i> untersuchten Blutproben auf (n = 16) [94]
Glyceraldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase (GAPDH)	Oxidoreduktase (Glycolyse und Glyconeogenese) ; von den 10 untersuchten Referenz-mRNAs war die Expression der GAPDH, UBC, HPRT mRNA am stabilsten in den von Vandesompele <i>et al.</i> untersuchten Geweben (n = 13) [83]
RNA-Polymerase II (RP II)	Transkription der mRNA ; von 13 getesteten Referenzgenen war die Expression der RPII mRNA am konstantesten in den von Radonić <i>et al.</i> untersuchten Geweben (n = 16) [95]
Humanes saures ribosomales Protein (RPLP0)	Humanes ribosomales Protein (Komponente der 60S UE) ; von 13 getesteten Referenz-mRNAs war die Expression der RPLP0 (HuPO) mRNA am konstantesten in den von Dheda <i>et al.</i> untersuchten Blutproben (n = 16) [94]
Ribosomales Protein S27A (RPS27A)	Ribosomales Protein S27 (Komponente der 40S UE) ; RPS27A zeigte eine relative konstante Expression in den von Lee <i>et al.</i> untersuchten Daten-Sets [96]
Ubiquitin C (UBC)	Protein Degradation ; von den 10 untersuchten Referenz-mRNAs war die Expression der GAPDH, UBC, HPRT mRNA am stabilsten in den von Vandesompele <i>et al.</i> untersuchten Geweben (n = 13) [83]
(YWHAZ)***	Signaltransduktionsmolekül ; von den 10 untersuchten Referenz-mRNAs war die Expression der YWHAZ mRNA sehr stabil in den von Vandesompele <i>et al.</i> untersuchten Geweben (n = 13) [83]

***Tyrosin 3-Mono-Oxygenase / Tryptophan 5-Mono-Oxygenase Aktivierungsprotein, zeta Polypeptid

3. Ergebnisse

Es zeigte sich, dass in den untersuchten Urinproben die Varianz der Referenzgene sehr hoch war (Abb.3-13). Die Ct-Werte der 18S rRNA wiesen mit einem Inter-Assay CV von 30,3% die größte Variabilität auf (Ct-Wert Spannweite: 10,5–23,4). Diese RNA zeigte mit einem mittleren Ct-Wert von $14,4 \pm 4,4$ die höchste Abundanz in den untersuchten Urinen. Die mRNA für BGUS hatte mit einem mittleren Ct-Wert von $28,2 \pm 2,7$ die geringste Abundanz. Die gemessenen Ct-Werte dieser mRNA zeigten die geringste Varianz zwischen den unterschiedlichen Urinen ($CV_{\text{Inter-Assay}} = 9,7\%$; Ct-Wert Spannweite: 25,0–32,4). Niedrige Inter-Assay Variabilitäten wurden außerdem für die RPLP0 und die RPS27A mRNA berechnet ($CV_{\text{Inter-Assay}} = 11,9\%$ bzw. $CV_{\text{Inter-Assay}} = 12,0\%$). Im Gegensatz zur RPS27A mRNA (mittlerer Ct-Wert = $26,4 \pm 3,2$; Ct-Wert Spannweite: 22,5–31,1) war die Abundanz der RPLP0 mRNA deutlich höher (mittlerer Ct-Wert = $22,4 \pm 2,7$; Ct-Wert Spannweite: 19,5–27,1).

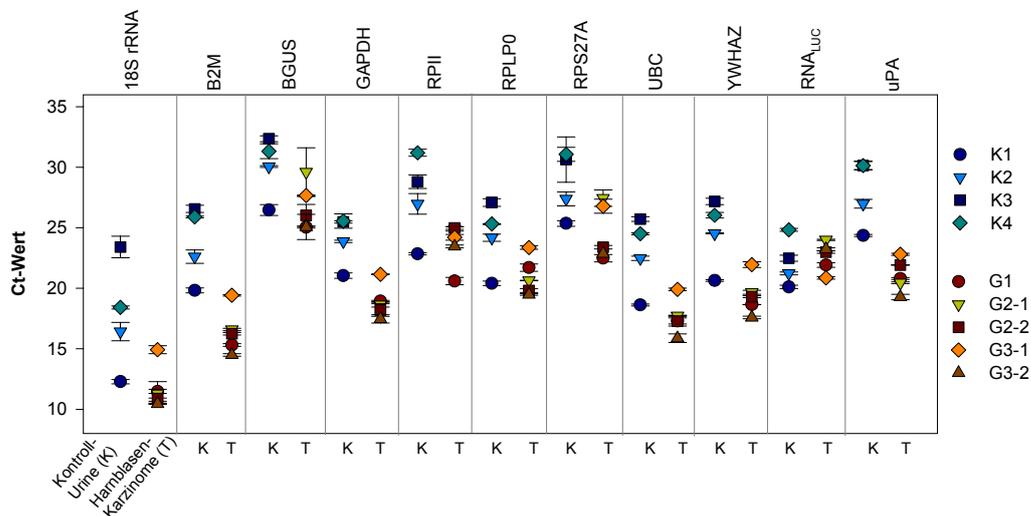


Abb.3-13 Variabilität verschiedener interner Referenz-mRNAs im Gesamturin. Aus Gesamturin von gesunden Spendern (K1 bis K4, $n = 4$) und Patienten mit einem Harnblasenkarzinom (Tumorgrad G1 bis G3, $n = 6$) wurde Gesamt-RNA präpariert. Über RT-qPCR wurden die Ct-Werte (y-Ordinate) der mRNAs interner Referenz-mRNAs in Triplikaten bestimmt (18S rRNA, Beta-2-Mikroglobulin, Beta-Glucuronidase, GAPDH, RNA-Polymerase II, RPLP0, RPS27A, UBC und YWHAZ). Außerdem wurde RNA_{LUC} und der mRNA-Tumormarker uPA bestimmt. Die Symbole markieren die Ct-Wert \pm Standardabweichung der Triplikate.

Die gemessenen Ct-Werte der internen Referenz-(m)RNAs, von RNA_{LUC} sowie des mRNA-Tumormarkers uPA wurden anhand von mitgeführten Standardkurven in Kopienzahlen transformiert. Anschließend wurde die in verschiedenen Urinproben bestimmte Kopienzahl der uPA mRNA über die internen Referenz-(m)RNAs sowie RNA_{LUC} normalisiert. Aus der Abbildung 3-14 J geht hervor, dass die uPA mRNA sehr abundant in Urinproben von Patienten mit einem Harnblasenkarzinom ist. Die Normalisierung des mRNA-Tumormarkers uPA über vier der neun internen Referenz-mRNAs bewirkte keine Trennung von gesunden Spendern und Patienten mit einem Harnblasenkarzinom (Abb.3-14 A,B,E,I). Durch die Normalisierung über B2M war die Abundanz des Tumormarkers in den Kontroll-Urinen sogar höher als in drei der fünf Urine von Patienten mit einem Harnblasenkarzinom. Eine schlechte Trennung der beiden untersuchten Gruppen wurde ebenfalls nach der Normalisierung durch die internen Referenzgene 18S rRNA, RP II sowie YWHAZ erzielt.

3. Ergebnisse

Die beste Trennung durch eine interne Referenz-mRNA wurde durch die Normalisierung über BGUS erreicht. Der berechnete Faktor zwischen der mittleren Abundanz der uPA mRNA der Kontroll-Urine den Harnblasenkarzinom-Urinen betrug 19,6. Somit konnten hier alle Patienten mit einem Harnblasenkarzinom von den gesunden Spendern unterschieden werden.

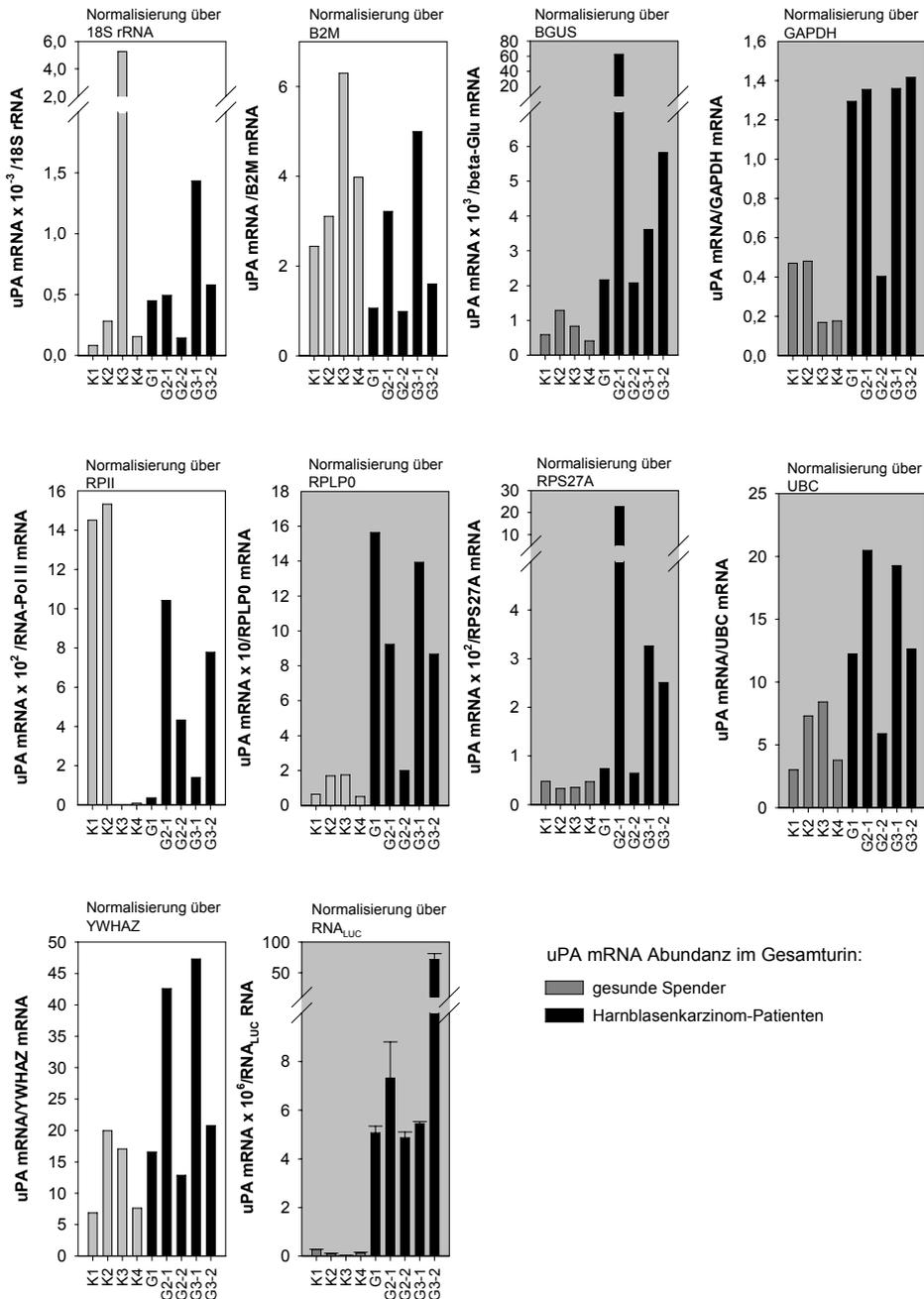


Abb. 3-14 Normalisierung des mRNA-Tumormarkers uPA. Die in Abb.3-13 dargestellten Ct-Werte wurden anhand der mitgeführten Standardkurven in die absolute Kopienzahl transformiert. Anschließend wurde die Abundanz des mRNA-Tumormarkers uPA über die RNAs interner Referenzgene sowie RNA_{LUC} normalisiert.

3. Ergebnisse

Die Normalisierung über RPS27A erlaubte ebenfalls eine 100%ige Trennung der beiden untersuchten Gruppen (Abb.3-14 G). Allerdings war die Abundanz von uPA in den Urinen der Spender G1 und G2-2 nur um den Faktor 1,8 bzw. 1,6 höher als die gemittelte Abundanz in den Kontroll-Urinen. Nach der Normalisierung der uPA mRNA über GAPDH, RPLP0 und UBC konnte der Patient G2-2 nicht den Tumorpatienten zugeordnet werden. Von diesen drei Referenz-mRNAs lag der größte Faktor (8,7) zwischen Kontroll-Urinen und Urinen von Harnblasenkarzinompatienten nach der Normalisierung über RPLP0 vor. Bei der Normalisierung über GAPDH lag nur ein Faktor von 3,6 vor, bei der Normalisierung über UBC betrug der Faktor lediglich 2,5. Für weitere Untersuchungen zur Variabilität der mRNA-Abundanz interner Referenz-mRNAs im Gesamturin wurden RPLP0, GAPDH und UBC ausgewählt, da diese im Gegensatz zu BGUS eine hohe Abundanz im Urin aufweisen.

Um den Einfluss der Tageszeit auf die Zusammensetzung der Referenz-mRNAs GAPDH, UBC und RPLP0 zu untersuchen, wurde Gesamturin morgens, mittags und abends gesammelt und untersucht.

Es zeigte sich, dass die mRNA-Ratio GAPDH/UBC eine hohe Variabilität zwischen unterschiedlichen Tageszeiten aufwies (Abb.3-15 A). Die über alle Spender und Tageszeiten gemittelte mRNA-Ratio betrug $0,64 \pm 0,76$, woraus sich ein hoher $CV_{\text{Inter-Assay}}$ von 117,26% ergab. Innerhalb eines Spenders lag der Faktor zwischen der GAPDH/UBC mRNA-Ratio zu verschiedenen Tageszeiten durchschnittlich bei 2,8. Die gebildete mRNA-Ratio variierte zwischen den verschiedenen Tageszeiten maximal um den Faktor 6,9 (Spender 8), die geringste Variabilität lag im Urin des Spenders 4 vor (Faktor 1,1). Für die zehn Spender wurde ein durchschnittlicher $CV_{\text{Intra-Spender}}$ von 40,67% für die GAPDH/UBC mRNA-Ratio berechnet (Spannweite: 6,52%–71,09%).

Im Gegensatz hierzu war die Variabilität der GAPDH/RPLP0 mRNA-Ratio (Abb.3-15 B) zwischen den Tageszeiten geringer ($CV_{\text{Intra-Spender}} = 25,14\%$; Spannweite: 9,05–62,00%). Für die maximale Tageszeit-abhängige Variabilität dieser Ratio wurde ein Faktor von 3,0 berechnet (Spender 4), der geringste Faktor zwischen den Tageszeiten lag bei 1,17 (Spender 3). Über alle Spender und Tageszeiten ergab sich eine gemittelte mRNA-Ratio von $1,12 \pm 0,49$, woraus ein $CV_{\text{Inter-Assay}}$ von 44,02% errechnet wurde.

Ein anhand des gepaarten, nicht-parametrischen Wilcoxon-Tests durchgeführter Vergleich der GAPDH/UBC mRNA-Ratio zu verschiedenen Tageszeiten zeigte keinen signifikanten Einfluss des Zeitpunkts der Urinabgabe auf das Verhältnis der beiden mRNAs ($p = 0.13$). Für die GAPDH/RPLP0 mRNA-Ratio lag jedoch ein signifikanter Unterschied ($p = 0.05$) zwischen dem morgens abgegeben und dem mittags abgegebenen Urin vor. Für weitere Experimente wurde kein Morgen-Urin, sondern sogenannter Spontanurin (jeder Urin außer der Morgen-Urin) verwendet.

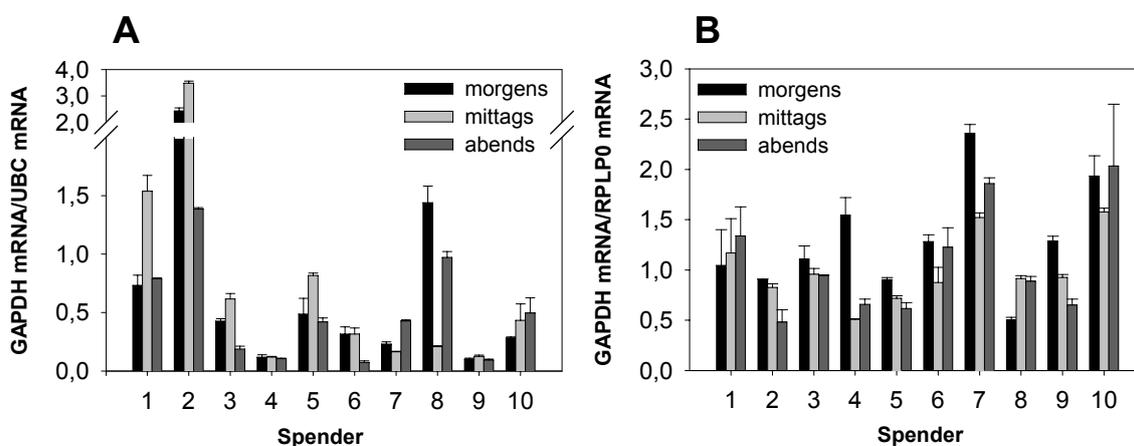


Abb. 3-15 Tageszeitabhängige Varianz interner Referenz-mRNA-Ratios. An den angegebenen Tageszeiten wurden von 10 verschiedenen Spendern Urinproben abgegeben. Aus dem Urin wurde Gesamt-RNA präpariert und über RT-qPCR wurden RNAs der internen Referenz-mRNAs GAPDH, RPLP0 und UBC quantifiziert. **A** Dargestellt ist der Mittelwert der GAPDH/UBC mRNA-Ratio aus zwei unterschiedlichen RNA-Präparationen und – Quantifizierungen mit der entsprechenden Standardabweichung. **B** Analog zu **A** wurde die RPLP0/GAPDH Ratio gebildet.

Für die Untersuchung der Zusammensetzung interner Referenz-mRNAs in verschiedenen Urinfraktionen wurde die GAPDH, RPLP0 und UBC mRNA in der zellfreien Urinfraktion, im Gesamturin und in der zellulären Fraktion von 21 Spendern über RT-qPCR detektiert. Die Ausbeute der RNA-Präparation wurde über den externen RNA-Standard ermittelt. RNA_{LUC} wurde verwendet, um die Kopienzahlen der Referenz-mRNAs zu normalisieren. Dadurch konnten die Abundanzen der internen Referenz-mRNAs in der zellfreien Fraktion mit denjenigen im Gesamturin verglichen werden. Zudem wurden die mRNA-Ratios GAPDH/RPLP0 und GAPDH/UBC gebildet um zu untersuchen, wie stabil die Verhältnisse der mRNAs in den verschiedenen Fraktionen sind.

Die Quantifizierung von RNA_{LUC} in verschiedenen Urinfraktionen von 21 Spendern ergab eine Spannweite der Ausbeute von 0,2–90,1% (Abb.3-16 A). Die Ausbeute war durchschnittlich am höchsten für die zelluläre Fraktion (Mittelwert = 26,5%; Spannweite: 1,6–90,1%; Tabelle 3-6), gefolgt vom Gesamturin (Mittelwert = 15,8%; Spannweite: 0,7–46,9%). Die gemittelte Ausbeute an RNA_{LUC} war am geringsten für die zellfreie Fraktion (Mittelwert = 6,6%; Spannweite: 0,2–22,6%). Durch die hohe Varianz in der RNA_{LUC} -Ausbeute wurde deutlich, dass eine Normalisierung der pro ml Urin detektierten mRNA-Kopienzahlen über RNA_{LUC} notwendig war. Die RNA_{LUC} -normalisierte GAPDH mRNA wurde mit hoher Abundanz im Gesamturin nachgewiesen. In 13 der 21 Urinproben konnten mehr als 10^6 Kopien der GAPDH mRNA pro ml Urin nachgewiesen werden (Median = $1,89 \times 10^6$ Kopien pro ml Urin; Spannweite: $4,91 \times 10^4$ – $2,98 \times 10^8$ Kopien pro ml Urin; Abb.3-16 B).

3. Ergebnisse

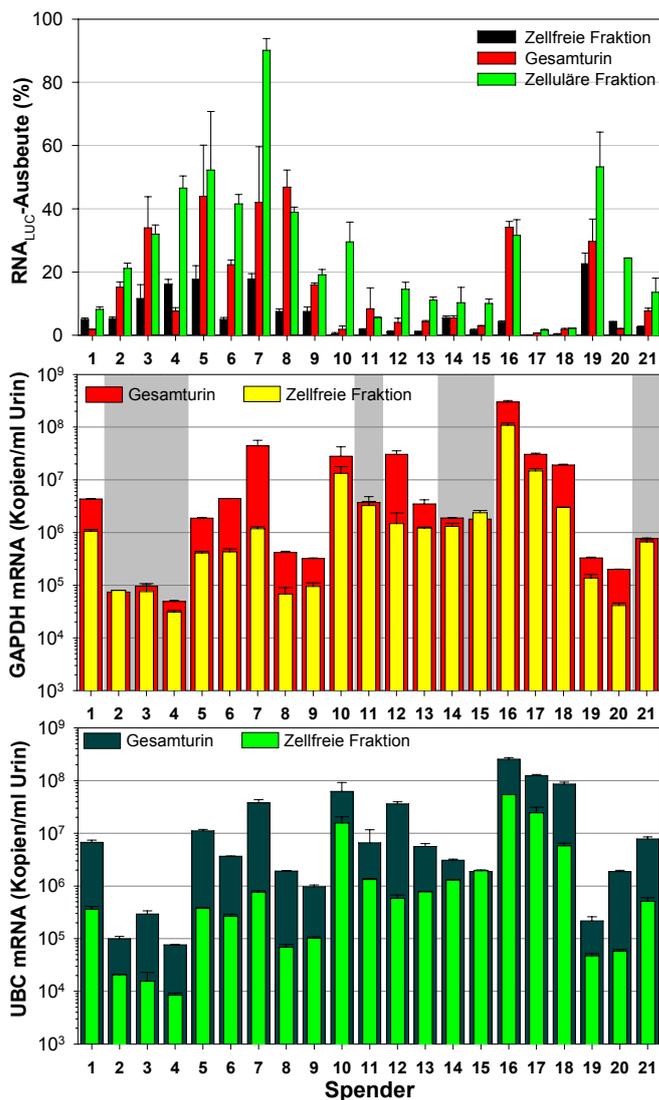
Tabelle 3-7 Detektion von Referenz-mRNAs in verschiedenen Urinfraktionen

Target RNA	CV (%) [*] 1. Gesamt-Urin	CV (%) [*] 2. Zellfreie Urinfraktion	CV (%) [*] 3. Zelluläre Fraktion	Messgröße	Spannweite der RNA-Detektion (Median)
RNA _{LUC}	101	100	82	RNA _{LUC} Kopien/ RNA <i>Input-Spike</i>	1. 0,007 – 0,479 2. 0,001 – 0,226 3. 0,016 – 0,901
GAPDH	377	392	346	GAPDH Kopien/ ml Urin	1. $3,7 \times 10^3 - 1,0 \times 10^8$ ($1,2 \times 10^5$) 2. $1,7 \times 10^3 - 4,4 \times 10^6$ ($2,1 \times 10^5$) 3. $3,8 \times 10^2 - 8,7 \times 10^7$ ($9,3 \times 10^4$)
GAPDH (RNA _{LUC} - normalisiert)	286	321	338	GAPDH Kopien/ ml Urin	1. $4,9 \times 10^4 - 3,0 \times 10^8$ ($1,9 \times 10^6$) 2. $3,1 \times 10^4 - 1,1 \times 10^8$ ($1,1 \times 10^6$) 3. $8,1 \times 10^2 - 2,8 \times 10^8$ ($5,5 \times 10^5$)
RPLP0	315	203	262	RPLP0 Kopien/ ml Urin	1. $2,9 \times 10^3 - 1,1 \times 10^7$ ($7,6 \times 10^4$) 2. $4,5 \times 10^3 - 6,4 \times 10^5$ ($1,4 \times 10^4$) 3. $4,3 \times 10^2 - 6,2 \times 10^6$ ($3,2 \times 10^4$)
RPLP0 (RNA _{LUC} - normalisiert)	201	216	233	RPLP0 Kopien/ ml Urin	1. $3,8 \times 10^4 - 3,9 \times 10^7$ ($1,7 \times 10^6$) 2. $2,8 \times 10^4 - 3,5 \times 10^7$ ($6,8 \times 10^5$) 3. $9,1 \times 10^2 - 2,0 \times 10^7$ ($2,9 \times 10^5$)
UBC	344	367	313	UBC Kopien/ ml Urin	1. $5,9 \times 10^3 - 8,6 \times 10^7$ ($3,9 \times 10^5$) 2. $1,1 \times 10^3 - 2,2 \times 10^6$ ($1,6 \times 10^4$) 3. $1,4 \times 10^3 - 8,0 \times 10^7$ ($3,4 \times 10^5$)
UBC (RNA _{LUC} - normalisiert)	196	247	254	UBC Kopien/ ml Urin	1. $7,7 \times 10^4 - 2,5 \times 10^8$ ($5,6 \times 10^6$) 2. $8,5 \times 10^3 - 5,4 \times 10^7$ ($5,1 \times 10^5$) 3. $4,4 \times 10^3 - 2,6 \times 10^8$ ($2,2 \times 10^6$)

^{*}Inter-Assay-Variationskoeffizient der in der RNA-Detektion

Zudem wurde die Abundanz zellfreier GAPDH mRNA bestimmt. Die Untersuchung ergab, dass die zellfreie GAPDH mRNA einen großen Anteil der Gesamt-RNA Fraktion ausmachte (Median = $1,1 \times 10^6$ Kopien pro ml Urin, Tabelle 3-6). Der gemittelte Anteil an zellfreier GAPDH mRNA im Gesamturin lag bei 46,9%. In einigen Urinproben konnte die detektierte GAPDH mRNA fast vollständig auf zellfreie RNA zurückgeführt werden (Abb.3-16 B: Spender 2, 11, 15 und 21). Die Abundanz der RPLP0 mRNA pro ml Gesamturin und zellfreiem Urin war vergleichbar mit der GAPDH mRNA (Median_{Gesamturin} = $1,7 \times 10^6$ Kopien; Median_{Zellfreie Fraktion} = $6,8 \times 10^5$ Kopien). Von der UBC mRNA konnten im Gesamturin von 16 der 21 Spender über 10^7 Kopien pro ml Urin detektiert werden (Abb.3-16 C), wodurch die Abundanz (Median = $3,7 \times 10^6$ Kopien pro ml Urin; Spannweite: $7,6 \times 10^4 - 2,5 \times 10^8$ Kopien pro ml Urin) höher war als die der GAPDH mRNA. Allerdings war der Anteil der zellfreien UBC mRNA im Gesamturin gegenüber der GAPDH mRNA geringer (Median_{Zellfreie Fraktion} = $5,1 \times 10^5$ Kopien pro ml; Median_{Gesamturin} = $5,6 \times 10^6$ Kopien). Der gemittelte Anteil an zellfreier UBC mRNA im Gesamturin betrug lediglich 16,9%.

3. Ergebnisse



A

B

C

Abb. 3-16
Detektierbarkeit von RNA_{LUC} und internen Referenz-mRNAs in verschiedenen Urinfraktionen von 21 Spendern. (A) Ausbeute von RNA_{LUC} nach der RNA-Präparation und – Quantifizierung. Aus Urin wurden drei verschiedene Fraktionen hergestellt (1. zellfreie Fraktion, 2. zelluläre Fraktionen, 3. Gesamturin). Die GuSCN-stabilisierten Urinfraktionen wurden mit 10⁷ Kopien des externen RNA Standards RNA_{LUC} versetzt, und die Gesamt-RNA wurde präpariert. Die Quantifizierung der RNA_{LUC}-Ausbeute erfolgte über RT-qPCR in Triplikaten. Die Balken stellen die Mittelwerte ± Standardabweichung aus zwei unabhängigen RNA-Präparationen dar. (B + C) GAPDH bzw. UBC RNA Kopienzahlen pro ml Urin. Die Kopienzahlen der mRNA wurden nach der Präparation der Gesamt-RNA über RT-qPCR detektiert und auf RNA_{LUC} normalisiert, um Abweichungen in dem RNA-Präparationsschritt zu kompensieren. Die Balken stellen die Mittelwerte ± Standardabweichung aus zwei unabhängigen RNA-Präparationen dar. Die qPCR wurde in Triplikaten durchgeführt.

Von den detektierten internen Referenz-mRNAs wurden Ratios gebildet, welche über die verschiedenen Fraktionen und Urinproben normalerweise nur eine geringe Variabilität zeigen dürften. Die Mittelwerte der GAPDH/UBC mRNA-Ratio (Abb.3-17 A) waren vergleichbar für Gesamturin (Mittelwert = 0,59) und die zelluläre Fraktion (Mittelwert = 0,50), jedoch war der Koeffizient für die Inter-Assay Variabilität mit 59,92% für Gesamturin niedriger gegenüber der zellfreien Fraktion (CV = 91,36%). Die Mediane dieser Fraktionen unterschieden sich um den Faktor 1,8 (Median_{Gesamturin} = 0,61 bzw. Median_{zelluläre Fraktion} 0,34). Anhand des gepaarten, nicht-parametrischen Wilcoxon Tests ergab sich ein signifikanter Unterschied zwischen den GAPDH/UBC mRNA-Ratios im Gesamturin und der zellulären Fraktion ($p = 0,01$; $n = 21$). Die GAPDH/UBC mRNA-Ratio der zellfreien Fraktion (Mittelwert = 1,84; Median = 1,56; CV_{Inter-Assay} = 63,35%) unterschied sich signifikant ($p < 0,001$) von den beiden anderen Fraktionen. Die mittleren GAPDH/RPLP0 mRNA-Ratios (Abb.3-17 B) im Gesamturin und in der zellulären Fraktion sowie die Mediane waren höher als die der GAPDH/UBC mRNA-Ratio (Gesamturin: Mittelwert = 3,02 bzw. Median = 1,39; zelluläre Fraktion: Mittelwert = 3,59 bzw. Median = 1,89). Die GAPDH/RPLP0 mRNA-

3. Ergebnisse

Ratios waren nicht signifikant unterschiedlich zwischen den beiden Fraktionen ($p = 0,07$). In der zellfreien Fraktion war die mittlere GAPDH/RPLP0 mRNA-Ratio mit 1,39 um die Hälfte niedriger im Vergleich zu den anderen Fraktionen, der Median betrug 1,02. Daraus ergab sich ein signifikanter Unterschied zwischen den mRNA-Ratios der zellfreien Fraktion und Gesamturin sowie der zellfreien Fraktion und der zellulären Fraktion vor ($p < 0,001$). Die Koeffizienten für die Inter-Assay Variabilität der GAPDH/RPLP0 mRNA-Ratio im Gesamturin, der zellfreien und zellulären Fraktion waren deutlich höher als bei der GAPDH/UBC mRNA-Ratio und lagen bei 113,81%, 106,42% bzw. 107,02%.

Die folgenden Experimente wurden auf der Grundlage von Gesamturinproben durchgeführt, da sich bei der GAPDH/RPLP0 mRNA-Ratio kein signifikanter Unterschied zwischen der zellulären Fraktion und Gesamturin ergab.

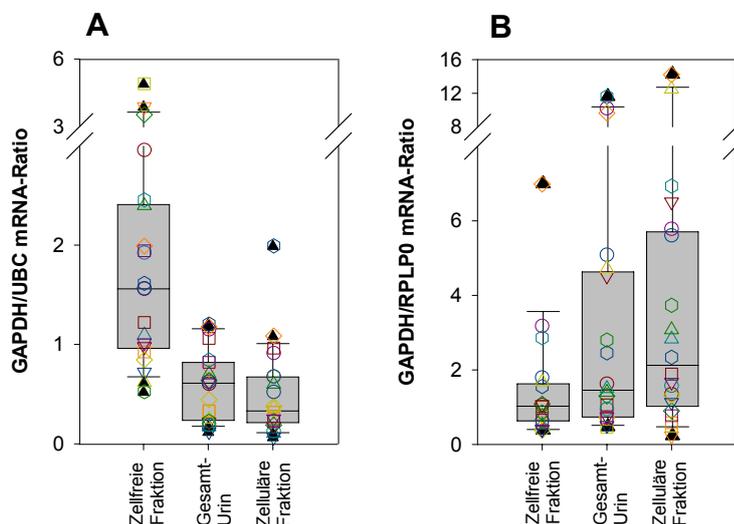


Abb. 3-17

Interne Referenz-mRNAs Ratios in unterschiedlichen Urinfraktionen.

Aus Urin von 21 Spenden wurden drei verschiedene Fraktionen hergestellt (1. zellfreie Fraktion, 2. zelluläre Fraktionen, 3. Gesamturin). Gesamt-RNA wurde präpariert und die mRNAs der internen Referenzgene GAPDH, RPLP0 und UBC wurden in Triplikaten über RT-qPCR detektiert. Anhand der ermittelten Kopienzahlen wurden die mRNA-Ratios GAPDH/UBC (A) und GAPDH/RPLP0 (B) gebildet. Die Linie innerhalb der Boxen repräsentiert den Median, die Boxen repräsentieren das 25. und 75. Perzentil. Fehlerbalken begrenzen das 10. und 90. Perzentil. Außerhalb liegende Werte werden durch ein Symbol angezeigt.

3.2.1.3.4 Bestimmung der RNase-Aktivität im Urin

Zur Untersuchung, ob die unterschiedlichen Ausbeuten des externen RNA-Standards bei der Präparation von Gesamt-RNA aus Urin mit der RNase-Aktivität im Urin korreliert, wurde parallel zur Bestimmung der RNA_{LUC}-Ausbeute die RNase-Aktivität im Urin von zehn verschiedenen Spendern untersucht. Für die Bestimmung der RNase-Aktivität wurde ein artifizielles RNA-Substrat verwendet, welches an den Sequenzenden mit einem Fluorophor bzw. einem Quencher markiert ist. Folglich kommt es in Abwesenheit von RNasen bei einer Anregung des Fluorophors nicht zur Emission von Fluoreszenz. In Anwesenheit von RNasen wird das RNA-Substrat gespalten, wodurch der Quencher räumlich vom Fluorophor getrennt wird und nach Anregung Fluoreszenz emittiert wird. Die Menge an RNase in den Urinproben ergibt sich aus der Rate der Fluoreszenzzunahme (siehe Abb. 3-18 B). In der Abb.3-18 A ist die Standardkurve abgebildet, welche die enzymatische Aktivität verschiedener definierter Einheiten an RNase A darstellt. Diese Standardgerade

3. Ergebnisse

wurde für die Berechnung der RNase-Aktivität im Urin verwendet. In der Abb.3-18 B wird die relative Fluoreszenzzunahme pro Zeiteinheit durch die Spaltung des RNase Substrats in verdünnten Urinproben von zehn unterschiedlichen Spendern präsentiert.

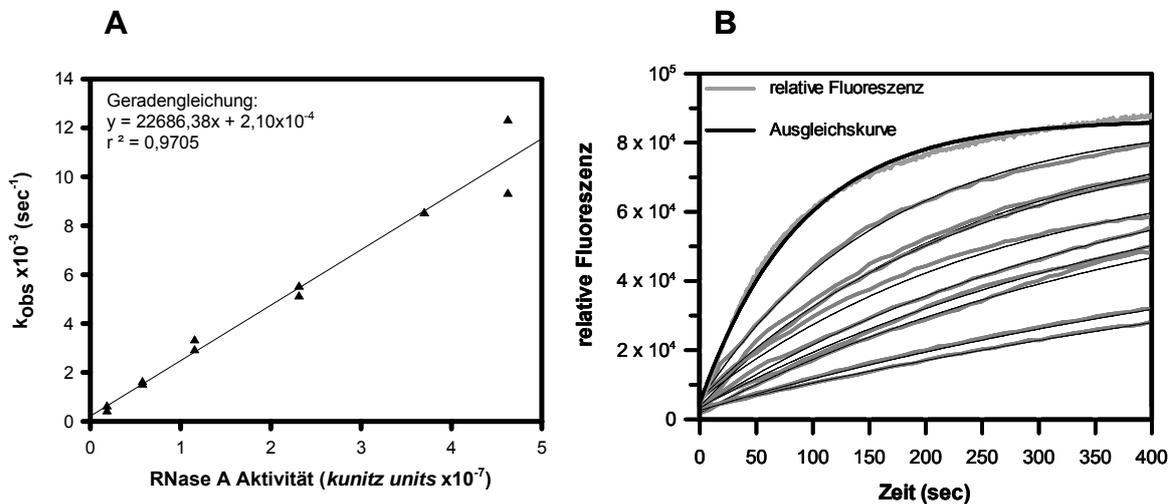


Abb. 3-18 Bestimmung der RNase-Aktivität im Urin. (A) Standardgerade zur Bestimmung der RNase A-Aktivität. Durch die Zugabe eines RNase A-Standards (0,19, 0,58, 1,16, 2,31, 3,70, 4,63 $\times 10^{-7}$ Kunitz Units) wurde die Spaltung eines Fluoreszenz/Quencher-markierten Substrats initiiert. Die daraus resultierende Zunahme an relativer Fluoreszenz wurde zeitabhängig gemessen. Durch die einzelnen Messpunkte wurde eine exponentielle Ausgleichskurve gelegt, aus der die Geschwindigkeit der Spaltung (k_{obs}) abgeleitet wurde. Die Daten basieren auf zwei unterschiedlichen Verdünnungsreihen des RNase A-Standards. (B) Enzymatische RNase-Aktivität im Urin von unterschiedlichen Spendern ($n = 10$). Die grauen Linien stellen die Zunahme an relativer Fluoreszenz (y-Ordinate) pro Zeiteinheit (x-Ordinate) dar. Die Ausgleichskurve ist in schwarz dargestellt.

Von den in Abb.3-18 B dargestellten Ausgleichskurven wurde die Geschwindigkeit der Reaktion (k_{obs}) abgeleitet und anhand der Standardgerade in RNase A-Äquivalente (Kunitz Units) transformiert. In den Urinproben von zehn verschiedenen Spendern variierte die RNase-Aktivität um eine log-Stufe (Spannweite: $9,2 \times 10^{-3}$ – $9,2 \times 10^{-4}$ Kunitz Units/ml). Die gemittelte RNase-Aktivität lag bei $3,3 \times 10^{-4}$ Kunitz Units/ml. Ein Vergleich der RNase-Aktivität im Urin mit der Ausbeute an RNA_{LUC} nach der RNA-Präparation ergab keine signifikante Korrelation (Korrelationskoeffizient nach Pearson: $r = -0,450$, $p = 0,182$; Abb.3-19 A). Außerdem konnte keine signifikante Korrelation zwischen der RNase-Aktivität im Urin mit der Kopienzahl an GAPDH mRNA beobachtet werden ($r = 0,089$, $p = 0,807$; Abb.3-19 B). Daraus schließt sich, dass geringe Ausbeuten von RNA_{LUC} nicht auf eine hohe RNase-Aktivität im Urin zurückgeführt werden können.

3. Ergebnisse

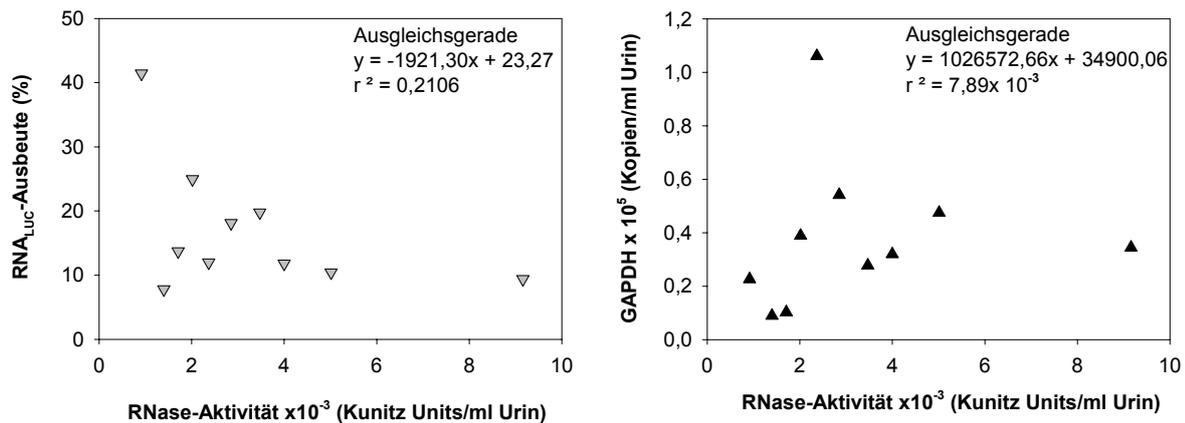


Abb. 3-19 Einfluss der RNase-Aktivität im Urin auf die Ausbeute der RNA-Präparation. A Die RNase Aktivität wurde gegen die Ausbeute von RNA_{LUC} nach der RNA-Präparation aufgetragen. Die Ausbeute von RNA_{LUC} wurde in Relation zu der Kopienzahl gesetzt, welche den Urinproben vor der Präparation hinzugefügt wurde. Die prozentuale RNA_{LUC}-Ausbeute repräsentiert den Mittelwert aus zwei unabhängigen RNA-Präparationen und -Quantifizierungen mittels RT-qPCR. Die gemessene RNase-Aktivität basiert aus zwei unabhängigen Verdünnungen, aus denen der Mittelwert gebildet wurde. **B** Vergleich zwischen der RNase-Aktivität im Urin und der detektierten Kopienzahl von GAPDH mRNA.

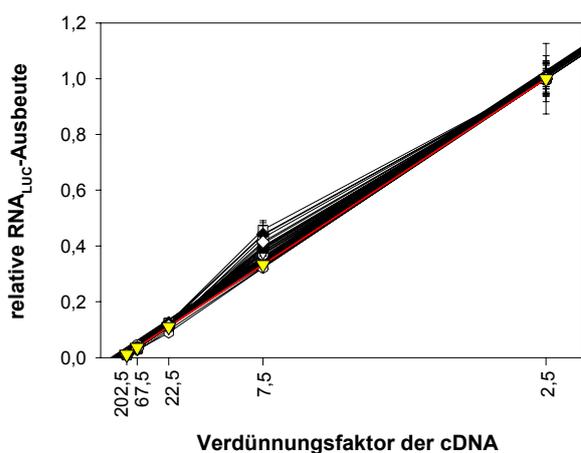
3.2.1.3.5 Spender-abhängiger Einfluss der Urin-Zusammensetzung auf die Detektion von RNA

Im vorangehenden Kapitel konnte gezeigt werden, dass die Variabilität in der RNA_{LUC}-Ausbeute von einem Faktor 8 (7,8–41,4%) nicht auf die RNase-Aktivität zurückgeführt werden konnte. Daher wurden “Spike”-Experimente auf der Grundlage dieser Urinproben durchgeführt (zur Übersicht siehe Abb. 3-9), um den Einfluss der Urin-Zusammensetzung auf die RT-qPCR zu untersuchen. Urin variiert in Spender-abhängiger Weise unter anderem bezüglich der Zusammensetzung von Zellen, Salzen, Proteinen und Nucleinsäuren, wodurch die RNA-Präparation und -Quantifizierung beeinflusst werden kann. Zur Überprüfung, ob die Schwankung in der RNA_{LUC}-Ausbeute auf mit-aufgereinigte inhibitorische Substanzen zurückzuführen war, wurden von den cDNAs (n = 20) jeweils fünf unterschiedliche Verdünnungen in die qPCR eingesetzt (Abb. 3-20). Die relative RNA_{LUC}-Ausbeute war am höchsten bei einer 7,5-fachen Verdünnung der cDNA. Hier war die mittlere relative RNA_{LUC}-Ausbeute im Vergleich zu konzentrierter cDNA um den Faktor 1,17 höher. Bei dieser Verdünnungsstufe lag zwischen den zehn verschiedenen Proben ein maximaler Faktor in der relativen RNA_{LUC}-Ausbeute von 1,4 vor, der Inter-Assay CV betrug 9%. Bei einer weiteren Verdünnung verringerte sich die relative RNA_{LUC}-Ausbeute geringfügig. Für die Detektion von mRNA-Tumormarkern (Kapitel 3.3) wurde deshalb eine 8-fach verdünnte cDNA in die qPCR eingesetzt. Zudem konnten keine starken Schwankungen in der relativen RNA_{LUC}-Ausbeute beobachtet werden, wenn die Zugabe von RNA_{LUC} erst nach der RNA-Präparation erfolgte. Der Maximale Faktor in der RNA_{LUC}-Ausbeute betrug 1,6, der CV betrug 14%. Die Schwankungen in der RNA_{LUC}-Ausbeute des gesamten Analyse-Prozesses resultierten somit nicht aus einer Inhibierung der reversen

3. Ergebnisse

Transkriptase-Reaktion. Aus den Urinproben dieser Spender wurde ebenfalls Gesamt-RNA in Duplikaten unter Verwendung des Standardprotokolls präpariert. Mit diesem Experiment konnte demonstriert werden, dass die Zusammensetzung der verschiedenen Urinproben keinen wesentlichen Einfluss auf die sich an die RNA-Präparation anschließenden Enzymreaktionen hat. Demzufolge war die hohe Variabilität in der RNA_{LUC}-Ausbeute auf den RNA-Präparations-Prozess selbst zurückzuführen.

Abb.3-20



Inhibitionseffekt der Urin-Zusammensetzung auf die RNA_{LUC}-Ausbeute. Stabilisierte Urinproben von 10 verschiedenen Spendern wurden 10^7 Kopien RNA_{LUC} hinzugefügt. Gesamt-RNA wurde in Duplikaten präpariert und in cDNA umgeschrieben. Von den cDNAs wurden fünf verschiedene Verdünnungsstufen (2,5; 7,5; 22,5; 67,5; 202,5) hergestellt und die RNA_{LUC} Kopienzahl (x-Ordinate) wurde mittels qPCR in Triplikaten bestimmt (weisse Dreiecke, schwarze Linien). Die errechnete RNA_{LUC}-Kopienzahl in der 2,5-fach verdünnten cDNA wurde gleich eins gesetzt, um die relative Ausbeute an RNA_{LUC} (y-Ordinate) in den weiteren Verdünnungsstufen zu bestimmen. Die in rot dargestellte Linie zeigt die erwartete (theoretische) relative RNA_{LUC}-Ausbeute in den Verdünnungen der cDNA (gelbe Dreiecke) an.

3.2.2 Potentielle mRNA-Tumormarker des Harnblasenkarzinoms

Auf der Basis des ausführlich charakterisierten und robusten Systems zur Präparation von Gesamt-RNA und zur Quantifizierung von spezifischen mRNA-Sequenzen im Gesamturin war die Entwicklung eines RT-qPCR-basierten Urin-Tests zur sensitiven Diagnostik von Harnblasenkarzinomen denkbar. Zur Identifikation relevanter RNA-Tumormarker des Harnblasenkarzinoms war es notwendig, ein Set an tumorrelevanten mRNAs im Gesamturin von Tumorpatienten und gesunden Spendern zu messen. Hierfür wurde zuerst mit einer kleinen „Trainings“-Population an Harnblasenkarzinom-Patienten und gesunden Spendern ein RT-qPCR-Array durchgeführt. Der Array ermöglichte die gleichzeitige Detektion von 84 verschiedenen mRNAs, welche an der Transformation und Tumorigenese beteiligt sind. Die über den Array identifizierten, sowie weitere in der Literatur beschriebene, potentielle mRNA-Tumormarker wurden anschließend in Gesamturinproben einer größeren „Test“-Population von Harnblasenkarzinompatienten sowie gesunden Spendern untersucht.

3.2.2.1 RT-qPCR-basiertes *Screening* von 84 potentiellen mRNA-Tumormarkern im Urin

Analog zum Procedere bei der Analyse von miRNAs (siehe Kapitel 3.1.2), wurde zunächst ein kommerzieller RT-qPCR-Array (RT²-Profiler, SuperArray) durchgeführt, um nach potentiellen mRNA-Tumormarkern im Urin von Harnblasenkarzinompatienten zu suchen. Hierzu wurde Gesamt-RNA aus Urin von vier G1-Harnblasenkarzinompatienten und vier gesunden Spendern präpariert. Für die insgesamt acht Array-Experimente wurden nach der Reversen Transkriptase-Reaktion jeweils ein Aliquot der cDNA für die Detektion von 84 verschiedenen mRNAs eingesetzt. Anhand der Arrays wurden mRNAs untersucht, deren translatierte Proteine in die Apoptose, Zellseneszenz, Zelladhäsion, Angiogenese, Invasion, Metastasierung, Zellzyklus-Kontrolle, DNA-Reparatur, Signaltransduktion und Transkription involviert sind.

Im Array-Experiment erfolgte die Detektion der mRNAs über SYBR Green I als Fluoreszenzreporter, wodurch Schmelzkurvenanalysen der PCR-Produkte durchgeführt werden konnten [97]. Aus der Analyse ging hervor, dass nicht für alle der 84 mRNAs spezifische qPCR-Produkte generiert wurden. In der Abb. 3-21 werden die Schmelzkurven der in Tabelle 3-7 aufgeführten mRNAs anhand eines gesunden Spenders und eines G1-Tumor-Patienten dargestellt. Aus der Abbildung gehen die Schmelztemperaturen von 88,4°C für β -Aktin, 89,1°C für BAX, 90,7°C für BCL2L1, 87,0°C für CC3, 88,5°C für ETS2 und 87,5°C für uPA hervor. Im Gegensatz zur Urinprobe des Harnblasenkarzinompatienten (Abb.3-21 B & C, rechte Bildhälften) war die detektierte Menge an BAX- und BCL2L1-mRNA im Urin des gesunden Spenders gering (Abb.3-21 B & C, linke Bildhälften). Homogene PCR-Produkte sind in einer Darstellung, bei welcher die Abnahme der Fluoreszenz als Funktion der Temperatur aufgetragen wird ($-d\text{Fluoreszenz}/d\text{Temperatureinheit}$), durch einen einzelnen schmalen Peak gekennzeichnet. Neben dem eigentlichen Produkt kam es in einigen Proben zur Ausbildung von Primer-Dimeren, welche durch eine geringe Schmelztemperatur und einen breiteren Peak gekennzeichnet sind. Während der PCR kompetiert die Formation der Primer-Dimere mit derjenigen des spezifischen Produkts, wodurch die Effizienz der Amplifikation reduziert wird.

Bei dem Entwurf von PCR-Amplikons wird versucht, die Ausbildung von Primer-Dimeren zu verhindern, indem die Primer eine geringe Komplementarität im Bereich der 3'-Sequenzenden aufweisen. Zusätzlich kann durch Veränderung der in die PCR eingesetzten MgCl₂-Konzentration und durch die Optimierung der *Annealing*-Temperatur die Ausbildung von Primer-Dimeren reduziert werden. Diese Kriterien wurden bei den in dieser Arbeit entworfenen Amplikons berücksichtigt, wodurch die Ausbildung von Primer-Dimeren vermieden wurde (Anhang, Abschnitt 7.2). Für das erste *Screening* 84 verschiedener tumorrelevanter mRNAs mit dem kommerziellen RT-qPCR Array konnte allerdings keine Optimierung vorgenommen werden.

3. Ergebnisse

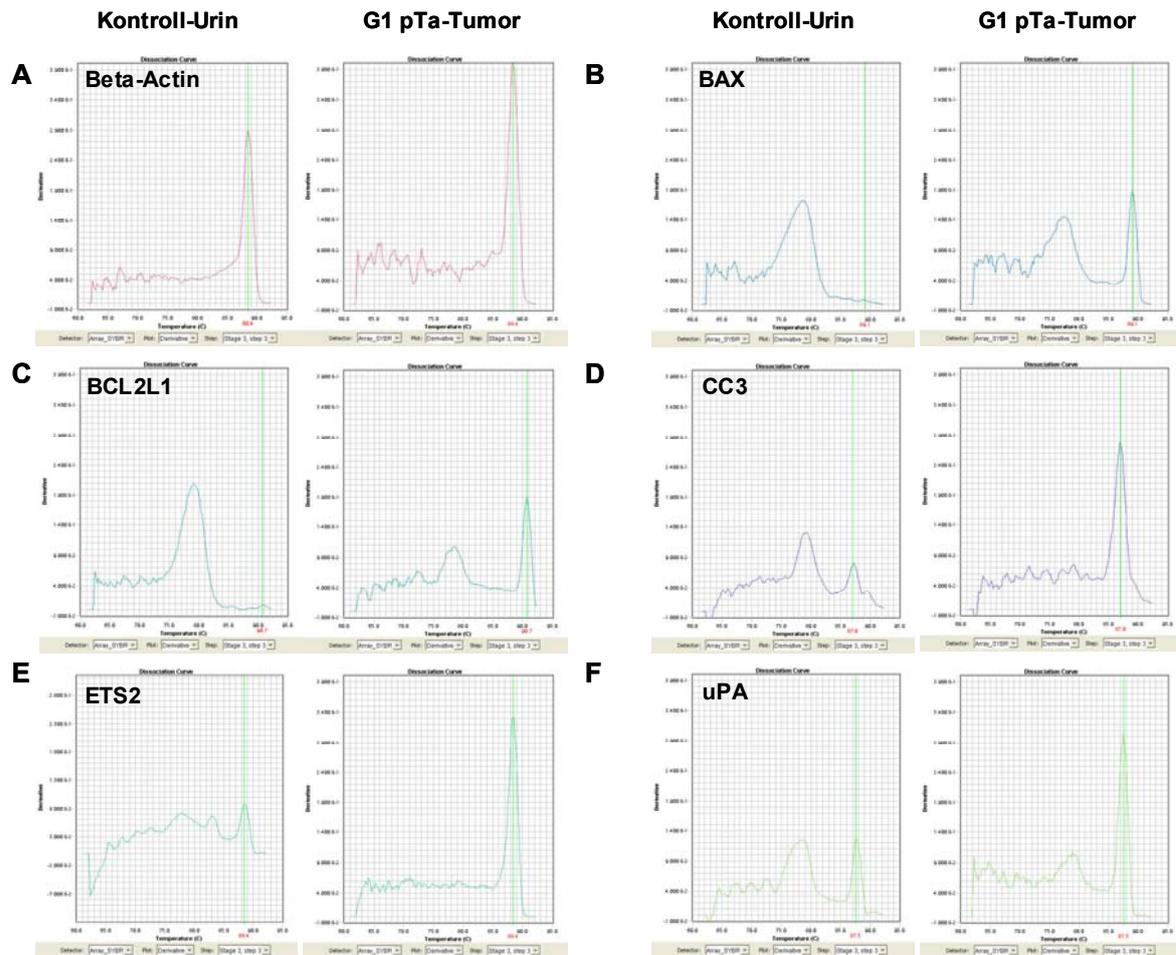


Abb. 3-21 Schmelzkurven der aus dem Array-Experiment ausgewählten mRNAs . Auf der rechten Seite sind exemplarisch die Schmelzkurven nach der RT-qPCR-basierten Detektion von mRNAs im Urin von Patienten mit einem G1-Harnblasenkarzinom dargestellt. Die linke Bildhälfte repräsentiert Schmelzkurven, welche auf der Basis von Urin eines gesunden Spenders generiert wurden. Auf der y-Ordinate ist die erste Ableitung der relativen Fluoreszenz dargestellt (*Derivative*, -0,01–0,4). Auf der x-Ordinate ist die Temperatur (60–95°C) aufgetragen. Die Schmelztemperatur des PCR-Produktes wird durch eine grüne vertikale Linie angezeigt.

Die Abundanz gemessener Urin-assoziiertes mRNAs wurden über die interne Referenz-mRNA β -Aktin normalisiert. Es muss aber beachtet werden, dass die berechneten Abundanzen aufgrund der beschriebenen Ausbildung von Primer-Dimeren fehlerbehaftet sein können. Anhand der erstellten Daten wurde ein Set von mRNA-Tumormarkern (BAX, BCL2L1, CC3, ETS2, uPA) ausgewählt, welche im Urin von Harnblasenkarzinompatienten mit einer höheren Abundanz gegenüber gesunden Spendern vorlagen. Die relative Abundanz dieser mRNAs im Urin ist in der Tabelle 3-7 dargestellt, die höhere Abundanz der Tumormarker im Urin der Harnblasenkarzinompatienten ist grau unterlegt. Aus der Analyse geht hervor, dass in mindestens 50% der Urine von Tumorpateinten diese mRNAs gegenüber denjenigen in den Kontroll-Urinen erhöht sind. Beispielsweise wie die ETS2

3. Ergebnisse

mRNA in den Urinen der Tumorpatienten 2, 3 und 4 eine 62-fach, 4-fach bzw. 12-fach erhöhte Abundanz gegenüber den Kontroll-Urinen auf (bei Patient 1 lediglich 1,2-fach).

Tabelle 3-7 Relative Abundanz ausgewählter RNA Tumormarker

Detektierte mRNA	Relative Abundanz ^A (Tumoren vs Kontrollen)	Relative Abundanz ^B (G1, pTa-1 vs Kontrollen)	Relative Abundanz ^B (G1, pTa-2 vs Kontrollen)	Relative Abundanz ^B (G1, pTa-3 vs Kontrollen)	Relative Abundanz ^B (G1, pTa-4 vs Kontrollen)
BAX	1,52	1,66	0,93	2,42	1,06
BCL2L1	1,22	0,22	1,90	0,86	1,90
CC3	4,83	4,99	2,28	10,00	2,04
ETS2	18,16	1,16	62,37	3,77	11,75
uPA	5,93	0,63	8,48	14,26	0,34

^ADie Werte repräsentieren die gemittelte relative mRNA-Abundanz im Urin der G1-Tumorpatienten

^BDie Werte repräsentieren die relative mRNA-Abundanz im Urin eines einzelnen G1-Tumorpatienten gegenüber vier gemittelter Kontroll-Urine

Für die weiteren Experimente zur Untersuchung der ausgewählten mRNAs in einem größeren Set von Urinproben wurden neue Amplikons entworfen.

3.2.2.2 Rationale Auswahl publizierter mRNA-Tumormarker

Die Expression von Uroplakin 1A (UPK1A) ist in verschiedenen Tumorschichten von Harnblasenkarzinomen erhöht [98] und wurde deshalb als potentieller mRNA-Tumormarker ausgewählt. Uroplakine werden in der Membran von differenzierten Umbrella-Zellen der Harnblase exprimiert und als Urothelium-spezifische Marker für die terminale Differenzierung des Urothels beschrieben [99]. Durch immunohistochemische Untersuchungen konnten Uroplakine auch in Lymphknotenmetastasen von humanen Harnblasenkarzinomen nachgewiesen werden. Für UPK1A konnte gezeigt werden, dass die Expression in Harnblasenkarzinomen sehr hoch ist und somit während der malignen Transformation in Tumoren konserviert ist [100]. Im Blut von Harnblasenkarzinompatienten mit zirkulierenden Tumorzellen (CTCs) konnte ebenfalls eine erhöhte Abundanz der Uroplakin-1A, -1B, -2 und -3 mRNA nachgewiesen werden [101]. In dieser Studie von Osman *et al.* konnten CTCs über die mRNA-Ratio UPK1A/UPK2 mit einer Sensitivität von 75% und einer Spezifität von 50% identifiziert werden.

Das Protein und die mRNA von Onkoprotein 18/Stathmin 1 (OP18) werden in einer Vielzahl von besonders aggressiven Karzinomen sehr hoch exprimiert. In Adenokarzinomen der Lunge konnte gezeigt werden, dass die Menge des OP18-Proteins in moderat differenzierten Karzinomen im Vergleich zu hochdifferenzierten Tumoren signifikant erhöht ist [102]. In Zellkulturexperimenten mit Lungenkarzinom-Zelllinien wurde dies ebenfalls beobachtet. Die erhöhte OP18-Protein-Expression korrelierte zudem signifikant mit der Abundanz von OP18 mRNA. Bei akuter Leukämie [103], Lymphomen [104], Neuroblastomen [105], Adenokarzinomen der Prostata [106], Leberzellkarzinomen [107], oralen Plattenepithelkarzinomen [108], Ovarialkarzinomen und Mammakarzinomen

3. Ergebnisse

[109] konnte ebenfalls eine erhöhte OP18-Expression beobachtet werden, wobei die Menge an OP18 in schlecht differenzierten und progressiven Tumoren signifikant höher war. Diese Beobachtungen weisen auf eine globale Rolle von OP18 bei der Progression von Tumoren hin. Es wird angenommen, dass OP18 die Aufgabe eines Schalters in diversen Signaltransduktionskaskaden übernimmt und dadurch Zellwachstum sowie Differenzierung beeinflusst werden [110]. Bei der Zellteilung bewirkt OP18 die Depolymerisierung der Mikrotubuli im Verlauf der Anaphase und/oder verhindert die Polymerisierung von Tubulin-Heterodimeren [111]. Zu Beginn der Mitose wird die depolymerisierende Aktivität von OP18 durch Phosphorylierung eingestellt um die Ausbildung der mitotischen Spindel zu gewährleisten [112]. Diese Erkenntnisse lassen darauf schließen, dass eine Überexpression von OP18 mit Entdifferenzierung und höheren Zellproliferationsraten assoziiert ist, wodurch OP18 möglicherweise auch einen potentiellen Tumormarker für Harnblasenkarzinome darstellen könnte.

Ki-67 wird in allen Phasen des Zellzyklus (G1, S, G2), nicht aber in ruhenden Zellen exprimiert [113] und ist somit streng mit der Zellproliferation assoziiert. Es konnte gezeigt werden, dass es eine Korrelation zwischen der hohen Expression des Proteins und dem frühen Wiederauftreten eines Tumors bei Patienten mit oberflächlichen Harnblasenkarzinomen gibt [114]. Im Gesamturin von Patienten mit einem Harnblasenkarzinom konnte eine erhöhte Kopienzahl der Ki-67 mRNA nachgewiesen werden. Dabei war die Abundanz bei G1-Tumoren allerdings höher als bei G2- und G3-Tumoren [115]. Aufgrund dessen wurde in dieser Arbeit die Ki-67 mRNA ebenfalls im Urin von Harnblasenkarzinompatienten detektiert.

In der folgenden Tabelle werden alle mRNA-Tumormarker aufgeführt, welche im Rahmen dieser Arbeit im Gesamturin von Harnblasenkarzinompatienten, gesunden Spendern und Patienten mit einer Harnwegsinfektion genauer untersucht wurden.

Tabelle 3-8 Potentielle mRNA-Tumormarker

Symbol (Name des Gens)	Funktion/ Beschreibung	Quelle
BAX (BCL2-assoziiertes Protein X)	Pro-apoptotisches Protein [116]	RT-qPCR-Array
BCL2L1 (BCL2-like 1)	Anti-apoptotisches Protein [117]	RT-qPCR-Array
CC3 (30kDa HIV-1 Tat interaktives Protein 2)	Pro-apoptotisches Protein, Metastasis-Suppressor [118]	RT-qPCR-Array
ETS2 (v-Ets erythroblastosis virus E26 oncogene homolog 2, avian)	Transkriptionsfaktor, überexprimiert beim Prostatakarzinom und Mammakarzinom [119]	RT-qPCR-Array
Ki-67 (antigen identified by monoclonal antibody Ki-67)	Abundant im Urin von Harnblasenkarzinompatienten [115]	Tumormarker
OP18 (Onkoprotein 18)	Ubiquitäres cytosolisches Phosphoprotein, welches das Mikrotubuli Filament System reguliert [120]	Tumormarker
TC3 (Spleißvariante von CC3)	Anti-apoptotisches Protein [121]	Spleißvariante von CC3
uPA (Urokinase Plasminogen Aktivator)	Serine Protease, welche die Extrazelluläre Matrix degradiert; überexprimiert beim Harnblasenkarzinom [39]	RT-qPCR-Array, Tumormarker
UPK1A (Uroplakin 1A)	Transmembranes Protein, beteiligt an Signal Transduktion; überexprimiert beim Harnblasenkarzinom [100]	Tumormarker

3.2.4 Detektion ausgewählter mRNA-Tumormarker im Urin von Harnblasenkarzinompatienten

Anhand der RT-qPCR-Array Analyse im Urin von G1-Harnblasenkarzinompatienten wurden 5 potentielle mRNA-Tumormarker identifiziert. Außerdem wurden nach Literaturrecherche 4 weitere, mRNA-Tumormarker ausgewählt (Tabelle 3-8). Zusätzlich wurde die interne Referenz-mRNA GAPDH sowie RNA_{LUC} in die Studie aufgenommen.

Im Folgenden sollte an Urinproben von Harnblasenkarzinompatienten (n = 61) und gesunden Spendern (n = 37) überprüft werden, ob diese mRNAs für eine Diagnostik des Harnblasenkarzinoms geeignet sind. Der Nachweis der (m)RNAs erfolgte über RT-qPCR mit sequenzspezifischen TaqMan®-Sonden. Durch quantitative Zugabe von RNA_{LUC} konnten Spender-abhängige Variabilitäten in der RNA-Ausbeute normalisiert werden, wodurch die Bestimmung der genauen Kopienzahl der jeweiligen Tumormarker ermöglicht wurde. Die Kopienzahlen der detektierten mRNAs wurden anhand einer in der RT-qPCR mitgeführten Standardkurve bestimmt. Die Nachweisgrenze der Messung lag bei den durchgeführten Messungen bei 10 Kopien pro Reaktionsansatz. Die Abbildung 3-22 stellt das Schema für die Detektion von potentiellen mRNA-Tumormarkern im Urin dar.

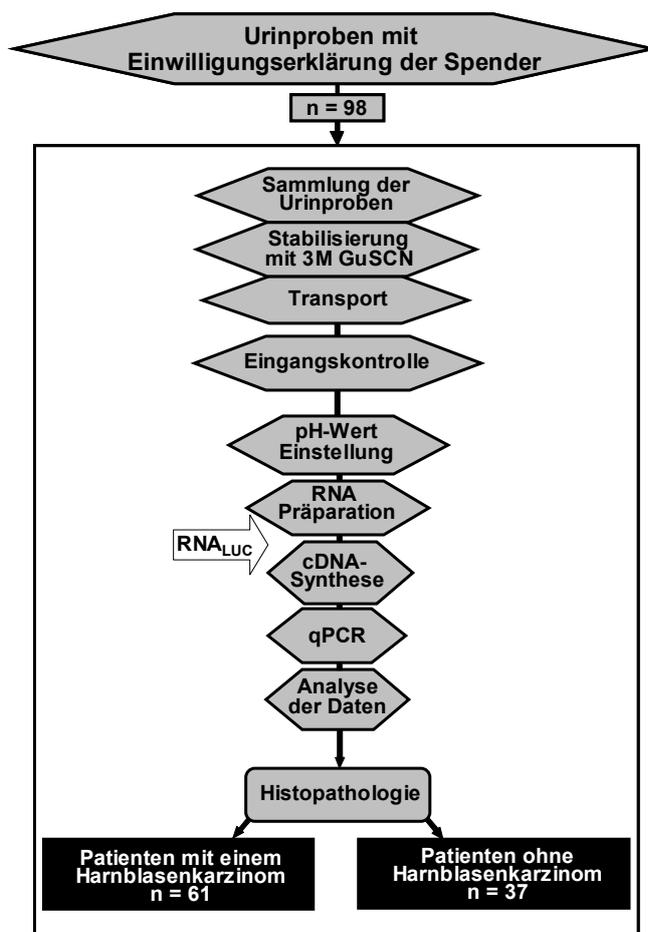


Abb. 3-22

Schema zur RNA-Präparation und -Quantifizierung im Urin von Harnblasenkarzinompatienten und gesunden Spendern. Hexagonale Boxen repräsentieren standardisierte Prozeduren. Die Zugabe von RNA_{LUC} wird durch den weißen Pfeil markiert.

3.2.3.1 Detektion von Harnblasenkarzinomen über die Urin-assoziierte mRNA-Ratio ETS2/uPA

Zur Unterscheidung von Harnblasenkarzinompatienten von gesunden Spendern anhand der mRNA basierten Urinuntersuchungen wurden statistische Analysen durchgeführt. Die statistische Auswertung der Tumormarkeranalyse zeigte, dass die mRNA-Ratio ETS2/uPA ein potentes diagnostisches Mittel zur Trennung zwischen Harnblasenkarzinompatienten und gesunden Spendern darstellt.

Die Verteilung der ETS2/uPA mRNA-Ratio ist nach dem Differenzierungsgrad der Harnblasenkarzinome (G1-G3) in der Abbildung 3-23 dargestellt. Die ETS2/uPA mRNA-Ratio war im Urin von G3-Harnblasenkarzinompatienten am höchsten ($\text{Median}_{G3} = 1,68$; $\text{Median}_{G2} = 1,16$; $\text{Median}_{G1} = 1,02$; $\text{Median}_{\text{gesunde Spender}} = 0,40$). Ferner war die ETS2 und uPA mRNA im Gesamturin aller untersuchten Spender ($n = 98$) sehr abundant (Abb. 3-23 B bzw. C). Diese Tatsache ermöglichte eine robuste Detektion dieser mRNAs mittels RT-qPCR ($\text{Median}_{\text{ETS2 mRNA}} = 4,64 \times 10^5$ Kopien pro ml Urin; $\text{Median}_{\text{uPA mRNA}} = 4,84 \times 10^5$ Kopien pro ml Urin; normalisiert über RNA_{LUC} ; $n = 98$).

Lediglich bei vier gesunden Spendern lag der Intra-Assay CV über 25% (Abb. 3-22, Patienten K-14, K-20, K-22 und K-27, siehe Pfeile). Das entspricht 11% der gesunden Spender. Hier wurden unter 100 Kopien pro Reaktion detektiert, wodurch die Messgenauigkeit verschlechtert wurde. Bei zwei dieser Spender war die RNA_{LUC} -Ausbeute geringer als 2%, bei Spender K-27 betrug die RNA_{LUC} -Ausbeute nur 7%. Lediglich bei Spender K-20 war die RNA_{LUC} -Ausbeute mit 45% hoch. Bei den Harnblasenkarzinompatienten hingegen wurde nur bei drei Urinen eine erhöhte Messgenauigkeit von über 25% festgestellt (Spender G1-2, G2-4 und G3-2), was einen prozentualen Anteil von 5% ausmacht. Hier konnten die Abweichungen in den Triplikaten der RT-qPCR ebenfalls auf geringe Kopienzahlen von unter 100 pro Reaktionsgefäß zurückgeführt werden. Auch hier war die RNA_{LUC} -Ausbeute mit $\leq 10\%$ gering. Derart niedrige RNA-Ausbeuten beruhen eventuell auf einer sehr wässrigen Urinprobe (grosse Trinkmenge vor der Urinabgabe) oder auf Substanzen welche die RNA-Präparation möglicherweise beeinflussen (z.B. Medikamente, Nahrungsmittel). Bei Urinproben mit geringen RNA-Ausbeuten empfiehlt es sich, eine zweite Urinprobe (z.B. konzentrierten Morgenurin) zu untersuchen. Im Rahmen dieser Studie wurden diesbezüglich keine weiteren Untersuchungen durchgeführt.

3. Ergebnisse

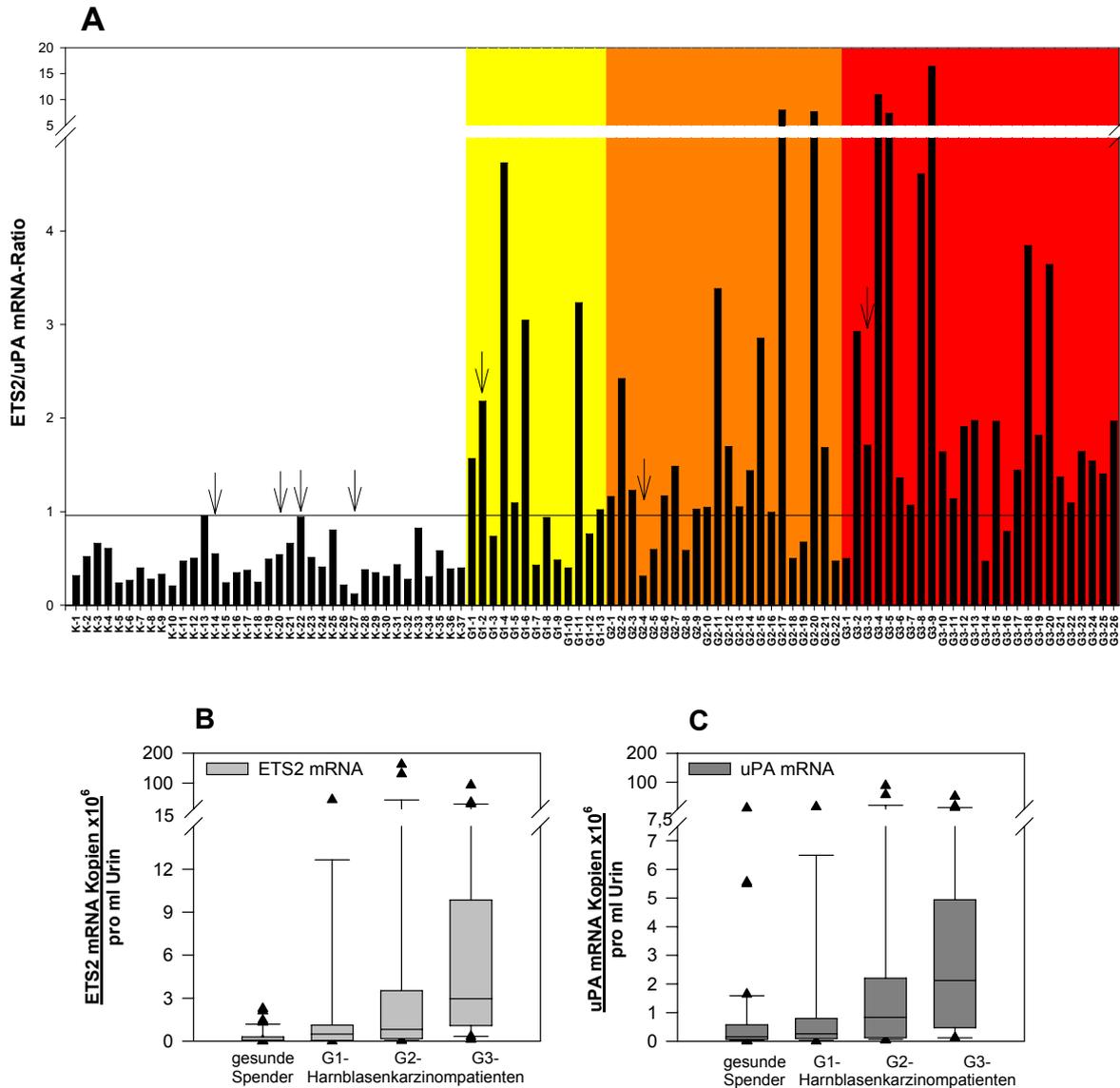


Abb. 3-23 **Urin-assoziierte ETS2/uPA mRNA-Ratio.** Gesamt-RNA wurde aus Urin präpariert und die Kopien der ETS2 und uPA mRNA wurden in Triplikaten mittels RT-qPCR bestimmt. Auf der linken Hälfte der Abbildung ist die ETS2/uPA mRNA-Ratio im Urin von gesunden Spendern (K-1 bis K-37) abgebildet. In der rechten Bildhälfte ist die ETS2/uPA mRNA-Ratio im Urin der Harnblasenkarzinompatienten dargestellt (G1-Harnblasenkarzinome: G1-1 bis G1-13, gelb unterlegt; G2-Harnblasenkarzinome: G2-1 bis G2-22, orange unterlegt; G3-Harnblasenkarzinome: G3-1 bis G3-26, rot unterlegt). Die schwarze Linie zeigt den Schwellenwert von 0,96 an, bei welchem eine Spezifität von 100% erreicht wird. Die Pfeile zeigen Proben an, bei denen der Intra-Assay CV über 25% lag. **(B)** und **(C)** Boxplot der ETS2 bzw. uPA mRNA (Kopien pro ml Urin, RNA_{LUC}-normalisiert). Die Linie innerhalb der Boxen repräsentiert den Median, die Boxen repräsentieren das 25. und 75. Perzentil. Fehlerbalken begrenzen das 10. und 90. Perzentil. Außerhalb des 10. und 90. Perzentils liegende Werte werden durch ein Symbol angezeigt.

Die Verteilung der ETS2/uPA mRNA-Ratio in der G1-, G2-, G3-Tumorgruppe sowie der Kontroll-Gruppe wurde anhand eines Box-Plots dargestellt (Abb-3-24 A). Zur Untersuchung, ob sich die ETS2/uPA mRNA-Ratios in den verschiedenen Tumorgruppen

3. Ergebnisse

signifikant unterscheiden, wurde der H-Test nach Kruskal und Wallis durchgeführt. Hierzu wurden die Patienten zuerst nach dem Differenzierungsgrad des Tumors (G1, G2, G3) gruppiert. Der Test ergab keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen ($p = 0,071$). Eine Einteilung der Harnblasenkarzinompatienten nach dem Tumorstadium (pTa, pTis, pT1, pT2, pT3) ergab ebenfalls keinen signifikanten Unterschied in der ETS2/uPA mRNA-Ratio ($p = 0,078$).

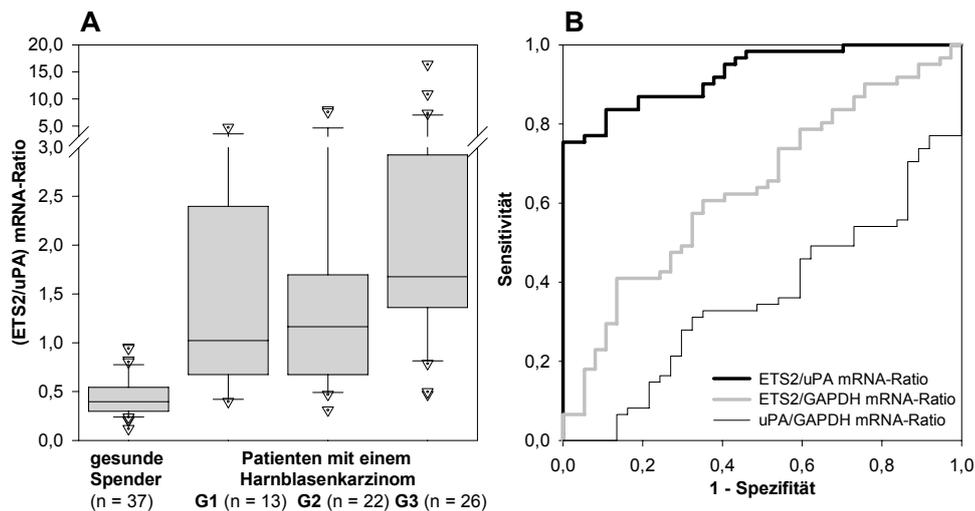


Abb. 3-24 **Diagnostische Aussagekraft der ETS2/uPA mRNA-Ratio.** (A) Boxplot der ETS2/uPA mRNA-Ratio (gestaffelt nach Differenzierungsgrad der Tumoren). Aus Gesamturin von 37 gesunden Spendern und 61 Harnblasenkarzinompatienten wurde Gesamt-RNA präpariert. Die Detektion der mRNAs erfolgte mittels RT-qPCR in Triplikaten. Die Linie innerhalb der Boxen repräsentiert den Median, die Boxen repräsentieren das 25. und 75. Perzentil. Fehlerbalken begrenzen das 10. und 90. Perzentil. Außerhalb des 10. und 90. Perzentils liegende Werte werden durch ein Symbol angezeigt. (B) ROC-Kurven der mRNA-Ratios. Die dicke schwarze Linie zeigt die diagnostische Aussagekraft der ETS2/uPA mRNA-Ratio an, die graue Linie repräsentiert die ETS2/GAPDH mRNA-Ratio, die dünne schwarze Linie stellt die uPA/GAPDH mRNA-Ratio dar.

Für die Beurteilung der diagnostischen Aussagekraft der mRNA-Tumormarker, wurden ROC-Kurven erstellt. Die ROC-Kurve der ETS2/uPA mRNA-Ratio (Abb.3-24 B) wies eine große Fläche unter Kurve auf (AUC = 0,929; 95% Konfidenzintervall, 0,882–0,976). Bei einem Schwellenwert von 0,96 konnten Harnblasenkarzinome mit einer Spezifität von 100% und einer Sensitivität von 75,4% über die ETS2/uPA mRNA-Ratio identifiziert werden. Werden die sieben Messdaten mit einer Messungenauigkeit von über 25% (siehe Abb. 3-23) aus der Berechnung herausgenommen ergibt sich eine Spezifität von 100% und eine Sensitivität von 75,9%. Im Gegensatz dazu hatte die Normalisierung der einzelnen mRNAs über die interne Referenz-mRNA GAPDH keine diagnostische Aussagekraft (AUC_{ETS2/GAPDH} = 0,638; 95% Konfidenzintervall, 0,527–0,750 bzw. AUC_{uPA/GAPDH} = 0,359; 95% Konfidenzintervall, 0,250 – 0,469).

In der Tabelle 3-9 wird die diagnostische Aussagekraft der ETS2/uPA mRNA-Ratio für die Detektion verschiedener Patientengruppen zusammengefasst. Die AUCs weiterer mRNA-Tumormarker-Ratios mit geringer diagnostischer Aussagekraft werden in der Tabelle 7-2 im Anhang aufgeführt.

3. Ergebnisse

Tabelle 3-9 ETS2/uPA-basierte Detektion von Harnblasenkarzinomen

Tumorgruppe*	Spezifität ^{A,B}	Sensitivität ^{A,B}	ROC-Analyse		Asymptotisches 95% Konfidenzintervall	
	(%)	(%)	AUC	p	Untergrenze	Obergrenze
G1 (n = 13)	100 ^A ; 89,2 ^B	53,8 ^A ; 76,9 ^B	0,881	< 0,001	0,775	0,988
G2 (n = 22)	100 ^A ; 89,2 ^B	72,7 ^A ; 72,7 ^B	0,910	< 0,001	0,830	0,993
G3 (n = 26)	100 ^A ; 89,2 ^B	88,5 ^A ; 92,3 ^B	0,967	< 0,001	0,924	1,009
G2 + G3	100 ^A ; 89,2 ^B	81,3 ^A ; 83,3 ^B	0,941	< 0,001	0,895	0,988
G1 + G2 + G3	100 ^A ; 89,2 ^B	75,4 ^A ; 82,0 ^B	0,929	< 0,001	0,882	0,976

*Die aufgeführten Tumorgruppen wurden den gesunden Spendern (n = 37) gegenüber gestellt

^ASchwellenwert ETS2/uPA = 0,96

^BSchwellenwert ETS2/uPA = 0,73

Der Anstieg der ETS2/uPA mRNA-Ratio im Urin von Patienten mit einem Harnblasenkarzinom gegenüber Kontroll-Urinen lässt sich möglicherweise dadurch erklären, dass in Folge einer Aktivierung von Rezeptor-Tyrosin-Kinasen (RTKs) und der sich anschließenden Ras/Raf/Mek/Erk-Kinase-Signaltransduktionskaskade ETS2 phosphoryliert und somit aktiviert wird [122]. Bei der Entstehung von papillären nicht-invasiven Ta-Tumoren ist der RTK-Ras-Signalweg konstitutiv aktiviert [25]. Eine weitere Aktivierung von ETS2 kann über den PI3K/Akt-Signalwegs erfolgen [123]. Dieser Signalweg kann bei dem Vorliegen einer mutierten Form des Tumorsuppressors *PTEN* nicht blockiert werden.

Neben Urinproben von gesunden Spendern und Patienten mit Harnblasenkarzinomen wurden die ausgewählten mRNAs ebenfalls im Urin von Patienten mit einer Harnwegsinfektion untersucht. Es zeigte sich, dass in Urinproben von Infektionspatienten eine deutlich erhöhte ETS2/uPA mRNA-Ratio vorlag (Abb.3-25). Der Median der ETS2/uPA mRNA-Ratio von 3,23 im Urin von Infektionspatienten war um den Faktor 2,24 höher als der Median im Urin der Harnblasenkarzinompatienten. Da nicht nur bei den Harnblasenkarzinompatienten, sondern auch bei den Patienten mit Harnwegsinfekten erhöhte ETS2/uPA mRNA-Ratios nachzuweisen waren, war hiermit die diagnostische Aussagekraft der ETS2/uPA mRNA-Ratio deutlich gesenkt. Bei lediglich zwei der fünfzehn untersuchten Infektions-Urine war die ETS2/uPA mRNA-Ratio mit 0,32 und 0,86 geringer als der Schwellenwert von 0,96, wodurch die falsch-positiv Rate von 0% auf 25% anstieg. Ein Vergleich der Infektions-Urine (n = 15) sowie Kontroll-Urine (n = 37) mit Urinproben von Harnblasenkarzinompatienten (n = 61) ergab eine wesentlich geringere AUC von 0,741 (95% Konfidenzintervall, 0,640–0,842). Bei dem für die ETS2/uPA mRNA-Ratio gewählten Schwellenwert von 0,96 lag die Sensitivität wie zuvor bei 75,4%, die Spezifität verringerte sich allerdings erheblich von 100% auf 75,0%.

Die meisten Harnwegsinfektionen werden durch uropathogene *E. coli* Stämme (UPEC) hervorgerufen. In Folge der angeborenen Immunantwort wird der Besiedelung des Urothels mit Bakterien durch eine massive Abschilferung der obersten Urothelschichten, entgegengesteuert. Humane Blasenepithelzellen exprimieren Toll-like Rezeptor 4 (TLR 4) auf der Zelloberfläche. Nach dem Binden von Lipopolysaccharid (LPS) der Gram-negativen Bakterienzellwand an den TLR 4 kann es zur Initialisierung einer Signalkaskade kommen. Infolgedessen werden Mitogen-aktivierten Proteinkinasen (wie z.B. MAP3K und ERK 1/2),

3. Ergebnisse

aktiviert, was zur Translokation von NF- κ B und AP-1 in den Zellkern führt. Dadurch kommt es sowohl zur Transkriptionsaktivierung Apoptose-relevanter mRNAs als auch IL-6. Die abgeschilferten Epithelzellen stellen die Hauptquelle von proinflammatorischen Zytokinen und Chemokinen im Urogenitaltrakt dar, was zur Rekrutierung von Neutrophilen und letztendlich zur Entfernung der Bakterien führt [zusammengefasst in 124]. Über ERK 1/2 wird auch ETS2 aktiviert.

Die erhöhte ETS2/uPA mRNA-Ratio könnte somit auf die wahrscheinliche Transkriptionsaktivierung von ETS2 in Folge der bakteriellen Entzündung zurückgeführt werden.

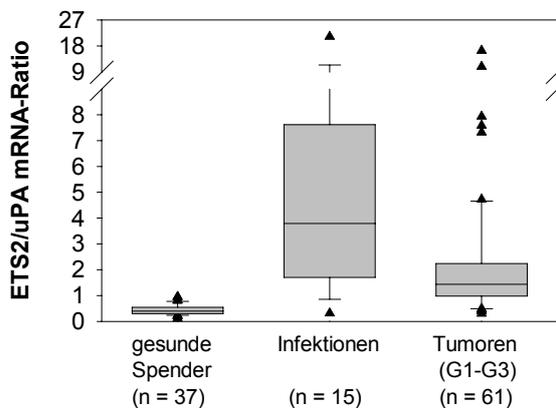


Abb. 3-25

ETS2/uPA mRNA-Ratio im Urin von Patienten mit einer Harnwegsinfektion. Zusätzlich zu den in Abb.3-24 A untersuchten Urinen wurde die ETS2/uPA mRNA-Ratio im Gesamturin von Infektionspatienten (n = 15) bestimmt. Die Boxen repräsentieren das 25. und 75. Perzentil, die Linie innerhalb der Boxen stellt den Median dar. Fehlerbalken begrenzen das 10. und 90. Perzentil. Außerhalb des 10. und 90. Perzentils liegende Werte werden durch ein Symbol angezeigt.

Um die Harnwegsinfektionspatienten von den anderen beiden Patientengruppen unterscheiden zu können, wurde ein weiterer, Infektions-spezifischer Marker gesucht. Durch Bildung einer weiteren Ratio (ETS2/OP18) war es möglich die Infektionspatienten sehr effizient zu detektieren (Abb. 3-26 A). Es zeigte sich, dass im Urin von Patienten mit einer Harnwegsinfektion die ETS2/OP18 mRNA-Ratio im Vergleich zu den übrigen Patientengruppen deutlich höher ist. Der Mechanismus der ETS2 Aktivierung im Rahmen einer Entzündung wurde oben bereits beschrieben. Die hierzu im Verhältnis stark verringerte Abundanz der OP18 mRNA lässt sich sehr wahrscheinlich durch die Induktion von Apoptose im Rahmen einer Entzündungsreaktion erklären. Nach der bakteriellen Infektion kommt es durch die Aktivierung von p53 zur Induktion von Apoptose über die p53-vermittelte Transkriptionsaktivierung von BAX. Aktiviertes p53 kann aber die Transkription der OP18 mRNA reprimieren [125], wodurch die Abundanz uringebundener OP18 mRNA deutlich verringert würde.

Die in der Abb.3-26 B dargestellte ROC für ETS2/OP18 mRNA-Ratio zeigt eine höchst signifikante ($p < 0,0001$) Abtrennung der Infektionspatienten (n = 15) von den Harnblasenkarzinompatienten (n = 61) und den gesunden Spendern (n = 37). Die daraus resultierende AUC wies eine Fläche von 0,918 auf (95% Konfidenzintervall, 0,843 – 0,994). Der Schwellenwert für die ETS2/OP18 mRNA-Ratio wurde auf den Wert 40 festgelegt. Von den 15 Infektions-Urinen lag die ETS2/OP18 bei 13 Urinproben über diesem Schwellenwert. Die zwei übrigen Urine wiesen eine niedrige ETS2/uPA mRNA-Ratio auf

3. Ergebnisse

und führten somit nicht zu einem falsch-positiven Testergebnis. Bei diesen Patienten scheint die Infektionsreaktion am Abklingen gewesen zu sein, zumal bei der Patientin mit der kleinsten ETS2/OP18 mRNA-Ratio keine Leukozyten und kein Nitrit im Urin nachgewiesen wurden.

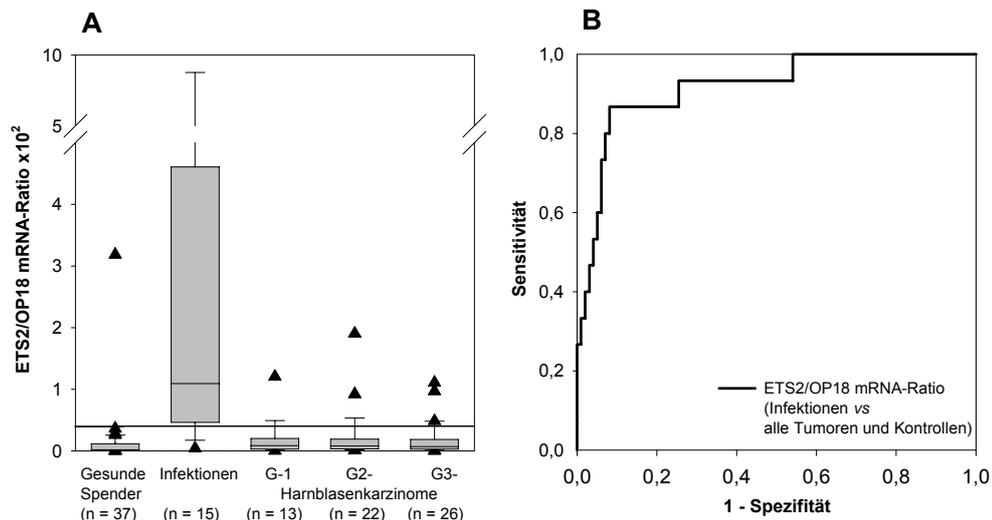


Abb. 3-26 ETS2/OP18 mRNA-Ratio im Urin von gesunden Spendern, Harnwegsinfektionspatienten und Patienten mit einem Harnblasenkarzinom. (A) Boxplot der ETS2/OP18 mRNA-Ratio (gestaffelt nach Differenzierungsgrad des Tumors). Aus Gesamturin von 37 gesunden Spendern, 15 Infektionspatienten und 61 Patienten mit einem Harnblasenkarzinom wurde Gesamt-RNA präpariert. Die Detektion ausgewählter mRNAs erfolgte über RT-qPCR in Triplikaten. Die Linie innerhalb der Boxen repräsentiert den Median, die Boxen repräsentieren das 25. und 75. Perzentil. Fehlerbalken begrenzen das 10. und 90. Perzentil. Außerhalb des 10. und 90. Perzentils liegende Werte werden durch ein Symbol angezeigt. Die schwarze Linie innerhalb der Abbildung gibt den gewählten Schwellenwert von 40 an. (B) Diagnostische Aussagekraft der ETS2/OP18 mRNA-Ratio. Die dicke schwarze ROC Linie zeigt die diagnostische Aussagekraft der ETS2/OP18 mRNA-Ratio für die Trennung der gesunden Patienten und Tumorpatienten von den Patienten mit einer Harnwegsinfektion.

Bei einer klinisch gesunden Spenderin wurde ebenfalls eine erhöhte ETS2/OP18 mRNA-Ratio nachgewiesen. Allerdings wurden in diesem Fall ebenfalls Leukozyten (75 Leukozyten pro μ l Urin) und Nitrit im Urin nachgewiesen, was ebenfalls auf eine Infektion hindeutete.

Von den 61 Tumorpatienten wurden schließlich anhand der ETS2/OP18 Ratio 7 Patienten der Gruppe der Infektionen zugeordnet. Hiermit war folglich eine Aussage über das Tumorverhalten mittels der ETS2/uPA mRNA-Ratio nicht möglich. Alle sieben Urine wiesen eine deutlich über dem Schwellenwert (0,96) liegende ETS/uPA mRNA-Ratio auf. In drei dieser Urine wurde eine hohe Zahl Leukozyten (≥ 75 Leukozyten pro μ l Urin) und/oder Nitrit im Urin nachgewiesen, was auf eine Infektion hindeutete. Bei den anderen vier Urinen war leider kein Test zum Nachweis einer Infektion durchgeführt worden.

3.2.3.2 OP18/UPK1A als malignitätsspezifische mRNA-Ratio im Urin

Die OP18 und UPK1A mRNAs wurden ebenfalls in den Urinproben der verschiedenen Gruppen analysiert. Aus den mRNAs wurde eine Ratio gebildet, und die Harnblasenkarzinome wurden sowohl nach dem Differenzierungsgrad des Tumors als auch nach dem Tumorstadium gruppiert (Abb. 3-27 A). Nach dem H-Test nach Kruskal und Wallis lag ein höchst signifikanter Unterschied sowohl zwischen den G1-, G2- und G3-Tumoren als auch zwischen den pTa-, pT1-, pT2-, pT3- und pTis-Tumoren vor ($p = 0,0005$ bzw. $p = 0,0001$). Im Weiteren wurden die Unterschiede zwischen einzelnen Tumorguppen unter Verwendung des Mann-Whitney-U-Tests spezifiziert. Die OP18/UPK1A mRNA-Ratio zeigte keine signifikante Trennung ($p = 0,14$), wenn die Gruppe aller Tumorpatienten mit der Gruppe der gesunden Spender verglichen wurde (AUC = 0,590; 95% Konfidenzintervall, 0,478–0,702). Wie man der Abb. 3-27 A entnehmen kann, war der Unterschied zwischen G1- und G2-Tumoren nicht signifikant ($p = 0,335$), der Unterschied zwischen G1- und G2-Tumoren *versus* G3-Tumoren war aber höchst signifikant ($p = 0,0001$).

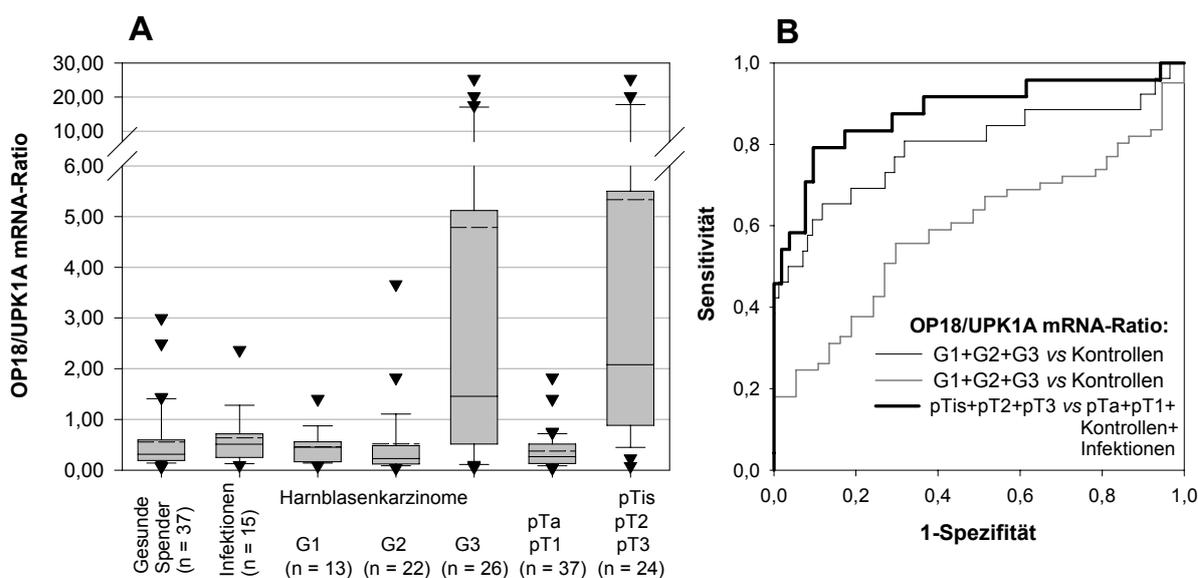


Abb. 3-27 Diagnostische Aussagekraft der mRNA-Tumormarker Ratio OP18/UPK1A. **(A)** Box-Plot der OP18/UPK1A mRNA-Ratio im Urin von gesunden Spendern, Patienten mit einer Harnwegsinfektion und Patienten mit Harnblasenkarzinomen. Gesamt-RNA wurde aus Urinproben der angegebenen Spender präpariert und anschließend wurde die Abundanz der OP18 sowie der UPK1A mRNA mittels RT-qPCR in Triplikaten bestimmt. Die durchgezogene Linie innerhalb der Boxen stellt den Median, die gestrichelte Linie innerhalb der Boxen den Mittelwert dar. Die Boxen repräsentieren das 25. und 75. Perzentil, die Balken repräsentieren das 10. und 90. Perzentil. Außerhalb des 10. und 90. Perzentil liegende Werte werden als Dreiecke angezeigt. **(B)** Auf der Basis der in **(A)** dargestellten OP18/UPK1A mRNA-Ratios der verschiedenen Patientengruppen wurde eine ROC-Kurve angefertigt.

Bei der Gruppierung der Harnblasenkarzinome nach dem Tumorstadium lag zwischen den pTa- und pT1-Tumoren sowie zwischen den pT2- und pT3-Tumoren kein signifikanter Unterschied vor ($p = 0,316$ bzw. $p = 0,721$). Ferner unterschieden sich die pT2- und pT3-

3. Ergebnisse

Tumoren nicht signifikant von den pTis-Tumoren ($p = 0,280$). Hieraus ergaben sich zwei Tumorguppen (1. pTa+pT1, 2. pT2+pT3+pTis), welche sich höchst signifikant voneinander unterschieden ($p < 0,00001$). Die in Abb. 3-27 B dargestellte ROC-Kurve zur Trennung der G3-Tumorpatienten ($n = 26$) von gesunden Spendern, Infektionspatienten und G1- sowie G2-Tumorpatienten ($\Sigma: n = 87$) wies eine AUC von 0,773 auf (95% Konfidenzintervall, 0,648–0,898). Die Gruppe der pTa- und pT1-Tumoren konnte, wie man der ROC-Kurve in der Abb. 3-27 B entnehmen kann, sehr deutlich von der Gruppe der pTis-, pT2- und pT3-Tumoren getrennt werden (AUC = 0,880; 95% Konfidenzintervall, 0,784–0,976). Demzufolge repräsentiert die OP18/UPK1A eine malignitätsspezifische mRNA-Ratio, welche die Klassifizierung von progressiven Harnblasenkarzinomen ermöglicht.

Im Gegensatz zur ETS2 und uPA mRNA war die RT-qPCR-basierte Detektion der OP18 und UPK1A mRNA-Ratio weniger robust. Die OP18 mRNA zeigte vor allem in den Urinproben gesunder Spender eine geringe Abundanz (Abb. 3-28 B,C). Hier lag die Messungengenauigkeit bei 51% der Urinproben über 25%. Für die UPK1A mRNA lag bei 16% der Urinproben ein Intra-Assay-CV von $>25\%$ vor. Bei der Detektion der OP18 und UPK1A mRNA im Urin von Harnblasenkarzinompatienten lag lediglich bei 7% bzw. 11% der Proben ein erhöhter CV ($>25\%$) vor. Für die Festlegung eines Schwellenwertes wurden die Urinproben der gesunden Spender mit einem erhöhten CV ausgeschlossen. Der Schwellenwert für die OP18/UPK1A mRNA-Ratio wurde auf 1,0 festgelegt (Abb. 3-27). Neunzehn Urine von Harnblasenkarzinompatienten wiesen eine erhöhte OP18/UPK1A mRNA-Ratio auf, was einem prozentualen Anteil von 31% entspricht. Die Frequenz von mutierten *p53*-Allelen bei Harnblasenkarzinomen entspricht etwa 33% [126], was mit dem hier ermittelten prozentualen Anteil an Urinproben mit einer erhöhten OP18/UPK1A mRNA-Ratio in etwa übereinstimmt. Eine erhöhte urogenitale OP18/UPK1A mRNA-Ratio könnte demnach möglicherweise durch das Vorliegen einer *p53*-Mutation in den entsprechenden Harnblasenkarzinomen erklärt werden, wodurch es zu einer aberranten Expression der OP18 mRNA kommen würde, da die *p53*-vermittelte negative Transkriptionsregulation von OP18 ausbliebe. Das würde außerdem bedeuten, dass die urogenitale OP18 mRNA vor allem auf maligne Zellen zurückgeführt werden könnte.

3. Ergebnisse

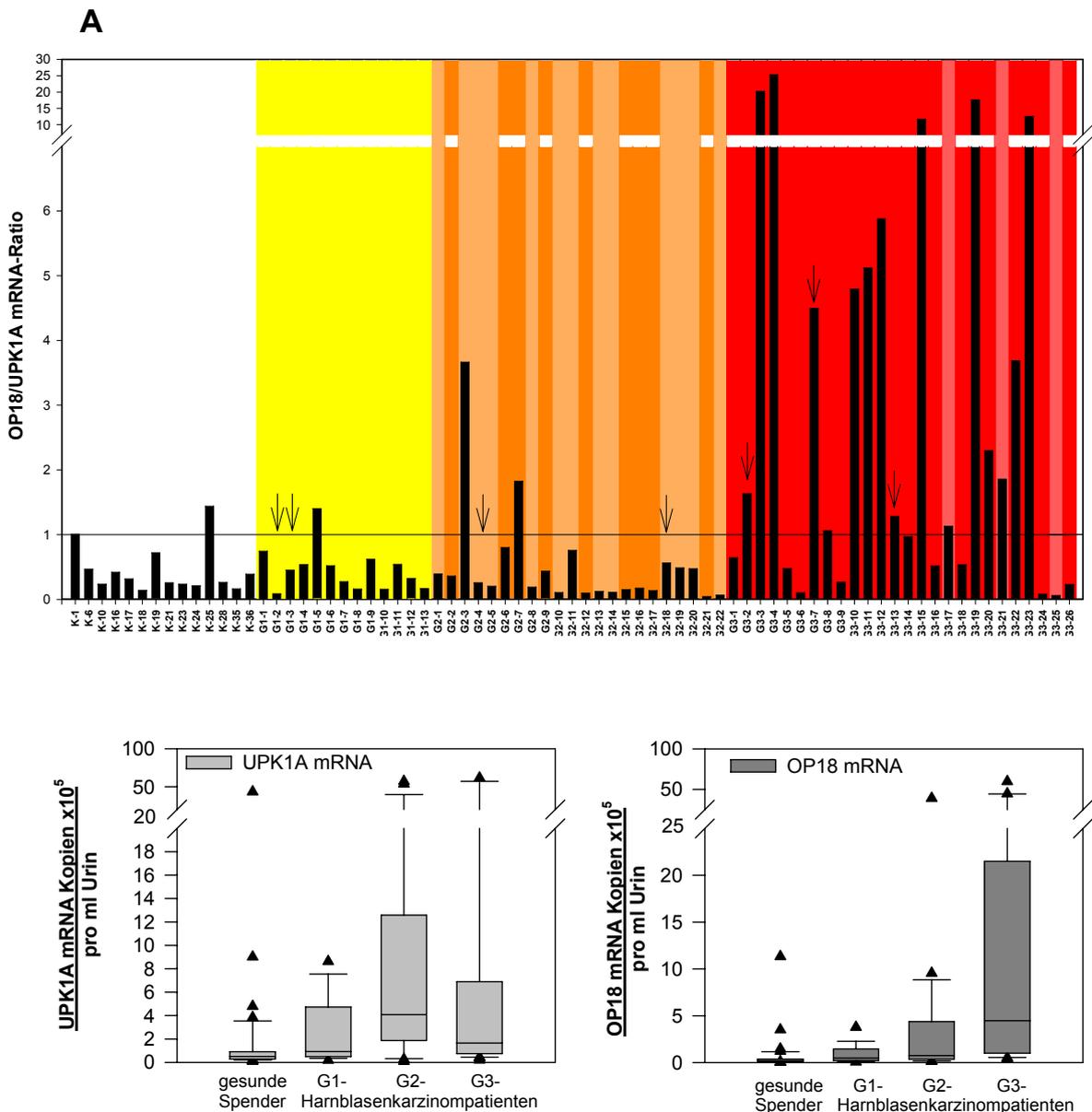


Abb. 3-28 **Urin-assoziierte OP18/UPK1A mRNA-Ratio.** Gesamt-RNA wurde aus Urin präpariert und die Kopien der OP18 und UPK1A mRNA wurden in Triplikaten mittels RT-qPCR bestimmt. Auf der linken Seite der Abbildung ist die OP18/UPK1A mRNA-Ratio im Urin von gesunden Spendern (K-1 bis K-36) abgebildet. Auf der rechten Bildseite ist die OP18/UPK1A mRNA-Ratio im Urin der Harnblasenkarzinompatienten dargestellt (G1-Harnblasenkarzinome: G1-1 bis G1-13, gelb unterlegt; G2-Harnblasenkarzinome: G2-1 bis G2-22, orange unterlegt, hell-orange Flächen zeigen nicht-invasive Tumoren an; G3-Harnblasenkarzinome: G3-1 bis G3-26, rot unterlegt, hell-rote Flächen zeigen nicht-invasive Tumoren an). Die schwarze Linie zeigt den Schwellenwert von 1,0 an, bei welchem eine Spezifität von 100% erreicht wird. Die Pfeile zeigen Proben an, bei denen ein Intra-Assay Variationskoeffizient über 25% vorlag. **(B)** und **(C)** Boxplot der UPK1A bzw. uPA mRNA (Kopien pro ml Urin, RNA_{LUC}-normalisiert). Die Linie innerhalb der Boxen repräsentiert den Median, die Boxen repräsentieren das 25. und 75. Perzentil. Fehlerbalken begrenzen das 10. und 90. Perzentil. Außerhalb des 10. und 90. Perzentils liegende Werte werden durch ein Symbol angezeigt.

3.2.3.3 Tumormarker mRNA-Ratios im Urin von Tumornachsorge-Patienten

Im Folgenden wurde untersucht, ob die entwickelten mRNA-Ratios für die Nachsorge von Harnblasenkarzinompatienten geeignet sind. Insgesamt wurden an 9 Patienten je zwei Verlaufsuntersuchungen (Zytologie und mRNA-Ratios ETS2/uPA, OP18/UPK1A, ETS2/OP18) durchgeführt. Die Urinuntersuchungen fanden in einem Zeitraum von ca. 4 bis 12 Monaten nach Erstdiagnose des Harnblasenkarzinoms statt.

In der klassischen Zytologie wurden in 7 von 18 Urinproben Zellatypien nachgewiesen. In einer Urinprobe lagen keine Zellatypien aber eine Mikrohämaturie vor.

In der mRNA Analyse war die ETS2/uPA Ratio ebenfalls bei diesen 8 Urinproben als Indiz für einen Tumor erhöht. Alle diese Urinproben wiesen eine geringe ETS2/OP18 mRNA-Ratio auf, wodurch das Vorliegen einer Harnwegsinfektion ausgeschlossen wurde.

Somit konnte bei allen 8 zytologisch auffälligen Urinen mit der mRNA-Analyse ein Tumorverdacht erstellt werden. Die durchgeführte Zystoskopie ergab aber bei 6 der 8 Patienten keinen Hinweis auf ein Rezidiv. Bei diesen Patienten wurde aber eine floride, meistens chronische Entzündung der Blasenschleimhaut (Urozystitis) nachgewiesen, welche offenbar nicht durch den Harnwegsinfektions-spezifischen Tumormarker ETS2/OP18 erkannt wurde. Die mRNA-Zusammensetzung im Urin von Patienten mit einem chronisch entzündeten Urothel unterscheidet sich demnach von derjenigen in Infektionsurinen.

Bei einem Patienten (Abb. 3-29, Patient 3) wurde zytologisch ein G2, pTa-Tumor erstdiagnostiziert, welcher auch durch die ETS2/uPA mRNA-Ratio richtig angezeigt wurde. Nach der Entfernung des Tumors und der angewendeten Therapie verringerte sich die ETS2/uPA mRNA-Ratio deutlich und lag unter dem Schwellenwert. Die Zytologie war ebenfalls unauffällig.

Die übrigen 10 Urinproben (von insgesamt 18) waren in der Zytologie unauffällig.

Bei einem zytologisch unauffälligen Patienten (Abb. 3-29, Patient 4) wurde anhand einer erhöhten ETS2/uPA mRNA-Ratio ein klinisch vermutetes, jedoch in der Zytologie nicht detektiertes, Rezidiv ein Jahr nach der Erstdiagnose eines G2,pT1-Harnblasenkarzinoms erkannt. Nach Therapie des Rezidives war bei diesem Patienten in der Verlaufskontrolle eine unauffällige ETS2/uPA mRNA-Ratio nachzuweisen.

3. Ergebnisse

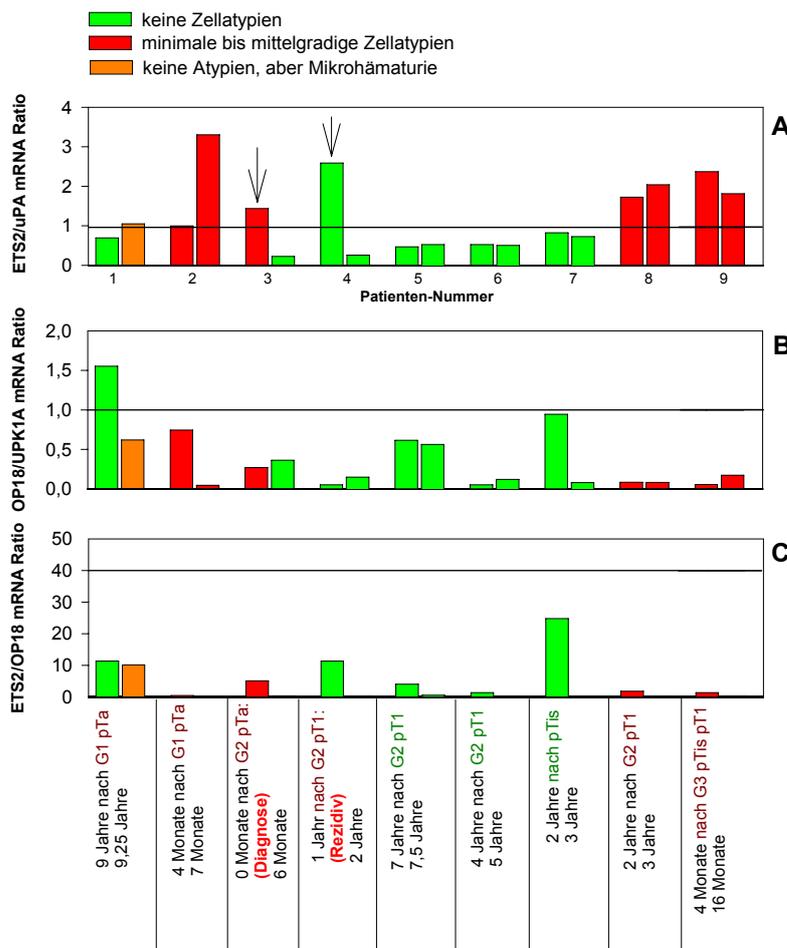


Abb. 3-29
ETS2/uPA mRNA-Ratio im Urin von Tumornachsorge-Patienten. Gesamt-RNA wurde aus den Urinproben präpariert und Kopienzahlen der ETS2, uPA, OP18, UPK1A und CC3 mRNA wurden in Triplikaten über RT-qPCR bestimmt. Darauf wurden die mRNA-Ratios ETS2/uPA (A), OP18/UPK1A (B) und ETS2/OP18 (C) gebildet. Die schwarze Linie zeigt den Schwellenwert von 0,96 für die ETS2/uPA, von 1,0 für die OP18/UPK1A mRNA-Ratio und von 40 für die ETS2/OP18 mRNA-Ratio an. Zusätzlich wird unter der x-Ordinate zu jedem Patienten die Zeitspanne zwischen Urinuntersuchung und Erstdiagnose sowie die Tumorklassifizierung angegeben.

Aus der tumorprogressionsspezifischen mRNA-Ratio (OP18/UPK1A) und den in dem Kapitel 3.2.3.1 beschriebenen mRNA-Ratios (ETS2/uPA und ETS2/OP18) können für die Diagnostik eines Harnblasenkarzinoms folgende Regeln aufgestellt werden.

1. Wenn die ETS2/uPA mRNA-Ratio hoch und die ETS2/OP18 mRNA-Ratio niedrig ist, deutet dies sehr wahrscheinlich auf das Vorliegen eines Harnblasenkarzinoms oder einer chronischen floriden Urozystitis hin. Es muss zunächst die Entzündung therapiert werden und im Anschluss ein erneuter Test erfolgen.
2. Wenn sowohl die ETS2/uPA als auch die ETS2/OP18 mRNA-Ratio erhöht ist, liegt eine Infektion vor, wobei das Vorliegen eines Tumors nicht ausgeschlossen werden kann. Es muss zunächst die Entzündung therapiert werden und im Anschluss ein erneuter Test erfolgen.
3. Wenn die ETS2/uPA, OP18/UPK1A und ETS/OP18 mRNA-Ratio hoch ist, liegt sehr wahrscheinlich ein invasives Harnblasenkarzinom mit einer begleitenden Entzündung vor.

3.3 Tumorbiologie von OP18 und UPK1A beim Harnblasenkarzinom

Aus der mRNA-Tumormarker Analyse im Gesamt-Urin von Harnblasenkarzinompatienten ging die für G3-Tumoren spezifische mRNA-Tumormarker-Ratio „OP18/UPK1A“ hervor. In den folgenden Abschnitten sind Ergebnisse aus Experimenten zur Charakterisierung von OP18 und UPK1A dargestellt. Anhand eines *in vitro* Zellkultur-Modells wurde die UPK1A mRNA sowie die OP18 mRNA durch siRNAs supprimiert. Nachfolgend wurde zuerst die veränderte Genexpression ausgewählter mRNAs analysiert. Anschließend wurde untersucht, ob die Suppression der mRNAs eine Änderung des Phänotyps bewirkte. Des weiteren wurden UPK1A mRNA- und OP18 mRNA-supprimierte Zellen mit einem Chemotherapeutikum behandelt um zu überprüfen, ob die Suppression dieser Target-mRNAs zu einer Chemosensibilisierung der Zellen führt.

3.3.1 OP18/UPK1A mRNA-Ratio in kultivierten Harnblasenkarzinomzellen

Zur Untersuchung der Tumorrelevanz von OP18 und UPK1A wurde ein Harnblasenkarzinom-Zellkulturmodell, bestehend aus RT-4- und ECV-304-Zellen, ausgewählt. Die RT-4-Zelllinie stammt aus einem G1-Harnblasenkarzinom ohne p53-Mutation, die ECV-304-Zelllinie wurde aus einem invasiven G3-Harnblasenkarzinom mit einer p53-Mutation etabliert. In der Abbildung 3-30 sind kultivierte RT-4- und ECV-304-Zellen dargestellt. Im Gegensatz zu den ECV-304-Zellen welche im Verlauf der Kultivierung einen Zellrasen bis zur vollständigen Konfluenz ausbilden, wachsen die RT-4-Zellen bei gleicher Zelldichte in Inseln mit einer deutlichen Zellgrenze.

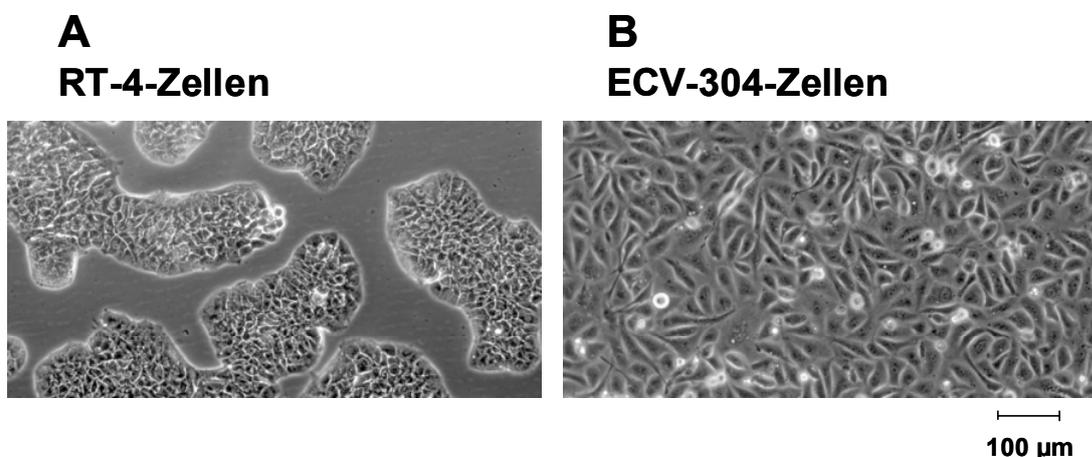


Abb. 3-30 Morphologie kultivierter Harnblasenkarzinomzelllinien. (A) Digitalisierte Phasenkontrastaufnahme der gut differenzierten RT-4-Zelllinie. (B) Darstellung der wenig differenzierten ECV-304-Zelllinie.

3. Ergebnisse

In den ECV-304- („G3“-) Zellen wurde zuerst die OP18/UPK1A mRNA-Ratio nachgewiesen. Im Zellkulturmodell wurde analog zu den Urinen eine niedrige OP18/UPK1A mRNA-Ratio in den „G1“-Zellen (RT-4) gegenüber den „G3“-Zellen (ECV-304) nachgewiesen (Abb. 3-31 B). Der Faktor zwischen beiden mRNA-Ratios betrug allerdings im Zellkulturexperiment mehr als zehnfache im Vergleich zu den gemittelten Ratios im Gesamturin (*in vitro*: Faktor 270; *ex vivo*: Faktor 10). Der maximale Faktor zwischen der OP18/UPK1A mRNA-Ratio im Urin von G1- und G3-Harnblasenkarzinompatienten war jedoch mit 290 ähnlich hoch wie im Zellkulturmodell.

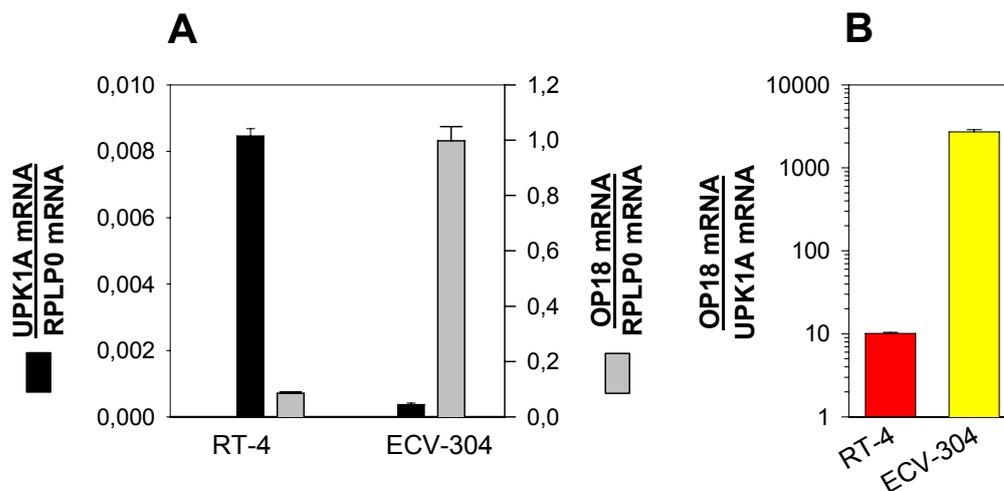


Abb. 3-31 **OP18/UPK1A mRNA-Ratio in RT-4- („G1“-) und ECV-304- („G3“-) Zellen.** Die Zellen wurden bei einer Konfluenz von etwa 50% geerntet. Anschließend wurde Gesamt-RNA präpariert. Die angegebenen mRNAs wurden dann in Triplikaten über RT-qPCR detektiert. (A) UPK1A und OP18 mRNA Abundanz in RT-4- und ECV-304-Zellen (normalisiert auf die interne Referenz-mRNA RPLP0). (B) OP18/UPK1A-mRNA-Ratio in RT-4- und ECV-304-Zellen. Die Balken repräsentieren den Mittelwert (\pm Standardabweichung) von 2 verschiedenen Ansätzen.

Wie man der Abbildung 3-31 A entnehmen kann, resultiert die hohe OP18/UPK1A mRNA-Ratio in ECV-304-Zellen gegenüber den RT-4-Zellen sowohl aus einer stark erhöhten OP18 mRNA-Expression (12-fach erhöht) als auch aus einer deutlich reduzierten Expression der UPK1A mRNA (23-fach erniedrigt). In Analogie zu dem Zellkulturexperiment konnte im Urin von G3-Harnblasenkarzinompatienten eine 10-fach erhöhte OP18 mRNA-Abundanz nachgewiesen werden (G3-Tumoren: $4,46 \times 10^5$ Kopien, G1-Tumoren: $4,92 \times 10^4$, mediane Kopienzahl pro ml Urin, normalisiert auf RNA_{LUC}). Für die Urin-assoziierte UPK1A mRNA gab es Abweichungen zwischen der *in vitro* und *ex vivo* Abundanz. Im Urin von G3-Harnblasenkarzinompatienten war die UPK1A mRNA Abundanz etwa doppelt so hoch gegenüber G1-Harnblasenkarzinompatienten (G1-Tumoren: $9,13 \times 10^4$, G3-Tumoren: $1,66 \times 10^5$ Kopien pro ml Urin). Diese Beobachtung kann auf die Tatsache zurückgeführt werden, dass die mRNA-Kopienzahlen aus Urin nicht auf eine interne Referenz-mRNA normalisiert werden konnten, um Unterschiede in der Nukleinsäurekonzentration

auszugleichen. Es ist vorstellbar, dass in den Urin von invasiven G3-Harnblasenkarzinompatienten aufgrund einer höheren *Turnover*-Rate des Tumors mehr Zellen eingebracht werden.

3.3.2 siRNA-vermittelte Suppression von OP18- und UPK1A-mRNA

siRNAs können ihre Ziel-mRNAs sehr effektiv hemmen, weswegen auch in dieser Arbeit ein siRNA-vermittelter *knock-down* der OP18 und UPK1A mRNA durchgeführt wurde. Um die Expressionsanalyse tumorrelevanter mRNAs nach Suppression untersuchen zu können, war es zunächst notwendig, die Variabilität verschiedener Referenz-mRNAs (siehe Abschnitt 3.2.1.3.3, Tabelle 3-5) in unterschiedlichen humanen Zelllinien zu untersuchen, um eine geeignete interne Referenz-mRNA zur Normalisierung der mRNA-Expression in den Zellkulturexperimenten zu identifizieren. Hierfür wurde die Expression der Referenz-mRNAs in verschiedenen humane Karzinomzelllinien (RT-4, ECV-304, PC-3, LnCap und MCF-7) untersucht (Abb. 3-32).

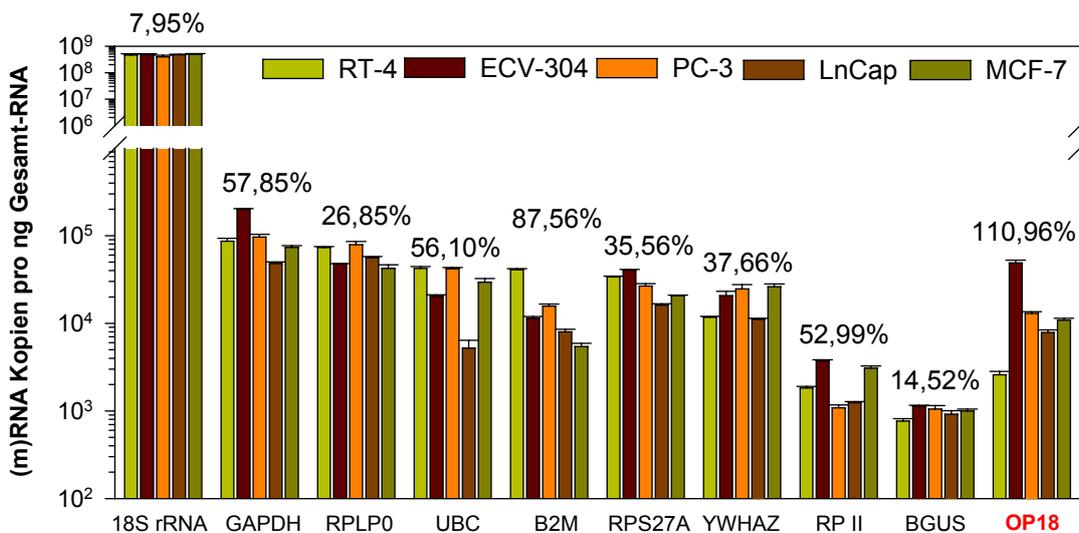


Abb. 3-32 Variabilität interner Referenz-mRNAs in 5 verschiedenen Zelllinien. Die Harnblasenkarzinomzelllinien RT-4 und ECV-304, die Prostatakarzinomzelllinien PC-3 und LnCap sowie die Brustkarzinomzelllinie MCF-7 wurden bei einer Konfluenz von ca. 80% geerntet. Gesamt-RNA wurde präpariert und die angegebenen mRNAs sowie die 18S rRNA wurden in Triplikaten über RT-qPCR detektiert. Die mRNA-Kopienzahlen wurden auf die Gesamt-RNA-Konzentration normalisiert. Die dargestellten Balken stellen die Mittelwerte \pm Standardabweichung dar. Der Inter-Assay CV wird über den Balken angegeben.

Die Variabilität der 18S rRNA war am geringsten in den untersuchten Zelllinien. Die Kopienzahl pro ng Gesamt RNA war allerdings im Vergleich zu den übrigen getesteten mRNAs etwa um einen Faktor von 1000 höher, so dass diese als Referenz-mRNA nicht gut

3. Ergebnisse

geeignet war. Die BGUS mRNA wies den geringsten Inter-Assay CV von 14,52% auf. Die mRNA-Expression war aber im Vergleich zu den anderen untersuchten mRNAs fast zwei log-Stufen geringer. Daher wurde die RPLP0 mRNA mit einer mittleren Abundanz von $5,96 \times 10^4 \pm 0,16 \times 10^4$ Kopien pro ng Gesamt-RNA zur Normalisierung ausgewählt. Die Expression der RPLP0 mRNA war außerdem in den ECV-304-Zellen mit derjenigen der Target mRNA, OP18, vergleichbar. Der Inter-Assay CV für die RPLP0 mRNA war mit 26,85% im Vergleich zu den weiteren internen Referenz-mRNAs niedrig.

Im vorangegangenen Abschnitt wurde gezeigt, dass das Harnblasenkarzinomzellkultur-Modell für die nähere Charakterisierung von OP18 und UPK1A aufgrund der unterschiedlichen OP18/UPK1A mRNA-Ratios geeignet war. Die beiden Target-mRNAs wurden daraufhin unter Verwendung von siRNAs supprimiert. Für jede mRNA wurden zunächst zwei verschiedene siRNAs entworfen (siehe Kapitel 2.5.1). Die Wirksamkeit dieser siRNAs wurde in RT-4- und ECV-304-Zellen zunächst in 2 verschiedenen Konzentrationen getestet.

Die UPK1A-gerichtete siRNA „siUPK1A-1“ zeigte eine Hemmwirkung in den Konzentrationen von 3 und 30 nM (Abb. 3-33 A). Bei einer Konzentration von 3 nM siUPK1A-1 wurde die mRNA Expression auf 44,4%, bei einer Konzentration von 30 nM siUPK1A-1 auf 23,8%, gegenüber der Kontroll-siRNA reduziert. Dies ergibt einen IC_{50} (siRNA-Konzentration mit halbmaximaler Hemmwirkung) von etwa 1 nM. Im Gegensatz dazu zeigte die „siUPK1A-2“-siRNA keine Hemmwirkung. Für diese siRNA war die UPK1A mRNA-Expression sogar erhöht (118,7% 3 nM bzw. 148% bei 30 nM siRNA-Konzentration).

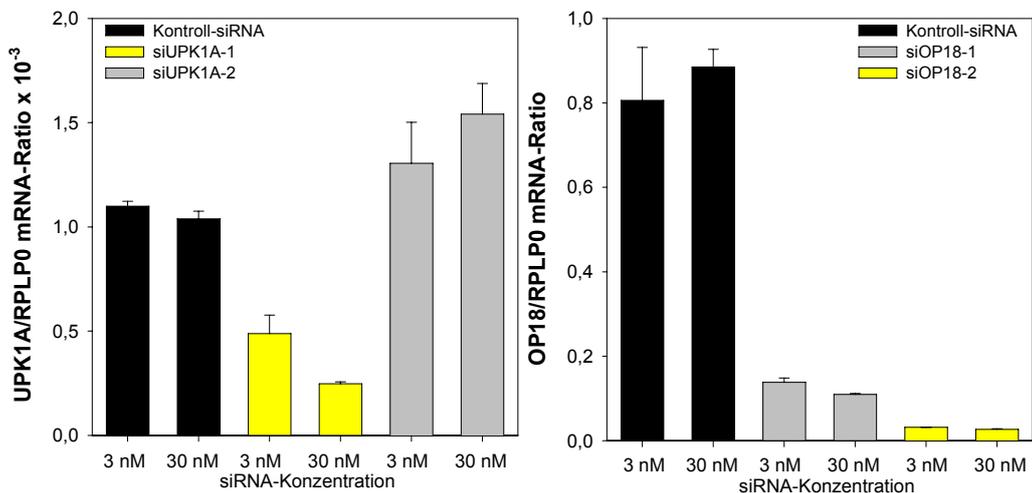


Abb. 3-33 Wirksamkeit eingesetzter siRNAs zur Suppression der UPK1A mRNA (A) und OP18 mRNA (B). RT-4-Zellen (A) und ECV-304-Zellen (B) wurden in Duplikaten mit den zu testenden siRNAs in den angegebenen Konzentrationen transfiziert. Nach 24 h wurde Gesamt-RNA präpariert und die UPK1A bzw. OP18 mRNA in Triplikaten über RT-qPCR detektiert. Die mRNA Kopienzahlen wurden auf die interne Referenz-mRNA RPLP0 normalisiert. Die Balken stellen die Mittelwerte \pm Standardabweichung aus den Duplikaten dar.

3. Ergebnisse

„siOP18-2“-siRNA hemmte die OP18 mRNA am effektivsten (3,9%, bei 3 nM) und 3,0% (30 nM), (Abb.3-33 B). Die siOP18-1 bewirkte eine Suppression auf 17,2% und 12,4% bei einer siRNA-Konzentration von 3 bzw. 30 nM. Alle weiteren Untersuchungen wurden unter Verwendung der siUPK1A-1- und der siOP18-2-siRNA durchgeführt.

Zur Ermittlung der siRNA-Konzentration mit maximaler Hemmwirkung wurden RT-4-Zellen bei einer Konfluenz von etwa 50% mit den ausgewählten OP18- und UPK1A-gerichteten siRNAs in verschiedenen Konzentrationen (30, 60 und 90 nM) transfiziert. Anschließend wurde die Suppression der Target-mRNAs mittels RT-qPCR überprüft. Die siUPK1A-1 zeigte bei einer Konzentration von 30 nM die maximale Hemmwirkung der mRNA Expression auf 17,8% gegenüber der Kontrolle. Eine Erhöhung der siRNA-Konzentration führte nicht zur Steigerung der Inhibition (Abb. 3-34 A). Bei der siOP18-2-vermittelten Suppression war die Hemmwirkung in RT-4-Zellen (Abb. 3-34 B) bei allen eingesetzten Konzentrationen deutlich geringer als in ECV-304-Zellen (Abb. 3-33 B). Es gab keinen Unterschied in der Hemmwirkung zwischen der siRNA-Konzentration von 30 nM und 90 nM, da in beiden Ansätzen die OP18 mRNA auf 34% reduziert. Da die Suppression bei 30 nM am stärksten war, wurden beide siRNA in dieser Konzentration verwendet.

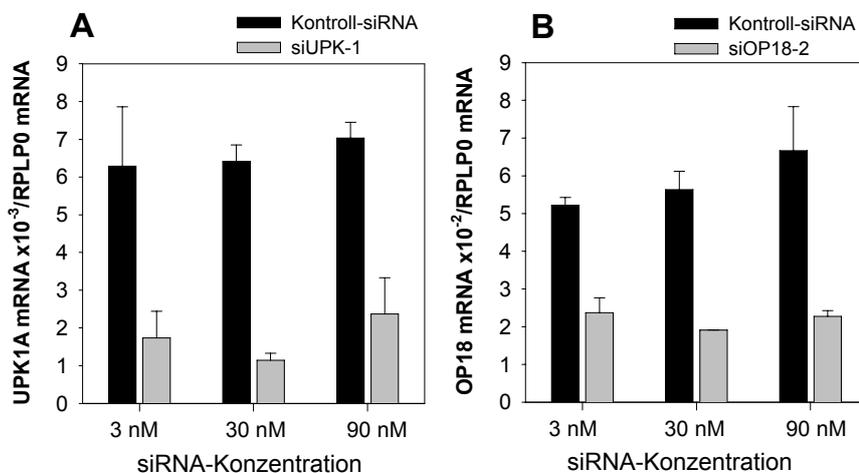


Abb. 3-34 Konzentrationsabhängige Hemmung von UPK1A mRNA (A) und OP18 mRNA (B). RT-4-Zellen wurden mit den angegebenen siRNA-Konzentrationen in Duplikaten transfiziert. Nach 24 h wurde Gesamt-RNA aus den Zellen präpariert, und die UPK1A sowie OP18 mRNA wurden über RT-qPCR in Triplikaten detektiert. Die mRNA Kopienzahlen wurden über die interne Referenz-mRNA RPLP0 normalisiert. Die dargestellten Balken repräsentieren die Mittelwerte \pm Standardabweichung aus den Duplikat-Ansätzen.

Neben der Wirkung der siRNA-vermittelten Target-mRNA Suppression auf mRNA-Ebene wurde über einen Western Blot die Reduktion der OP18 Proteins untersucht.

Die Expression des OP18-Proteins war am ersten Tag nach Transfektion nur geringfügig erniedrigt, zwei Tage nach Transfektion war die OP18-Protein-Expression bereits auf 13% der Kontrolle reduziert. Drei und vier Tage nach der Transfektion lagen weniger als 6% des Proteins vor (normalisiert auf Beta-Aktin, Abb. 3-35).

3. Ergebnisse

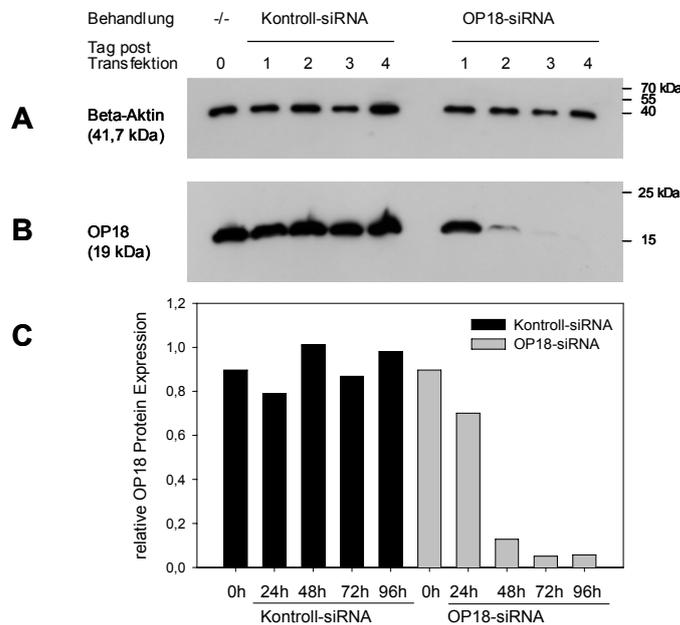


Abb. 3-35
Nachweis der OP18 Proteinmenge nach siRNA-vermittelter Suppression der OP18 mRNA. ECV-304-Zellen wurden mit Kontroll-siRNA (linke Bildhälfte) bzw. mit siOP18-2 (rechte Bildhälfte) mit einer Konzentration von 30 nM transfiziert. 0, 1, 2, 3 und 4 Tage nach Transfektion wurden die Zellen lysiert und OP18 (A) sowie Beta-Aktin (B) wurden über einen Western Blot detektiert. In Abbildung C wird die OP18-Protein-Expression nach der Normalisierung auf die Beta-Aktin Protein-Expression dargestellt.

3.3.3 mRNA-Expressionsanalyse nach Hemmung von OP18 und UPK1A

Eine Neoplasie entsteht durch eine Serie genetischer Veränderungen, welche zu essentiellen Veränderungen der Zellphysiologie führen. Infolgedessen kann es zu unkontrolliertem Zellwachstum, einer Ignoranz gegenüber Apoptose induzierenden Signalen sowie einer ausgeprägten Angiogenese, Invasion und Metastasierung kommen [127]. Die aberrante Expression der mRNA spiegelt hierbei direkt die Veränderungen auf der Gen-Ebene wider. Hingegen ist eine direkte Transkript – Protein Korrelation nicht für jedes Gen gegeben [128]. Die Gründe hierfür liegen in den Translationsraten pro Transkript, post-translationalen Modifikationen und Proteindegradationen. Zudem ist die Untersuchung der mRNA-Expression unter Verwendung der RT-qPCR, technisch einfacher durchführbar als die meisten Verfahren in der Proteinanalytik. Es lag folglich nahe, zunächst die Auswirkungen der siRNA-vermittelten Suppression von UPK1A und OP18 auf mRNA Ebene zu untersuchen.

Es wurden die bereits anhand verschiedener Kriterien ausgewählten tumorrelevanten Gene BAX, CC3, ETS2, Ki-67 und uPA untersucht (siehe Kapitel 3.2.2.2, Tabelle 3-8). Die Expression der ausgewählten mRNAs wurde zuerst in siOP18-behandelten ECV-304-Zellen untersucht. Aufgrund der Beobachtung, dass die OP18 Proteinexpression ab Tag 2 nach der Transfektion deutlich erniedrigt vorlag, wurde die mRNA-Expression über einen Zeitraum von insgesamt vier Tagen nach der Transfektion mittels RT-qPCR untersucht.

3. Ergebnisse

Zur Normalisierung der mRNA-Expressionen sollte die interne Referenz-mRNA RPLP0 verwendet werden. Um zu untersuchen, ob die Expression der RPLP0 mRNA über den Untersuchungszeitraum in den unterschiedlich behandelten ECV-304-Zellen stabil ist, wurde die Kopienzahl gegen die Gesamt-RNA-Konzentration gemessen (Abb. 3-36). Die Kopienzahl der internen Referenz-mRNA lag am 1. Tag nach der Transfektion in vergleichbarer Abundanz in den verschiedenen Ansätzen vor. Jedoch war die Kopienzahl ab dem dritten Tag nach der Transfektion mit siOP18 ca. um den Faktor 2 gegenüber der Kontrolle erhöht.

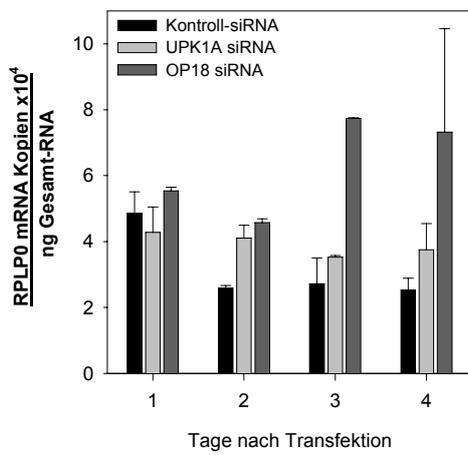


Abb. 3-36

Variabilität in der RPLP0 mRNA-Expression. ECV-304-Zellen wurden mit siRNAs in Duplikaten transfiziert. An den angegebenen Zeitpunkten wurde Gesamt-RNA präpariert und die Abundanz der RPLP0 mRNA über RT-qPCR in Triplikaten bestimmt. Die mRNA Kopienzahlen wurden auf die Gesamt-RNA Konzentration (ng) normalisiert. Die dargestellten Balken repräsentieren die Mittelwerte \pm Standardabweichung aus den Duplikaten.

Für die humane Lungenkarzinomzelllinie K562 konnte von Luo *et al.* gezeigt werden, dass es nach der Inhibition der OP18 mRNA mit *antisense* RNA zu einem Arrest in der G₂/M-Phase des Zellzyklus kommt [129]. Es ist wahrscheinlich, dass es auch nach der Suppression von OP18 in ECV-304-Zellen ebenfalls zum Zellzyklusarrest in der G₂/M-Phase kommt. In diesem Zusammenhang könnte eine erhöhte RPLP0 mRNA Abundanz pro ng Gesamt-RNA ab dem 3. Tag nach der Transfektion bedeuten, dass in den Zellen zwar schon der doppelte Satz (4n) an Chromosomen vorliegt, die mRNA akkumuliert wird, aber möglicherweise die Synthese ribosomaler RNA durch den Zellzyklusarrest inhibiert wird. Der Tumorsuppressor p14^{Arf} bindet normalerweise an Mdm2, um einen p53-abhängigen Arrest des Zellzyklus zu bewirken. Für die murine Fibroblasten-Zelllinie NIH-3T3 konnte gezeigt werden, dass p19^{Arf} unabhängig von p53 und Mdm2 die Synthese ribosomaler RNA inhibieren kann, was mit einem Zellzyklusarrest einhergeht [130]. Daher ist vorstellbar, dass es in der humanen Zelllinie ECV-304 ebenfalls durch p14^{Arf} zu einer Inhibition der Synthese ribosomaler RNA kommt. Da die ribosomale RNA etwa 80–90% der präparierten Gesamt-RNA ausmacht, könnte somit die relativ erhöhte Abundanz der RPLP0 mRNA in den siOP18-behandelten Zellen erklärt werden.

Folglich wurde die Abundanz der untersuchten mRNAs auf die interne Referenz-mRNA RPLP0 normalisiert. Zunächst wurde untersucht, ob UPK1A und OP18 mRNA über den Untersuchungszeitraum effektiv supprimiert wurden. OP18 mRNA wurde in ECV-304-Zellen über die gesamten vier Tage nach der Transfektion auf 3,7–1,2% reduziert (Abb. 3-37 B). UPK1A mRNA wurde in den ECV-304-Zellen auf 5,6–1,1% supprimiert, zusätzlich

3. Ergebnisse

nahm die Abundanz der UPK1A mRNA im Kontroll-Ansatz bei zunehmender Konfluenz der Zellen exponentiell zu (Abb. 3-37 A).

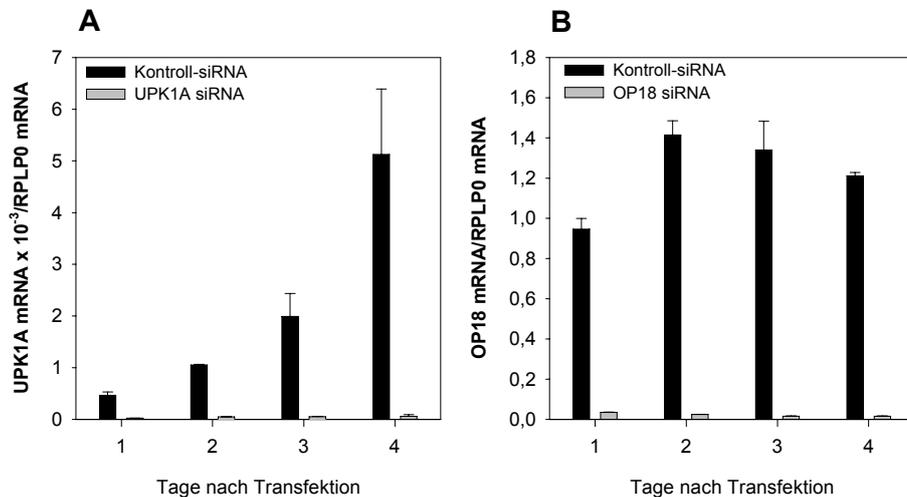


Abb. 3-37 **Suppression der UPK1A mRNA (A) und OP18 mRNA (B) mittels siRNAs.** ECV-304-Zellen wurden mit siRNAs in Duplikaten transfiziert. An den angegebenen Zeitpunkten wurde Gesamt-RNA präpariert und die Abundanz der UPK1A mRNA sowie der OP18 mRNA über RT-qPCR in Triplikaten bestimmt. Die mRNA Kopienzahlen wurden auf die interne Referenz-mRNA RPLP0 normalisiert. Die dargestellten Balken repräsentieren die Mittelwerte \pm Standardabweichung aus den Duplikaten.

Im Folgenden wurde die Veränderung der Genexpression von Apoptose- und Tumorrelevanten Genen in ECV-304-Zellen nach siRNA-vermittelter Suppression von OP18 und UPK1A mRNA bestimmt.

Die Expression der BAX mRNA Kopienzahl blieb über den untersuchten Zeitraum relativ konstant mit einer über alle Ansätze gemittelten Abundanz von $5,82 \times 10^{-2} \pm 6,89 \times 10^{-3}$ Kopien pro RPLP0 mRNA (Abb. 3-38 A).

Die CC3/TC3 mRNA-Ratio hingegen stieg nach der Suppression von OP18 kontinuierlich auf den 3-fachen Wert an (Abb.3-38 B). Das von der mRNA translatierte CC3-Protein bewirkt die Induktion von Apoptose, das TC3-Protein besitzt anti-apoptotische Eigenschaften. Die erhöhte CC3/TC3 mRNA-Ratio deutete auf die Induktion von Apoptose hin. Im Kontroll-Ansatz und nach Suppression von UPK1A mRNA wurde ein vergleichsweise geringer Anstieg der CC3/TC3 mRNA-Ratio auf den 2,5-fachen bzw. 2-fachen Wert beobachtet.

3. Ergebnisse

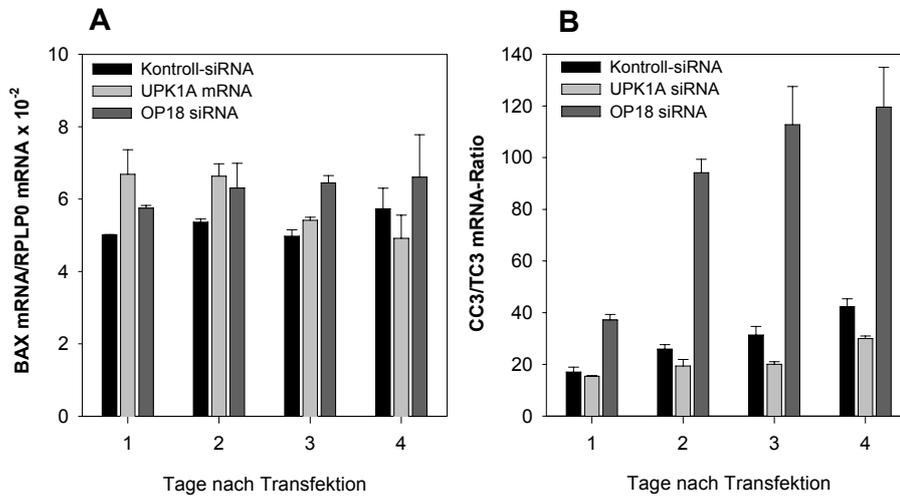


Abb.3-38 **Veränderte Genexpression Apoptose-relevanter Gene nach siRNA-vermittelter Suppression von UPK1A und OP18 mRNA.** ECV-304-Zellen wurden mit siRNAs in Duplikaten transfiziert. An den angegebenen Zeitpunkten wurde Gesamt-RNA präpariert und die Abundanz der BAX mRNA (**A**) über RT-qPCR in Triplikaten bestimmt. Die mRNA Kopienzahlen wurden auf die interne Referenz-mRNA RPLP0 normalisiert. Abb. **B** stellt die ins Verhältnis gesetzten mRNAs für CC3 und TC3 dar. Die Balken repräsentieren die Mittelwerte \pm Standardabweichung aus den Duplikaten.

Von Xiao *et al.* wurde gezeigt, dass die Überexpression von CC3 in der humanen Lungenkarzinomzelllinie v-SCLC vor allem zur vermehrten Expression der proapoptotischen Gene Bad und Siva führt [131]. Shi *et al.* zeigten, dass die Überexpression von CC3 in der Wildtyp p53-exprimierenden humanen Leberkarzinomzelllinie HepG2 zu einer erhöhten Expression des p53 und BAX Proteins führt und Apoptose induziert wird. Interessanterweise wurde nach der Überexpression von CC3 in den humanen Leberkarzinomzelllinien Hep3B und PLC/RPF/5, bei welchen kein Wildtyp p53 vorliegt, zwar Apoptose induziert, aber die BAX Protein Expression war nicht erhöht, wodurch ein BAX-unabhängiger Apoptoseweg vermutet wird [132]. Hierdurch könnte erklärt werden, warum nach der Suppression von OP18 in den p53-mutierten ECV-304-Zellen zwar eine erhöhte CC3/TC3 mRNA-Ratio, aber keine erhöhte BAX mRNA Expression nachgewiesen wurde.

Weiterhin wurde die Abundanz der tumorrelevanten mRNAs uPA und ETS2 untersucht (Abb. 3-39). Im Kontroll-Ansatz wurde ein starker Anstieg der uPA mRNA Expression auf das Zweifache nach dem ersten Tag der Transfektion beobachtet (Abb. 3-39 A). Dieser Anstieg korrelierte mit dem Anstieg der ETS2 mRNA (Abb. 3-36 A & B & C, Korrelationskoeffizient nach Pearson: $r = 0,960$, $p = 0,04$). Die Korrelation zwischen der ETS2 und uPA mRNA-Expression lässt sich dadurch erklären, dass ETS2 ein Transkriptionsaktivator für das uPA Gen ist [133]. Die Expression der ETS2 mRNA im Kontroll-Ansatz korrelierte aber auch mit dem Anstieg der OP18 mRNA Expression (siehe

3. Ergebnisse

Abb. 3-37 B, Korrelationskoeffizient nach Pearson: $r = 0,991$, $p = 0,009$). Eine Transkriptionsaktivierung der OP18 mRNA über ETS2 oder andere Transkriptionsfaktoren der ETS-Familie in Abwesenheit von p53 kann daher nicht ausgeschlossen werden. In den UPK1A mRNA-supprimierten Zellen lag ebenfalls eine signifikante Korrelation zwischen der uPA und ETS2 mRNA-Expression vor (Abb. 3-39 A & B & C, Korrelationskoeffizient nach Pearson: $r = 0,974$, $p = 0,026$). Nach Suppression der UPK1A mRNA war die uPA mRNA-Expression im Vergleich zur Kontrolle am 2. Tag nach der Transfektion auf das 5-fache erniedrigt. Am 4. Tag war die Abundanz der uPA mRNA aber wieder auf den 3-fachen Wert erhöht, was durch den Anstieg der ETS2 mRNA erklärt werden kann. In den OP18 mRNA-supprimierten Zellen war die mittlere uPA mRNA Kopienzahl ab dem 2. Tag nach der Transfektion im Vergleich zur Kontrolle deutlich um das 3- bis 4-fache erniedrigt. In diesem Fall lag keine signifikante Korrelation zwischen der uPA und ETS2 mRNA-Expression vor (Abb. 3-39 C). Infolgedessen stieg die ETS2/uPA mRNA-Ratio am 3. und 4. Tag nach Transfektion auf ca. den 3-fachen Wert der Kontrolle an (Abb. 3-39 C). Diese Beobachtung könnte bedeuten, dass der ETS2 Transkriptionsfaktor nicht aktiviert wird oder die Transkription des *uPA* Gens durch einen weiteren Transkriptionsfaktor reprimiert wird.

Außerdem wurde die Expression der Ki-67 mRNA untersucht, da im Urin eine hohe Korrelation zur Expression der OP18 mRNA beobachtet wurde (Korrelationskoeffizient nach Spearman: $r_s = 0,835$, $p < 0,0001$, Daten nicht gezeigt). Das Ki-67 Protein ist strikt mit Zellproliferation assoziiert und erreicht die maximale Konzentration in der G₂/M-Phase des Zellzyklus erreicht. Nach der Mitose nimmt die Abundanz von pKi-67 schnell ab [zusammengefasst in 134]. In diesem Zusammenhang wurde die Expression der Ki-67 mRNA bestimmt, um mögliche Hinweise darauf zu bekommen, wie hoch der Anteil an proliferierenden Zellen in der untersuchten Zellpopulation ist. Hierbei muss berücksichtigt werden, dass aber beispielsweise nach der Blockierung des Zellzyklus in der G₁/S oder G₂/M-Phase Ki-67-positive Zellen nachgewiesen werden können [135].

Die Ki-67 mRNA Expression nahm im Kontroll-Ansatz und nach Suppression der UPK1A mRNA um das 3-fache ab, wobei die geringste Expression bereits am 3. Tag nach siUPK1A-Behandlung vorlag (Abb. 3-39 D). Die Verringerung der Ki-67 mRNA Expression im Kontroll-Ansatz nach 4 Tagen könnte bedeuten, dass der Anteil von teilenden Zellen aufgrund der erreichten vollständigen Konfluenz sank. Im Gegensatz hierzu war die Expression der Ki-67 mRNA nach OP18 Suppression konstant mit einer mittleren Kopienzahl von $1,89 \times 10^{-1} \pm 2,05 \times 10^{-2}$ Kopien pro RPLP0 mRNA. Am 3. Tag nach der Transfektion war die Ki-67 mRNA Expression um das 1,3-fache gegenüber der Kontrolle erhöht, am 4. Tag lag eine 2,7-fach höhere Ki-67 Expression vor. Das könnte bedeuten, dass sich der Großteil der siOP18-behandelten Zellen über den gesamten Untersuchungszeitraum in einer aktiven Phase des Zellzyklus befindet. Die am Anfang dieses Abschnitts aufgestellte Hypothese, dass, analog zu der von Luo *et al.* durchgeführten Studie mit K562-Zellen, auch ECV-304-Zellen nach der Suppression von OP18 in der G₂/M-Phase des Zellzyklus arretieren, könnte die konstant hohe Abundanz der Ki-67 mRNA erklären. Diese Beobachtung implementiert ebenfalls, dass die Ki-67 mRNA-Expression nach der Suppression von OP18 im Gegensatz zur uPA mRNA nicht gehemmt wird.

3. Ergebnisse

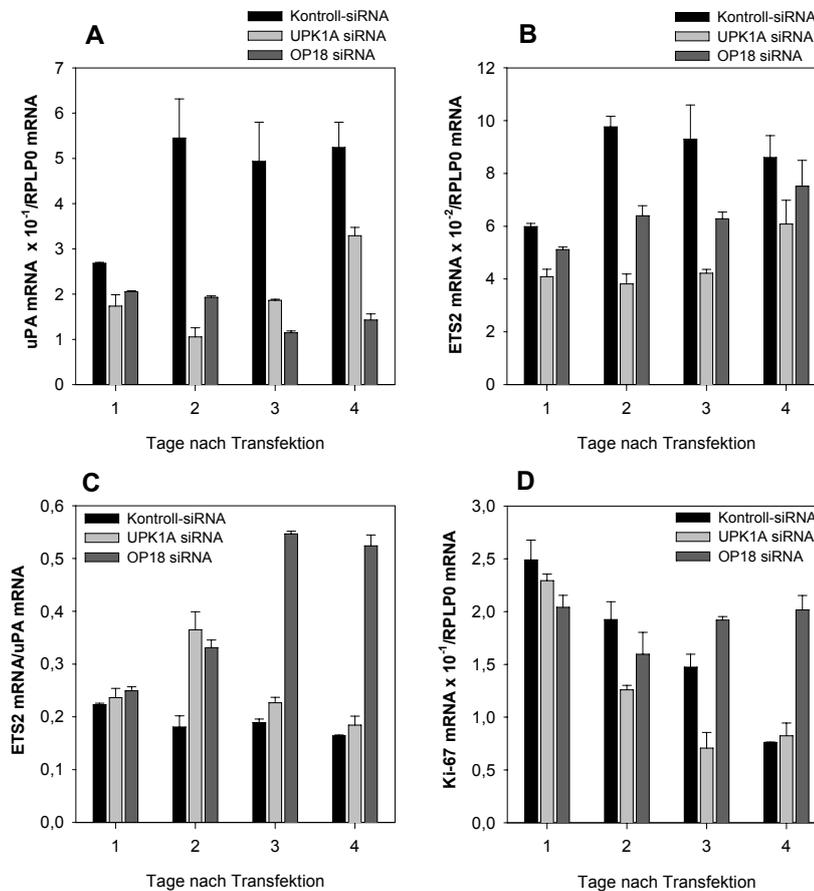


Abb. 3-39 Expression der tumorrelevanten mRNAs uPA (A) und ETS2 (B) sowie Ki-67 (D) nach siRNA-vermittelter Suppression der UPK1A und OP18 mRNA. ECV-304-Zellen wurden mit siRNAs in Duplikaten transfiziert. An den angegebenen Zeitpunkten wurde Gesamt-RNA präpariert und die Abundanz der ETS2, Ki-67 und uPA mRNA über RT-qPCR in Triplikaten bestimmt. Die mRNA Kopienzahlen wurden auf die interne Referenz-mRNA RPLP0 normalisiert. Die dargestellten Balken repräsentieren die Mittelwerte \pm Standardabweichung aus den Duplikaten. In Abb. (C) wird außerdem das Verhältnis der ETS2 und uPA mRNA dargestellt.

Neben der „G3“-Zelllinie ECV-304 wurde die Expression ausgewählter mRNAs daraufhin in der „G1“-Zelllinie RT-4 untersucht. Zur Suppression der UPK1A- und OP18-mRNA wurden ebenfalls siRNA-Konzentrationen von 30 nM verwendet. Analog zu den ECV-304-Zellen wurde untersucht, ob die Expression der endogenen Referenz-mRNA RPLP0 über den untersuchten Zeitraum stabil war (Abb. 3-40). Im Gegensatz zu ECV-304-Zellen korrelierte die RPLP0 mRNA Expression mit einer mittleren Kopienzahl von $7,91 \times 10^4 \pm 0,78 \times 10^4$ in den RT-4-Zellen über den gesamten Zeitraum in allen Ansätzen mit der Gesamt-RNA Menge und wurde ebenfalls zur Normalisierung der Genexpression verwendet.

3. Ergebnisse

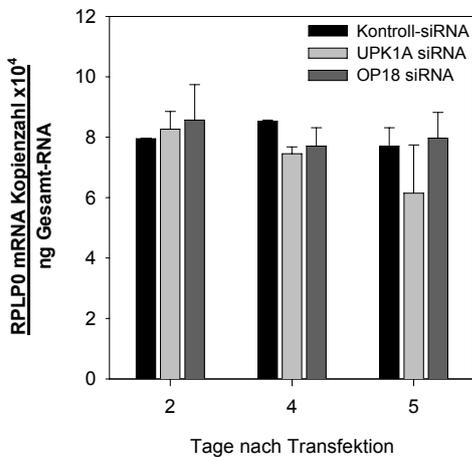


Abb. 3-40

Varianz in der Expression der internen Referenz-mRNA RPLP0. RT-4-Zellen wurden mit siRNAs in Duplikaten transfiziert. An den angegebenen Zeitpunkten wurde Gesamt-RNA präpariert und die Abundanz der RPLP0 mRNA über RT-qPCR in Triplikaten bestimmt. Die mRNA Kopienzahlen wurden auf die Gesamt-RNA Konzentration (ng) normalisiert. Die dargestellten Balken repräsentieren die Mittelwerte \pm Standardabweichung aus den Duplikaten.

Die UPK1A mRNA wurde in RT-4-Zellen 2 Tage nach Transfektion mit UPK1A siRNA auf etwa 20% supprimiert (Abb. 3-41 A). Am 4. Tag nach Transfektion wurde die UPK1A mRNA Expression aber nur noch auf 50% gehemmt. Im Kontroll-Ansatz stieg die UPK1A mRNA Expression kontinuierlich über den Untersuchungszeitraum auf das 5-fache an, so dass im Vergleich zu den UPK1A mRNA-supprimierten Zellen schließlich die 4-fache UPK1A mRNA Menge vorlag.

Die OP18 mRNA wurde am 2. Tag nach der Transfektion auf 66,5% der Kontrolle supprimiert, stieg jedoch bis zum 5. Tag wieder auf den Wert des Kontrollansatzes an. Bei den RT-4-Zellen zeigt sich im Vergleich zu ECV-304 Zellen eine deutlich schwächere Suppression der UPK1A und OP18 mRNAs durch siRNA.

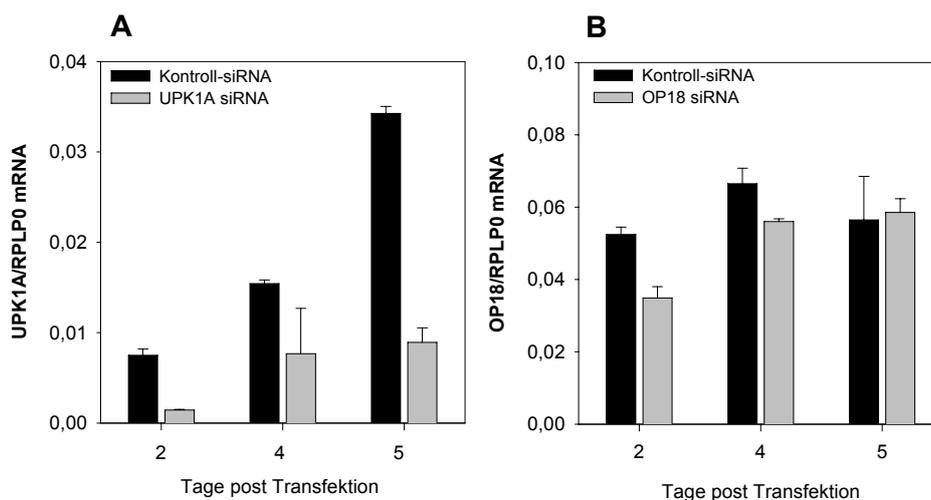


Abb. 3-41

Suppression der UPK1A mRNA (A) und OP18 mRNA (B) mittels siRNAs. RT-4-Zellen wurden mit siRNAs in Duplikaten transfiziert. An den angegebenen Zeitpunkten wurde Gesamt-RNA präpariert und die Abundanz der UPK1A mRNA sowie der OP18 mRNA über RT-qPCR in Triplikaten bestimmt. Die mRNA Kopienzahlen wurden auf das endogene Referenzgen RPLP0 normalisiert. Die dargestellten Balken repräsentieren die Mittelwerte \pm Standardabweichung aus den Duplikaten.

3. Ergebnisse

Nach siRNA-vermittelter Hemmung der OP18 und UPK1A mRNA in den RT-4-Zellen konnten keine deutlichen Expressions-Änderungen der ausgewählten tumorrelevanten und stoffwechselphysiologischen mRNAs beobachtet werden, was wahrscheinlich auf die schwächere Suppression der Target-mRNAs im Vergleich zu den ECV-304-Zellen zurückzuführen ist. Diese Beobachtung wird exemplarisch in der Abb. 3-42 für die Expression der BAX mRNA sowie für die mRNA-Ratio CC3/TC3 dargestellt. Für die BAX mRNA betrug der maximale Faktor zwischen den drei unterschiedlichen Zeitpunkten 1,6 (Abb. 3-42 A, 5.Tag nach Transfektion), für die CC3/TC3 Ratio betrug der maximale Faktor 1,5 (Abb. 3-42 B, 4.Tag nach Transfektion). Die geringen Unterschiede in der Expression Apoptose-relevanter mRNAs nach Suppression der UPK1A und OP18 mRNA deuten darauf hin, dass eine Induktion von Apoptose in den RT-4-Zellen unwahrscheinlich ist.

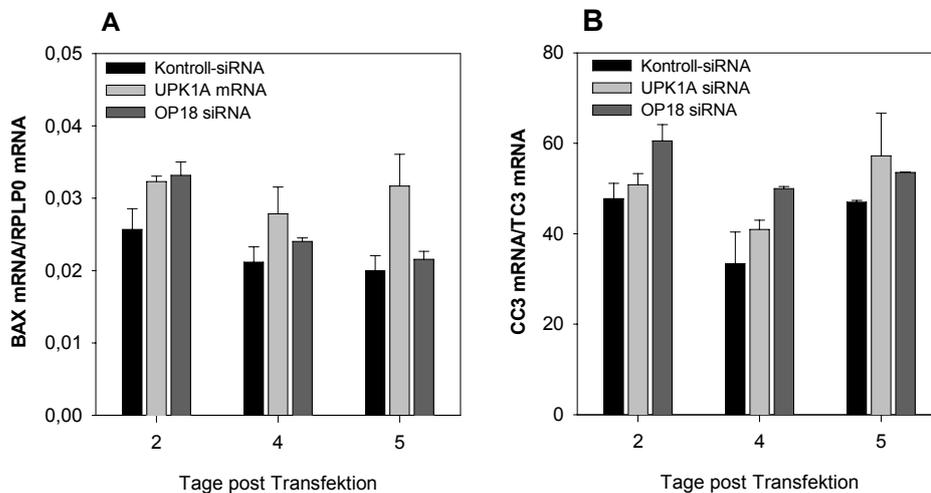


Abb. 3-42 **Veränderte Genexpression Apoptose-relevanter Gene nach siRNA-vermittelter Suppression von UPK1A und OP18 mRNA.** RT-4-Zellen wurden mit siRNAs in Duplikaten transfiziert. An den angegebenen Zeitpunkten wurde Gesamt-RNA präpariert und die Abundanz der BAX mRNA (A) sowie der CC3 und TC3 mRNA (B) über RT-qPCR in Triplikaten bestimmt. Die mRNA Kopienzahlen wurden auf das endogene Referenzgen RPLP0 normalisiert. Die Balken repräsentieren die Mittelwerte \pm Standardabweichung aus den Duplikaten.

3.3.4 Phänotypische Charakterisierung von siRNA-supprimierten Zellen

Durch die vorangegangenen Experimente konnte gezeigt werden, dass die UPK1A und OP18 mRNA durch siRNA-vermittelte Suppression in der „G3“-Harnblasenkarzinomzelllinie ECV-304 sehr effektiv über 4 Tage gehemmt wurden. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass die siRNA-vermittelte Suppression der OP18 mRNA ebenfalls eine starke Reduktion der OP18-Proteinexpression ab dem 2. Tag nach der Transfektion bewirkt. Außerdem konnte beobachtet werden, dass weitere tumorrelevante mRNAs ebenfalls differentiell exprimiert wurden. Im Besonderen deutete die erhöhte CC3/TC3 mRNA-Ratio

auf eine wahrscheinliche Induktion von Apoptose in den OP18-supprimierten ECV-304-Zellen hin. In den folgenden Experimenten wurde die Veränderung des Phänotyps der Zellen unter Suppression der Target-mRNAs untersucht.

3.3.4.1 Viabilität bei Hemmung von UPK1A und OP18

Die Veränderung des Phänotyps von ECV-304-Zellen unter Suppression von UPK1A und OP18 mRNA wurde zunächst anhand der Zellviabilität untersucht. Die Viabilität wurde mittels (MTS)-Assay bestimmt. Der Einfluss der Suppression von UPK1A bzw. OP18 mRNA auf die Zellviabilität von ECV-304 wurde 1, 2, 3 und 4 Tage nach Transfektion bestimmt.

Im Vergleich zur Kontrolle ging die Zellviabilität von den UPK1A und OP18 siRNA-behandelten Zellen über den untersuchten Zeitraum kontinuierlich bis auf 38 bzw. 35% zurück (Abb. 3-43).

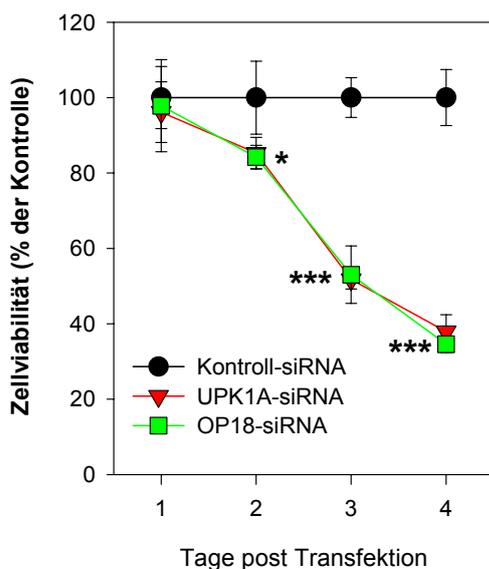


Abb. 3-43

Einfluss der siRNA-vermittelten Suppression von UPK1A und OP18 mRNA auf die Zellviabilität. Die ECV-304-Zellen wurden mit den siRNAs über den angegebenen Zeitraum behandelt. Anschließend wurde die Viabilität anhand des MTS-Assays bestimmt und auf diejenige des Kontroll-Ansatzes normalisiert. Dargestellt werden die Mittelwerte \pm Standardabweichung, bestimmt aus 3 unabhängigen, in Triplikaten ausgeführten Experimenten. *, $p = 0,05$ versus Kontrolle. ***, $p < 0,001$ versus Kontrolle.

3.3.4.2 Zellproliferation bei Hemmung von UPK1A und OP18

Durch den MTS-Assay konnte gezeigt werden, dass die Zellviabilität nach Suppression von OP18 und UPK1A mRNA deutlich zurückging. Zur Analyse der Proliferation siRNA-behandelter ECV-304-Zellen wurde die Zellzahl mittels Trypanblau-Färbung an aufeinanderfolgenden Tagen bestimmt. Im Vergleich zur Kontrolle war das Wachstum von OP18- und UPK1A-siRNA behandelten ECV-304-Zellen über den untersuchten Zeitraum gehemmt (Abb. 3-44 A). Die Verdopplungszeit im Kontroll-Ansatz betrug 25 h, bei den OP18-siRNA-behandelten Zellen 47 h und die siUPK1A-behandelten Zellen stellten über den untersuchten Zeitraum die Zellteilung nahezu ein (Verdopplungszeit = 98 h).

3. Ergebnisse

Der über den untersuchten Zeitraum gemittelte, prozentuale Anteil toter Zellen in der Population war im Kontroll-Ansatz und nach Suppression von OP 18 mRNA mit 1,9% identisch. Nach Suppression der UPK1A mRNA stieg der Anteil toter Zellen auf 3,8%.

Wie schon bei der mRNA Expressionsanalyse gezeigt, waren in RT-4-Zellen die Auswirkungen der siRNA Transfektionen auch auf die Proliferation deutlich geringer. Die Verdopplungszeit (VZ) war bei UPK1A-siRNA-behandelten Zellen geringfügig verlängert ($VZ_{UPK1A\ siRNA} = 45\text{ h}$; $VZ_{Kontroll-siRNA} = 39\text{ h}$, Abb. 3-44 B). Zellen, welche mit OP18 mRNA-gerichteter siRNA transfiziert wurden, zeigten im Vergleich zur Kontrolle keine signifikante Änderung der Verdopplungszeit ($VZ_{OP18\ siRNA} = 40\text{ h}$). Der gemittelte, prozentuale Anteil toter Zellen war in allen Ansätzen vergleichbar (6–7,4%).

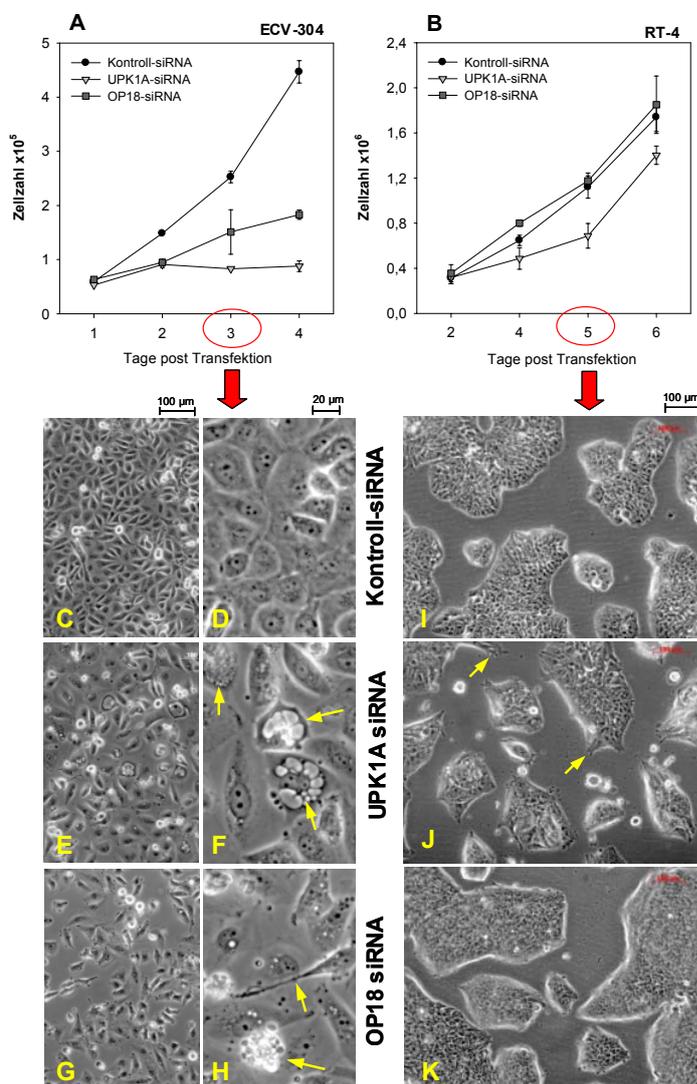


Abb. 3-44
Wachstumskurve **siRNA-**
behandelter ECV-304- (A) und RT-4-
Zellen (B) sowie deren Morphologie
(C – H bzw. I – K). Die Zellen wurden mit siRNAs in Duplikaten transfiziert und an den angegebenen Zeitpunkten geerntet. Die Verdopplungszeiten der Zellen wurden mittels Trypanblau-Färbung bestimmt. Im Zellkulturüberstand befindliche Zellen wurden nicht in die Bestimmung der Zellzahl miteinbezogen. Die Symbole repräsentieren die Mittelwerte \pm Standardabweichung der Trypan-negativen Zellen (Duplikate). An den angegebenen Zeitpunkten wurden die Zellen mikroskopisch untersucht. Für die ECV-304 Zellen wird die Morphologie der Zellen am 3. Tag nach der Transfektion in zwei unterschiedlichen Vergrößerungen dargestellt (400-fach: C – D; 100-fach: E – H). Für die RT-4-Zellen ist die Zellmorphologie am 5. Tag nach der Transfektion mit siRNA abgebildet (400-fache Vergrößerung: I – K).

Zusätzlich wurde die Morphologie der ECV-304-Zellen am 3. Tag nach der Transfektion mikroskopisch untersucht (Abb. 3-44 C–K). Besonders auffällig war eine starke Ausbildung von Vakuolen nach Suppression der UPK1A mRNA (Abb. 3-44 F, siehe Pfeile). Die

3. Ergebnisse

Hemmung von OP18 mündete in eine Schrumpfung des Zytoplasmas sowie die Abschnürung von Bläschen an der Plasmamembran, was den typischen morphologischen Merkmalen einer apoptotischen Zelle entspricht (Abb. 3-44 H, siehe oberen bzw. unteren Pfeil).

Bei RT-4 Zellen waren die morphologischen Veränderungen deutlich geringer, am 5. Tag nach der Transfektion war in den siUPK1A-behandelten Zellen keine klare Zellgrenze mehr nachzuweisen. Die Zellen zeigten eine eher „amöbenartige“ Form (Abb. 3-44 J, siehe Pfeile). Die OP18-supprimierten RT-4-Zellen unterschieden sich nicht wesentlich von den Kontroll-Zellen.

3.3.4.3 Apoptoserate bei Hemmung von UPK1A und OP18

Im Folgenden wurde untersucht, ob der Rückgang der Zellviabilität und der Proliferationsraten von ECV-304-Zellen nach der Suppression von UPK1A und OP18 auf die Induktion von Apoptose zurückgeführt werden kann. Hierfür wurde die Aktivierung der Caspasen 3 und 7 an verschiedenen Zeitpunkten nach der Transfektion von siRNA bestimmt. Als Positiv-Kontrolle für den Apoptose-Nachweis wurden ECV-304-Zellen in Serum-depletiertem Medium (1% fötales Kälberserum) mit einer Konzentration von 1 μ M Staurosporin über einen Zeitraum von 24 h inkubiert [89]. Bei der Induktion von Apoptose in ECV-304-Zellen durch Staurosporin kam es zur Aktivierung der Caspasen 3 und 7, wobei die Aktivität der Caspasen abhängig von der Zellzahl ist (Abb. 3-45). Die Caspase-Aktivität wurde folglich auf die Zellviabilität normalisiert.

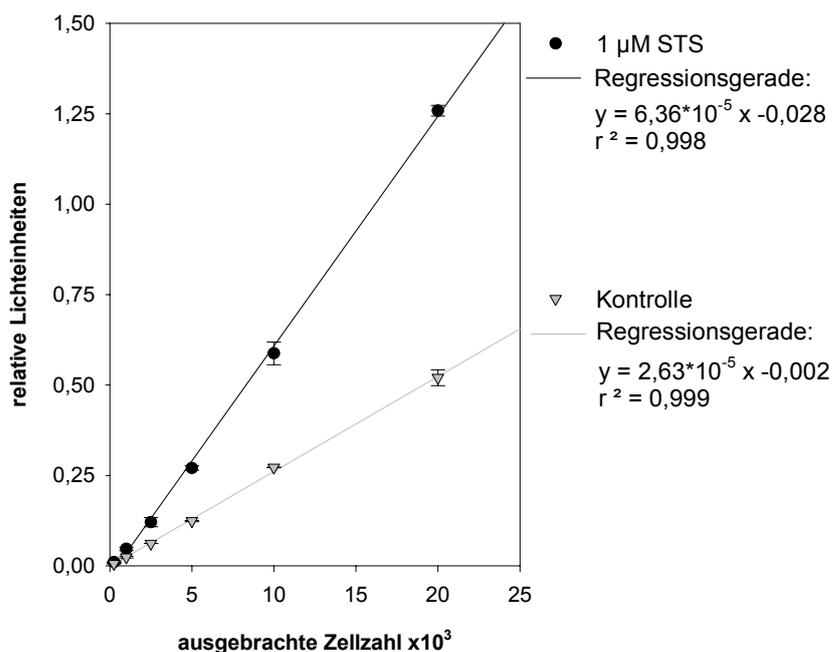


Abb. 3-45

Caspase 3/7-Aktivität nach Induktion von Apoptose mittels Staurosporin (STS). ECV-304-Zellen wurden in den angegebenen Zelldichten in eine Vertiefung einer 96-well Zellkulturplatte ausgebracht. Nach 24 h wurden die Zellen mit 1 μ M STS für weitere 24 h inkubiert. Anschließend wurde die Aktivierung der Caspase 3/7 (relative Lichteinheiten, y-Ordinate) in Abhängigkeit der ausgebrachten Zelldichte (250, 2.500, 5.000, 10.000 und 20.000 Zellen; x-Ordinate) in Duplikaten bestimmt. Die Symbole repräsentieren die Mittelwerte \pm Standardabweichung dieser Duplikate.

3. Ergebnisse

Der folgenden Abbildung kann entnommen werden, dass nach siRNA-vermittelter Suppression von OP18 mRNA am 3. Tag nach der Transfektion eine erhöhte Caspase 3/7 Aktivität vorlag und demzufolge Apoptose in den Zellen induziert wurde. Am 4. Tag nach Transfektion lag in den OP18-supprimierten Zellen eine 3,5-fache Erhöhung der Caspase 3/7 Aktivität im Vergleich zur Kontrolle vor. Die UPK1A-siRNA behandelten Zellen zeigten keine gesteigerte Caspase 3/7-Aktivität und es kam nicht zur Apoptose-Induktion über Caspase 3/7 innerhalb des untersuchten Zeitraumes.

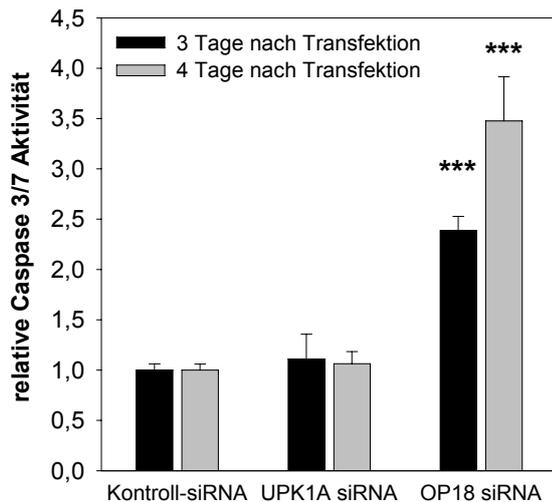


Abb. 3-46

Caspase 3/7-Aktivität nach siRNA-vermittelter Suppression von UPK1A und OP18 mRNA. ECV-304-Zellen wurden mit siRNAs transfiziert, und nach 3 bzw. 4 Tagen wurde die Caspase 3/7-Aktivität in Triplikaten bestimmt. Die aus dem Aktivitäts-Test resultierenden relativen Lichteinheiten wurden auf die Zellviabilität normalisiert. Hierfür wurde in den Reaktionsansätzen zuerst die Esterase-Aktivität über FDA bestimmt. Die dargestellten Balken repräsentieren die normalisierte, gemittelte relative Caspase 3/7 Aktivität \pm Standardabweichung der Triplikate. ***, $p < 0,001$ versus Kontrolle.

3.3.4.4 Nachweis von Autophagosomen bei Hemmung von UPK1A und OP18

Aus dem vorangehenden Abschnitt geht hervor, dass der Rückgang der Zellviabilität in den ECV-304-Zellen nach Suppression der OP18 mRNA auf Apoptose zurückgeführt werden kann. Bei Suppression der UPK1A mRNA wurde keine Induktion von Apoptose über Caspase 3/7 nachgewiesen. Da der Rückgang der Zellviabilität nach Behandlung mit siUPK1A mit dem Auftreten von Vakuolen einherging, wurde untersucht, ob ein weiterer zum Zelltod führender Vorgang, die Autophagie, in den Zellen induziert wurde. Ein typisches Merkmal von Autophagie ist die ausgeprägte Ausbildung von autophagischen Vesikeln, den sogenannten Autophagosomen. Im Zuge einer Autophagie gehen Autophagosomen sehr wahrscheinlich aus den Ribosomen-freien Zisternen des Endoplasmatischen Retikulums hervor [136]. Die Autophagosomen schließen cytosolisches Material ein und fusionieren mit Lysosomen oder Vakuolen, wodurch die Degradation des Inhalts erfolgt [137]. Autophagie wird unter anderem unter Nährstoffmangel und Hypoxie induziert. Es wird außerdem vermutet, dass Autophagie unter anderem die erste Zellantwort auf die Induktion von Apoptose ist. Hierbei kommt es zur Aktivierung der Apoptose, wenn die Kapazitäten der Autophagie überladen sind. Ferner kann ein Zellzyklus-Arrest zur Induktion von Autophagie führen [zusammengefasst in 138].

3. Ergebnisse

Zur Überprüfung dieser Theorie wurden ECV-304-Zellen am 3.Tag nach Transfektion mit dem Fluoreszenzfarbstoff Monodansylcadaverin (MDC) inkubiert. MDC färbt Autophagosomen im perinukleären Bereich an [136]. Für die Lokalisation von MDC in der Zelle wurde der Zellkern mit dem Fluoreszenzfarbstoff SYTO-16 gefärbt. Der Abbildung 3-47 C kann entnommen werden, dass die exemplarisch dargestellten Kontroll-Zellen nur eine sehr schwache, diffuse rote Färbung (MDC) im perinukleären Bereich aufweisen und somit keine ausgeprägten Autophagosomen ausgebildet haben (Abb. 3-47 C & D).

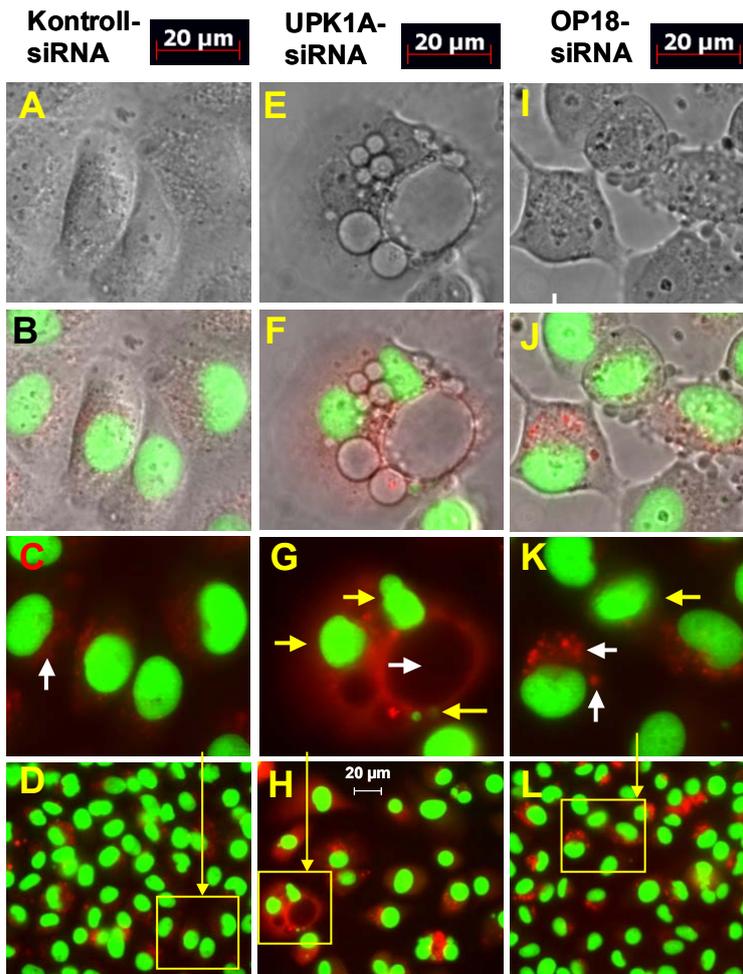


Abb. 3-47

Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von ECV-304-Zellen nach Suppression der UPK1A und OP18 mRNA (E – H bzw. I – L). Die Zellen wurden mit den angegebenen siRNAs transfiziert und nach 3 Tagen mit dem Fluoreszenzfarbstoff MDC zur Visualisierung der Autophagosomen sowie dem Fluoreszenzfarbstoff SYTO-16 zur Visualisierung des Zellkerns gefärbt. Es folgte die fluoreszenzmikroskopische Untersuchung in 400-facher Vergrößerung. Die Phasenkontrastaufnahmen sind jeweils in A, E, I dargestellt und in B, F, J mit den Fluoreszenzsignalen überlagert dargestellt. C, G, K und D, H, L zeigen die Fluoreszenzsignale für MDC (hier: rot) und SYTO-16 (grün). Die gelben Kästen geben die in C, G und K vergrößerten Ausschnitte an.

Nach Behandlung mit siOP18 weisen einzelne Zellen deutlich rote „Spots“ auf, was auf eine Ausbildung von Autophagosomen hindeutet (siehe Abb. 3-47 K, weiße Pfeile). Ferner ist ein apoptotischer, kondensierter Zellkern (grün) zu sehen (siehe Abb. 3-47 K, gelber Pfeil). Aus der Abb. 3-47 L kann aber entnommen werden, dass es nach der Behandlung mit siOP18 im Vergleich zur Kontrolle (Abb. 3-47 D) nicht zu einer vermehrten Induktion von Autophagie kam.

Die Suppression von UPK1A mRNA führt nicht zur Autophagie. Ferner kann der Abbildung entnommen werden, dass der Farbstoff MDC über das gesamte Zytoplasma diffus verteilt ist, was auf eine Diffusion durch eine defekte Plasmamembran hindeutet. Demnach schien

3. Ergebnisse

der intrazelluläre pH-Gradient zerstört. Darüber hinaus sind die Vakuolen nicht gefärbt. Jedoch konnte bei einer Vielzahl der Zellen eine Auflösung des Zellkerns beobachtet werden, wie exemplarisch in der Abbildung 3-47 F dargestellt (gelbe Pfeile).

Da die hier beobachteten Veränderungen unter UPK1A mRNA Suppression weder eindeutige Zeichen für Apoptose noch für Autophagie aufweisen, muss eine weitere Variante des Zelltods, die Nekrose, in Betracht gezogen werden. Nekrose ist eine traumatische Selbstzerstörung der Zelle, welche mit der Degradation von Organellen und der Auflösung des Zellkerns einhergeht. Weiterhin kommt es aufgrund von Schäden der Plasmamembran zu einer Volumenzunahme der Zelle. Darüber hinaus geht die Nekrose mit einer verstärkten Vakuolisierung einher, wie sie auch in der mikroskopischen Untersuchung siUPK1A-behandelter ECV-304-Zellen zu sehen ist (Abb. 3-44 F und 3-47 F), was mit der mikroskopischen Untersuchung der siUPK1A-behandelten Zellen konform geht (Siehe 3.3.4.2).

Diese Beobachtungen führten schließlich zu der Annahme, dass die Suppression von UPK1A am ehesten zu einem Nekrose-artigen, Caspase 3/7-unabhängigen Zelltod führt. Für eine genauere Analyse der nekrotischen Zellen könnte in weiteren Untersuchungen eine Propidium-Iodid-Färbung durchgeführt werden

3.3.4.5 Chemosensibilisierung bei Hemmung von UPK1A und OP18

Wie bereits beschrieben wird durch siRNA induzierte Hemmung von UPK1A und OP18 die Zellviabilität in ECV-304 Zellen auf ca. die Hälfte reduziert. Bei UPK1A geschieht dies durch einen Apoptose-unabhängigen Mechanismus, bei OP18 geschieht dies unter Apoptose-Induktion.

Daraus ergab sich die Frage, ob die siRNA induzierte Hemmung der UPK1A und OP18 mRNA einen Einfluss auf eine Behandlung mit einem Apoptose-induzierendem Chemotherapeutikum (Cisplatin) hat. Hierzu wurden ECV-304 Zellen mit siRNAs transfiziert und nach 2 Tagen zusätzlich mit Cisplatin für weitere 24 h behandelt. Die Zellviabilität wurde mittels des oben beschriebenen MTS-Assays untersucht.

Zunächst wurde anhand unterschiedlicher ECV-304 Zelldichten gezeigt, dass der MTS-Assay im Bereich der $OD_{492\text{ nm}}$ Werte von 0,07 bis 1,93 linear verläuft (Abb. 3-48).

Nach Suppression der Target-mRNAs war die Zellviabilität ohne zusätzliches Cisplatin am 3. Tag nach der Transfektion auf die Hälfte reduziert (siehe auch Abschnitt 3.3.4.1). Bei zunehmenden Konzentrationen von 1-12 $\mu\text{g/ml}$ Cisplatin zeigte sich eine zusätzliche Verringerung der Zellviabilität im Vergleich zu der Kontroll-siRNA. Jedoch war dieser Effekt bei Konzentrationen von 1-9 $\mu\text{g/ml}$ Cisplatin lediglich additiv. Bei einer Konzentration von 12 $\mu\text{g/ml}$ Cisplatin hingegen war die Zellviabilität unter OP18 mRNA Suppression deutlich um den Faktor 6,5 reduziert. Unter UPK1A mRNA Suppression zeigte sich hingegen kein zusätzlicher Effekt im Vergleich zur Kontrolle.

3. Ergebnisse

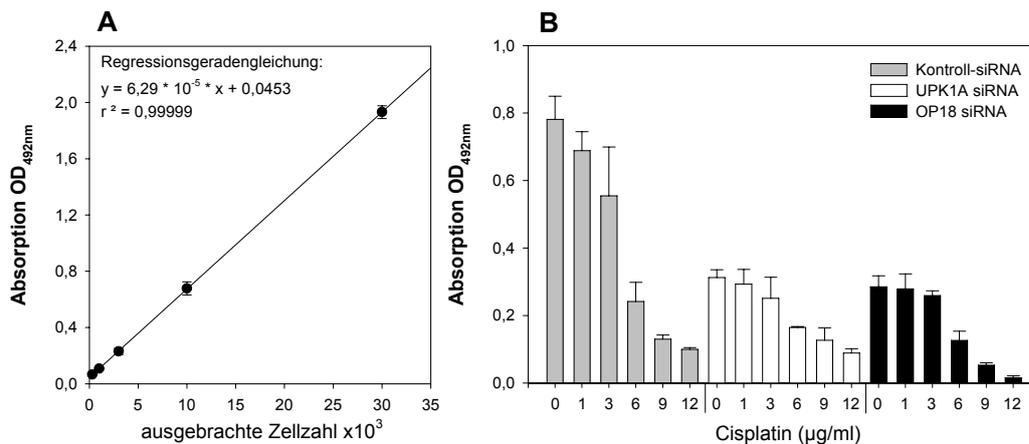


Abb. 3-48 **Untersuchung zur Chemosensibilisierung nach der Suppression von UPK1A und OP18 mRNA.** ECV-304-Zellen wurden mit siRNA gegen die Target-mRNAs transfiziert. Nach einer Inkubation von 48h wurden die Zellen mit den angegebenen Konzentrationen des Chemotherapeutikums Cisplatin für einen Zeitraum von 24 h inkubiert. Anschließend wurde die Zellviabilität anhand des MTS-Assays durchgeführt. Die resultierende OD bei 492 nm wird auf der y-Ordinate der Abbildung (B) dargestellt. Die dargestellten Balken repräsentieren die Mittelwerte \pm Standardabweichung von Triplikat-Ansätzen. Vorab wurde untersucht, über welchen OD-Bereich die Messung linear verläuft (A). Hierfür wurden 300, 1.000, 3.000, 10.000 und 30.000 ECV-304-Zellen im 96 well-Format ausgebracht. Nach 24 h wurde der MTS-Assay durchgeführt. Die Symbole stellen die Mittelwerte \pm Standardabweichung von Triplikaten dar.

Dieser beobachtete Effekt der Chemosensibilisierung nach Suppression von OP18 bei einer Konzentration von 12 $\mu\text{g/ml}$ Cisplatin wurde in drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten bestätigt und in der folgenden Abbildung zusammengefasst. Die Behandlung mit Cisplatin war in den OP18 mRNA-supprimierten Zellen um den Faktor 2,7 effektiver als in dem Kontroll-siRNA Experiment.

Darüber hinaus konnte gezeigt werden dass in UPK1A-supprimierten Zellen die Wirksamkeit von Cisplatin sogar um den Faktor 1,8 verschlechtert wurde (Abb.3-49).

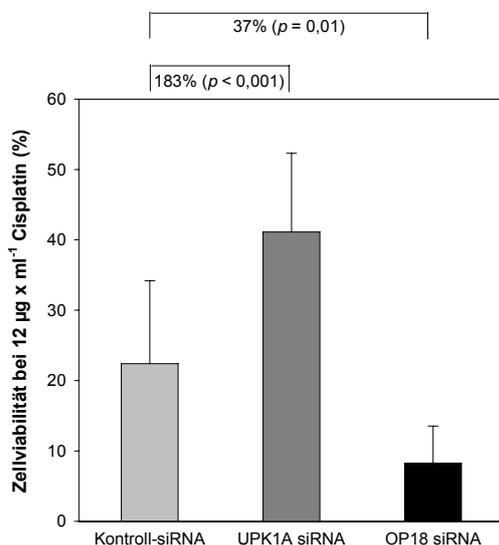


Abb. 3-49 **Chemosensibilisierung OP18 mRNA-supprimierter ECV-304-Zellen nach Cisplatin-Behandlung.** Die Zellen wurden mit den angegebenen siRNAs transfiziert und nach 48 h mit 12 $\mu\text{g/ml}$ Cisplatin über einen Zeitraum von 24 h inkubiert. Anschließend wurde die Zellviabilität anhand des MTS-Assays bestimmt. Die resultierende Zellviabilität nach Cisplatin-Behandlung wurde in Relation zum jeweiligen Ansatz ohne Cisplatin gesetzt. Die dargestellten Balken repräsentieren die Mittelwerte \pm Standardabweichung aus 3 unabhängigen Experimenten mit jeweils 3 Replikaten. Über der Abbildung wird der prozentuale Unterschied zwischen dem Kontroll-Ansatz und dem UPK1A siRNA- bzw. OP18 siRNA-Ansatz aufgeführt. Die statistische Signifikanz (p) des Unterschieds wurde anhand des ungepaarten Student's t-Test errechnet.

3.3.5 Modell zur tumorbiologischen Rolle von UPK1A und OP18

In der folgenden Abbildung werden die in dem Kapitel 3.3 erhobenen Daten schematisch für die Zelllinie ECV-304 dargestellt.

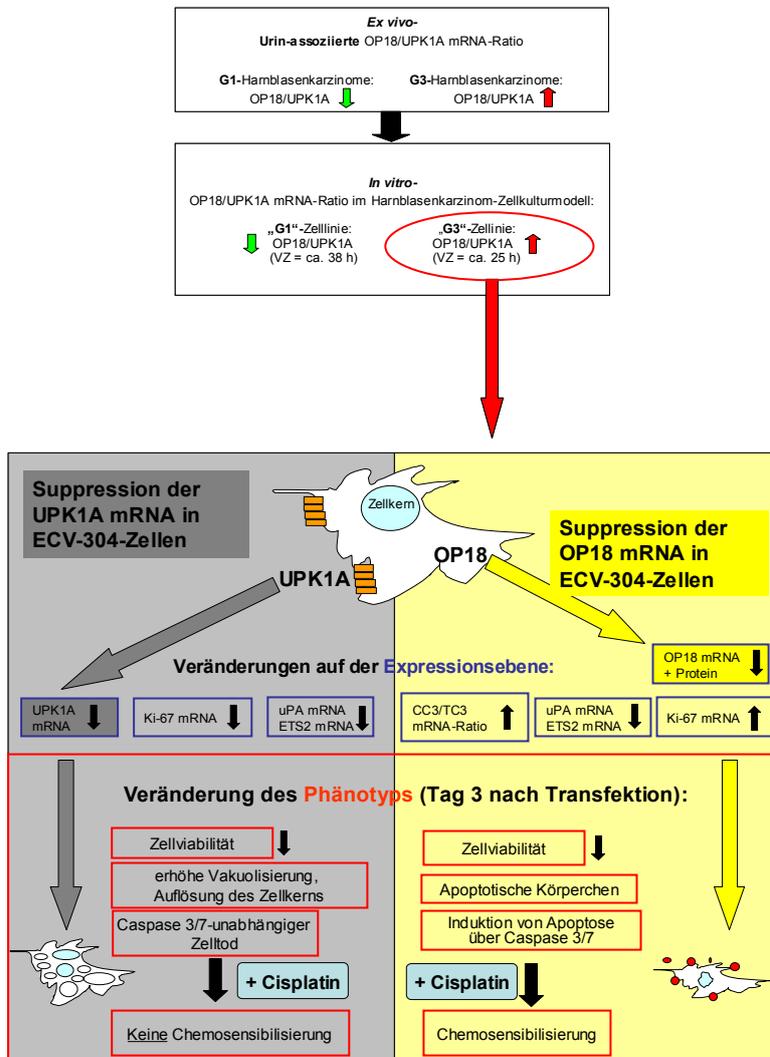


Abb. 3-50 Phänotypische Veränderungen nach der Suppression von OP18- und UPK1A-mRNA in ECV-304-Zellen.

4 Diskussion

4.1 Nicht-invasive Diagnostik des Harnblasenkarzinoms

Bis heute konnte kein diagnostischer urinegebundener Tumormarker für das Harnblasenkarzinom identifiziert werden, welcher den invasiven „Goldstandard“, die Zystoskopie, ersetzen könnte. Gerade neuere Untersuchungen zeigen, dass anhand der konventionell angewendeten Weißlichtendoskopie nicht nur etwa 50% der Carcinomata *in situ* [139], sondern auch ein Teil der papillären Tumoren übersehen werden [140]. Hinsichtlich der anfallenden Kosten und des Zeitaufwands aber auch der Einwilligungsbereitschaft der Patienten wird eine nicht-invasive Diagnostik auf der Basis von Körperflüssigkeiten angestrebt werden. Bei der Entwicklung einer nicht-invasiven Diagnostik für das Harnblasenkarzinom liegt es nahe, Urinproben als Ausgangsmaterial zu verwenden, wobei eine leichte Zugänglichkeit zum Probenmaterial gegeben ist. Jedoch ist Urin, im Gegensatz zu Blut, eine sehr heterogene Körperflüssigkeit mit stark variierenden Proteinmengen, Zellzahlen, pH-Werten und Salzkonzentrationen.

Bei der Suche nach neuen Tumormarkern sind nicht nur Marker im Fokus, durch die Harnblasenkarzinome nicht-invasiv, sensitiv und spezifisch zu einem frühen Zeitpunkt diagnostizieren werden können. Die Identifikation von prognostischen Markern ist ebenfalls von hohem klinischem Interesse, denn nach wie vor erfolgt die Klassifizierung der Tumoren vorwiegend nach anatomischen Kriterien (Infiltrationstiefe, Lymphknotenstatus) und histopathologischen Kriterien (Differenzierungsgrad des Tumors). Derartige Tumormarker könnten dazu beitragen, dass das Malignitäts-Potential eines Tumors richtig eingeschätzt und eine adäquate Therapieplanung schon vor invasiven Eingriffen ermöglicht wird. Dadurch könnten beispielsweise Zweiteingriffe, wie Nachresektionen, und schließlich auch die Überlebensraten erhöht werden.

Die Eignung von Gesamt-Urin als Grundlage zur Identifikation von Harnblasenkarzinomen anhand des mRNA-Tumormarkers Ki-67 wurde 2004 von Menke *et al.* gezeigt [115]. Kürzlich wurde Gesamturin von weiteren Arbeitsgruppen als Ausgangsmaterial für die Diagnose von Prostatakarzinomen mittels RNA-Tumormarkern untersucht [141,142]. Die bis zum heutigen Zeitpunkt durchgeführten Studien zur Identifikation von Harnblasenkarzinomen auf der Grundlage von Urinproben sind überaus vielversprechend und demonstrieren, dass anhand von Urinproben eine sensitive und spezifische Diagnostik mittels RNA-Tumormarker möglich ist. Es wird aber deutlich, dass die Entwicklung eines standardisierten Protokolls zum Sammeln, Stabilisieren und Lagern von Urinproben sowie für die RNA-Präparation und –Quantifizierung essentiell ist, bevor die publizierten RNA-Tumormarker schließlich eine Verwendung in der klinischen Diagnostik finden können.

4.1.1 RT-qPCR-basierte Tumordiagnostik im Gesamurin

Messenger RNAs sind im Gegensatz zu DNA besonders gut für den Aufbau eines diagnostischen Tests geeignet, weil die Expression von mRNAs ein überaus spezifischer und dynamischer Prozess ist. Bei der malignen Transformation kommt es zu transienten oder permanenten Veränderungen bezüglich der Expression von bestimmten mRNAs, welche den biologischen Status von Zellen, Geweben, Organen und Organismen widerspiegeln [143]. Die Änderungen auf der mRNA Expressionsebene von Tumorzellen haben wiederum einen veränderten Phänotyp zur Folge, hierzu können unter anderem die uneingeschränkte Zellteilung, die Herunterregulation der Apoptoserate, die Invasion, die Metastasierung und die Angiogenese beitragen. Neben den mRNAs gelten microRNAs (miRNAs) als potentielle Tumormarker, da in verschiedenen Tumoren spezifische miRNA-Signaturen identifiziert wurden, welche mit der Diagnose, der Tumorklassifizierung, der Progression, der Prognose und dem Verhalten nach einer Therapie assoziiert waren [zusammengefasst in 144].

Das im Rahmen dieser Arbeit untersuchte Probenmaterial, Gesamurin, ist sehr heterogen in Hinblick auf die Zusammensetzung verschiedener Zelltypen. Dadurch erfolgt die Detektion von tumorspezifischen mRNAs und miRNAs oftmals unter einem hohen Hintergrund an normalen, nicht-malignen Zellen. Selbst im Gewebematerial eines Tumors können neben malignen auch normale, nekrotische sowie apoptotische Zellen vorliegen. Eine hohe Wahrscheinlichkeit für eine homogene Zellzusammensetzung ist nur bei Laser-mikrodissektionierten Tumorschnitten gegeben [145]. Eine derartige Technik kann bei einer nicht-invasiven Diagnostik nicht angewendet werden. Die RNA-Analyse in einem heterogenen Probenmaterial mit unterschiedlichen Zelltypen ist aber informativer als die Analyse einzelner Tumorzellen, da es bei der Tumorigenese zur Interaktion von Tumorzellen mit den umgebenden, nicht-malignen Zellen kommt, wodurch die Genexpression dieser Zellen erheblich beeinflusst werden kann. Unbestritten ist, dass die Interpretation der detektierten mRNA oder miRNA-Abundanzen in komplexen Proben schwierig ist. Weiterhin ist zu beachten, dass potentielle Tumormarker, welche aus Genexpressionstudien anhand von Tumorgewebe hervorgegangen sind, nicht zwingend für eine nicht-invasive Diagnostik auf der Basis von Körperflüssigkeiten geeignet sind. Aufgrund dessen wurde in der vorliegenden Arbeit zunächst ein RT-qPCR-basiertes *Screening* auf der Grundlage von Gesamurin für die Identifizierung von potentiellen mRNA- und miRNA-Tumormarkern durchgeführt. Anschließend wurde untersucht, ob ausgewählte, vielversprechende RNAs für die Entwicklung eines RT-qPCR-basierten Tests geeignet sind.

Die qPCR ist deswegen so hervorragend für eine Diagnostik geeignet, weil viele Proben parallel analysiert werden können und durch den Amplifikationsschritt auch Proben untersucht werden können, bei welchen der Gehalt an Nukleinsäuren gering ist. Dadurch ist die RT-qPCR ein sehr sensitives und flexibles Verfahren zum Nachweis von mRNA [146]. Die Schritte der RNA-Präparation, der cDNA-Synthese und der qPCR können durch die Verwendung von Robotern vollständig automatisiert werden, wodurch die Inter-Assay Variation oder mögliche Kontaminationen sowie die Analyse-Kosten enorm reduziert

4. Diskussion

werden können. Durch die RT-qPCR-basierte Analyse von mRNAs entfallen zeitaufwendige Prozeduren wie beispielsweise das Herstellen von analytischen Gelen oder die radioaktive Markierung von Sonden wie im *Northern Blotting* [147] oder im *RNase Protection Assay* [148]. Für den Nachweis von mRNAs über einen *Northern Blot* werden zudem größere Mengen an mRNAs benötigt, und es können nur wenige Proben parallel analysiert werden. Somit ist die Durchführung sehr kostenintensiv und nicht realisierbar für eine Routine-Diagnostik. Die Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH) ist das komplexeste Verfahren zum Nachweis spezifischer mRNAs. Auch eine Verwendung von Microarrays zum spezifischen Nachweis von mRNAs ist aufgrund des hohen Zeit- und Kostenaufwands nicht für den Aufbau einer molekularen Diagnostik geeignet, obwohl durch neue Technologien auch der Einsatz geringster Mengen (wenige Nanogramm) an mRNA möglich ist [149] und sogar einzelne Zellen untersucht werden können [150]. Außerdem wird bei der Verwendung von Microarrays eine sehr hohe Dichte an Daten produziert, wodurch die Auswertung sehr kompliziert ist. Um anhand der generierten Daten eine klinisch relevante Aussage treffen zu können, wäre eine starke Reduktion dieser Daten notwendig. Demzufolge ist diese Technologie hauptsächlich für das *Screening* von Patientenproben nach möglichen Tumormarkern und –Targets geeignet.

Die Verwendung von RNA als Tumormarker wird nicht nur befürwortet. Im Gegensatz zu DNA ist RNA sehr labil, wodurch eine gute Integrität vor allem in Körperflüssigkeiten mit einem hohen Gehalt an Nukleasen nicht mehr gegeben ist und es zu Sensitivitätsproblemen bei der RT-qPCR-basierten Detektion kommen kann [151]. Ein weiterer Nachteil der Verwendung von RNA gegenüber DNA ist die zusätzlich durchzuführende Reverse Transkriptase-Reaktion. Es wurden aber bereits Systeme entwickelt, bei denen die cDNA-Synthese und die qPCR gekoppelt durchgeführt werden, wodurch zwar nicht die Synthesezeit aber der zusätzliche Arbeitsaufwand entfällt. Eine ein-Schritt RT-PCR reduziert die Wahrscheinlichkeit für die Einbringung von Kontaminationen in die Reaktionsansätze und ist angebracht wenn nur wenige mRNAs amplifiziert werden sollen. Eine Optimierung der Schritte ist in diesem System aber nicht möglich, wodurch die Sensitivität niedriger ist als in der zwei-Schritt RT-PCR [64]. Die cDNA-Synthese ist als kritischer Schritt anzusehen, da die mRNA vollständig in cDNA umgeschrieben werden muss, um die tatsächliche Kopienzahl der mRNA über die qPCR bestimmen zu können. Ståhlberg *et al.* konnten zeigen, dass die Reverse Transkriptase-Reaktion zu größeren Varianzen führte als die qPCR selbst [152]. Diese Erkenntnis wurde in der vorliegenden Arbeit bestätigt, da der Inter-Assay CV der RT-qPCR bei 14%, der Inter-Assay CV der qPCR alleine aber nur bei 9% lag (Abschnitt 3.2.1.3.5). In dieser Arbeit wurden zur Überprüfung der Effizienz der cDNA-Synthese Reaktion verschiedene Kopienzahlen von RNA_{LUC} eingesetzt (Abb. 3-10, Abschnitt 3.2.1.3.1). Die in cDNA umgeschriebenen RNA_{LUC} Kopien wurden über RT-qPCR bestimmt und mit der DNA-Standardkurve verglichen. Die Effizienz der cDNA-Standardgerade war mit 1,99 optimal, und der Regressionskoeffizient von 0,9959 zeigte lediglich eine geringe Abweichung der einzelnen Verdünnungen von der Ausgleichsgeraden an. Von den fünf verschiedenen Verdünnungsstufen, welche in die cDNA-Synthese eingesetzt wurden, wiesen zwei der Verdünnungen nach der DNA-Standardkurve eine etwas geringere Kopienzahl auf. Folglich war die Effizienz für die

4. Diskussion

Synthese von RNA_{LUC} cDNA sehr gut. Das *in vitro* RNA-Transkript RNA_{LUC} weist aber keine Kappe aus methyliertem Guanin am 5'-Ende auf und ist nicht mit einem Poly(A)-Schwanz am 3'-Terminus ausgestattet, wodurch die Erkenntnisse aus den Untersuchungen mit RNA_{LUC} nicht ausnahmslos auf die untersuchten mRNAs übertragen werden können, da die Aktivität der Reversen Transkriptase durch die Sekundärstruktur des RNA Transkripts beeinflusst wird [153]. Daher wurde in der vorliegenden Arbeit die RNA zu Beginn der cDNA-Synthese unter stringenten Bedingungen (10 min bei 75°C statt 5 min bei 65°) denaturiert, um eine bessere Zugänglichkeit für die Primer zu gewährleisten. Die gute Effizienz der cDNA-Synthese kann vermutlich auch auf die Verwendung von Random Hexamer Primern zurückgeführt werden. Random Hexamer Primer haben gegenüber Oligo-(dT) Primern den Vorteil, dass diese die cDNA-Synthese in Abhängigkeit zur RNA-Länge an verschiedenen Positionen der mRNA initialisieren können. Hierdurch wird die Wahrscheinlichkeit für eine 100%ige Synthese-Ausbeute erhöht, wobei allerdings die Möglichkeit zur Überschätzung der tatsächlichen mRNA Kopienzahl in einer Probe besteht [154]. Durch die Verwendung verschiedener Klassen von Oligonukleotiden (Random Hexamer Primer, Oligo-(dT) Primer oder Gen-spezifischer Primer) für die Synthese von cDNA können somit trotz der Detektion identischer mRNA-Tumormarker in entsprechenden Probenmaterialien große Abweichungen zwischen den Ergebnissen verschiedener Arbeitsgruppen entstehen. Der Unterschied in der Ausbeute der cDNA-Synthese kann auch in Abhängigkeit von der verwendeten Reversen Transkriptase und der untersuchten mRNA-Sequenz um mehr als einen Faktor 100 variieren [155]. Daher wurden für diese Studie drei Enzyme, modifizierte M-MLV Reverse Transkriptasen (Superscript™ II + III, Invitrogen; iScript™, Bio Rad, Daten nicht gezeigt) getestet. Es zeigte sich, dass unter Verwendung von Superscript II und III die gemessene Abundanz der Ki-67 mRNA etwa 3-fach höher war gegenüber der iScript Reversen Transkriptase.

Zur Gewährleistung der für eine Diagnostik essentiellen sensitiven und reproduzierbaren Amplifikation der cDNA mittels qPCR müssen, analog zur cDNA-Synthese, die Reaktionsbedingungen für diese komplexe Technik optimiert werden. Einen großen Einfluss auf die RT-qPCR-basierte Detektion von mRNAs haben die verwendeten qPCR-Amplikons. Ein gutes PCR-Amplikon ist durch eine optimale Effizienz der Amplifikationsreaktion gekennzeichnet. Um zu verhindern, dass die Primer vor dem Hybridisieren der verwendeten TaqMan®-Sonden an die komplementäre DNA binden und die Polymerisation initialisieren, wurden Sonden mit einer etwa 8–10°C höheren Schmelztemperatur als die Primer entworfen. Zudem wurde bei dem Entwurf der Sonden darauf geachtet, dass kein Guanosin am 5'-Ende der Sonde lokalisiert ist, um ein *Quenching* der Reporterfluoreszenz zu vermeiden. Zudem wurden in dieser Arbeit kurze Amplikons favorisiert, da diese generell zu einer höheren qPCR-Effizienz führen, weil diese besser denaturieren und deswegen nach einem Amplifikationszyklus wieder gut zugänglich für die Primer und Sonden sind. Außerdem wurde mittels Positionierung von Primern oder der Sonde auf Exon/Exon-Grenzen eine Amplifikation von genomischer DNA ausgeschlossen [156], was durch die Mitführung von non-RT-Kontrollen überprüft wurde. Exon/Exon-Primer oder -Sonden konnten bei fast allen in dieser Arbeit beschriebenen Amplikons verwendet werden. Die CC3, TC3 und UBC mRNA wurden über Intron-

überbrückende Primer amplifiziert. Das überbrückte Intron auf dem CC3 Gen ist mehrere tausend Basen lang, wodurch genomische DNA nicht effektiv amplifiziert wird. Das Amplikon der genomischen UBC DNA ist zusammen mit dem Intron auch mehrere 100 Basen groß, wodurch ebenfalls keine effektive Amplifikation stattfinden kann. Bei der Auswertung der generierten qPCR-Daten wurde versucht, die Positionierung des Fluoreszenz-Schwellenwertes möglichst genau in die lineare Phase der qPCR zu legen, da hier die Amplifikation nicht durch die Limitation der Reaktionskomponenten beeinflusst wird. Dieser *Threshold* wurde für jedes Amplikon definiert und über alle durchgeführten Messungen konstant gehalten, um eine hohe Reproduzierbarkeit der Quantifizierung zu erhalten.

Unter Berücksichtigung der aufgezählten Punkte wurde ein RT-qPCR-Protokoll entwickelt, welches eine überaus sensitive Quantifizierung geringster Mengen an mRNA von minimal 10 Kopien pro Reaktionsansatz ermöglichte. Die Amplifikation seriell verdünnter PCR-Standards (siehe Anhang, Abschnitt 7.2) zeigt die äußerst präzise und effiziente Detektion bei allen verwendeten TaqMan®-Amplikons in einer großen linearen dynamischen Spannweite von 10 bis 10^6 Kopien. Die in dieser Arbeit durchgeführte Optimierung der cDNA-Synthese durch die Verwendung geeigneter Random Hexamer Primer und einer effizienten Reversen Transkriptase sowie die Durchführung einer stringenteren initialen Denaturierung der RNA zusammen mit dem Entwurf effizienter qPCR-Amplikons waren optimale Voraussetzungen für den Aufbau einer RT-qPCR-basierten Diagnostik des Harnblasenkarzinoms.

4.1.2 Phase 1 der Tumormarker-Entwicklung: Technische Analyse der RT-qPCR-basierten Quantifizierung von RNAs im Urin

In der Regel wird in der ersten Phase zur Entwicklung eines Tumormarkers das Analyse-System anhand einer sogenannten „Trainings“-Population (Urinproben einer kleineren Anzahl von Spendern) in Hinblick auf Reproduzierbarkeit der Messdaten beschrieben. Dies ist notwendig, da die Detektion eines Tumormarkers robust und reproduzierbar sein sollte (geringe Intra- und Inter-Assay Variabilität). Für viele der bisher publizierten mRNA-Tumormarker ist auffällig, dass die erzielten Sensitivitäten und Spezifitäten oftmals nicht in einem anderen Labor reproduziert werden konnten. Das liegt unter anderem daran, dass kein generelles, standardisiertes Protokoll zur Detektion dieser RNA-Tumormarker vorliegt. Ein allgemein gültiges, standardisiertes Protokoll sollte selbstverständlich schon bei der Generierung von Probenmaterial beginnen. Hier muss primär geklärt werden, welcher Urinbestandteil (Gesamturin, zellulärer Urin oder zellfreier Urin) für die Analyse verwendet werden soll. In der vorliegenden Arbeit fand die Tumormarker-Detektion auf der Grundlage von Gesamturin statt. Dadurch wird die Variabilität des Verfahrens reduziert, da der für die Präparation von Urinsediment notwendige Zentrifugationsschritt entfällt. Neben der Probengenerierung musste die Lagerung und Verarbeitung der Urinproben sorgfältig untersucht werden, denn schon bei diesen initialen Schritten zum Aufbau eines diagnostischen Tests kann eine signifikante Variabilität in das System eingeführt werden.

4. Diskussion

Deswegen wurden die Schritte zur RNA-Präparation und –Quantifizierung in der vorliegenden Arbeit anhand eines externen, artifiziellen RNA-Standards (RNA_{LUC}) charakterisiert. Eine Voraussetzung für diese Untersuchungen war die effiziente und schnelle Inaktivierung der RNasen im Probenmaterial. Es zeigte sich, dass das in dieser Arbeit entwickelte Verfahren zur sofortigen Inhibierung von RNasen im frisch abgegebenen Urin durch die Verwendung einer GuSCN-Pulver-haltigen Urin-Monovette überaus vorteilhaft für die Stabilisierung der RNAs war. Der frische Urin wird hierbei sofort nach der Abgabe in die Monovette aufgezogen und in einen Rotator gestellt, um das GuSCN-Pulver im Urin zu lösen, so dass die Endkonzentration, je nach Dichte des Urins, etwas über 6 M liegt. Dieser Schritt konnte direkt in der Klinik bzw. der Praxis durchgeführt werden, da hierfür keine aufwändige Laborausstattung wie beispielsweise das Vorhandensein einer Zentrifuge notwendig ist. Durch die Stabilisierung war die Abundanz der internen Referenz-mRNAs GAPDH, RPLP0 und UBC über einen Zeitraum von mindestens 5 h im GuSCN-stabilisierten Urin bei Raumtemperatur stabil. Aus der 6-fachen Aufarbeitung der Urinproben und RT-qPCR-basierter Quantifizierung ergab sich ein Inter-Assay CV von 6,39% für die GAPDH mRNA, 8,08% für die RPLP0 mRNA und 5,80% für die UBC mRNA (Tabelle 3-4, Abschnitt 3.2.1.3.2), wodurch das System sehr robust war und eine präzise Detektion non mRNAs ermöglichte. Für die Quantifizierung der miRNAs wurde ebenfalls die Inter-Assay Variabilität zwischen drei verschiedenen RNA-Präparationen aus Gesamturin bestimmt. Das ausgewählte RNA-Präparationsprotokoll „3“ ergab eine präzise RT-qPCR-basierte Bestimmung der miRNA-Abundanzen mit einem Inter-Assay CV von 0,18% für miR-16, 0,14% für miR-17-5p und 1,05% für miR-21 (Tabelle 3-1, Patient 1, Abschnitt 3.1.1). Durch die erfolgreiche Stabilisierung unringebundener RNAs mittels GuSCN ergibt sich die Möglichkeit, die Urin-beladene Monovette von der Klinik oder der Praxis in das Analyse-Labor zu versenden. Die Urin-Monovette kann im Labor eingefroren werden, wodurch die Proben über einen längeren Zeitraum bei –80°C gelagert werden können. Für die Standardisierung der einzelnen Arbeitsschritte wurde eine SOP (*Standard Operating Procedure*) aufgestellt. Dieses entwickelte System zur Stabilisierung der Urinproben ist, vergleichbar mit EDTA-Monovetten für das Sammeln von Blutproben, sehr gut für die Einführung in die Routine-Diagnostik geeignet.

Im Rahmen der technischen Analyse wurde außerdem untersucht, inwieweit die Zusammensetzung interner Referenz-mRNAs in Abhängigkeit zur Tageszeit variiert. In der Diagnostik wird häufig Morgenurin verwendet, weil dieser erfahrungsgemäß höher konzentriert ist. Interne Referenz-mRNAs wurden deswegen ausgewählt, weil diese normalerweise in Zellen konstitutiv exprimiert werden, und demzufolge sollte die Ratio an verschiedenen Tageszeiten im Urin unterschiedlicher Spender nicht stark voneinander abweichen. Es konnte aber auf der Basis von zehn Urinproben unterschiedlicher gesunder Spender ein signifikanter Unterschied zwischen der GAPDH/RPLP0 mRNA-Ratio im Morgenurin und dem Mittagsurin festgestellt werden. Der Mittagsurin unterscheidet sich bezüglich der GAPDH/RPLP0 mRNA-Ratio allerdings nicht signifikant vom Abendurin. Demzufolge wurde die Verwendung von spontan im Laufe des Tages abgegebenem Urin favorisiert.

4. Diskussion

Neben der Probengenerierung ist auch das zur RNA-Präparation und –Quantifizierung verwendete System ausschlaggebend für eine robuste und reproduzierbare Tumormarkeranalyse. Unter Verwendung von RNA_{LUC} wurde die RT-qPCR-basierte Detektion von RNA im Gesamturin näher charakterisiert. Es zeigte sich, dass die Ausbeute an RNA_{LUC} bei Gesamturinproben von 21 Spendern zwischen 0,7–47,9% lag (Abschnitt 3.2.1.3.3, Tabelle 3-6). Diese Spender-abhängige Variabilität in der RNA_{LUC}-Ausbeute unterstreicht die Notwendigkeit für das Mitführen der Qualitätskontrolle. Ansonsten würden sich bei einem weniger abundanten mRNA-Tumormarker Sensitivitätsprobleme ergeben. Zu den mRNA-Tumormarkern mit einer geringen Abundanz gehört beispielsweise die hTERT mRNA, von welcher im Durchschnitt in einer typischen kultivierten Krebszelllinie nur wenige Moleküle pro Zelle vorliegen (Prostatakarzinomzelllinie DU145: etwa 4 Kopien pro Zelle [147]).

Aufgrund der festgestellten Varianz in der RT-qPCR-basierten Detektierbarkeit von RNA_{LUC} wurden *Spike*-Experimente durchgeführt, bei denen die Zugabe von RNA_{LUC} an verschiedenen Positionen des Analyse-Protokolls erfolgte. Außerdem wurden in der RT-qPCR serielle Verdünnungen der cDNA eingesetzt. Dadurch sollte geklärt werden, ob Inhibitoren, welche bei der Aufreinigung der Gesamt-RNA aus den Urinproben möglicherweise mitaufgereinigt wurden, die RT-qPCR-basierte Detektion von mRNAs beeinflussen. Zu den PCR-Inhibitoren gehören unter anderem Hämoglobin, Harnstoff, Heparin und Nahrungsbestandteile, welche über den Urin ausgeschieden werden können (organische und phenolische Verbindungen, Ca²⁺), [158]. Darüber hinaus können Reste von Detergenzien aus dem RNA-Präparationsprozess wie beispielsweise GuSCN die Enzymreaktionen inhibieren. Erstaunlicherweise überprüfen nur etwa 6% der Arbeitsgruppen die RNA-Extrakte auf das Vorliegen inhibitorischer Substanzen [159]. Inhibitorische Substanzen können die Intra-Assay-Variabilität der Messung erhöhen oder schlimmstenfalls zu falsch negativen Ergebnissen führen. Zudem wurden in dieser Arbeit für die absolute Quantifizierung der mRNA-Kopienzahl externe Standardkurven verwendet, welche in der qPCR mitgeführt wurden. Diese Standardkurven wurden von einer seriellen Verdünnung eines aufgereinigten PCR-Produktes generiert. Wenn die Kopienzahlen von mRNAs in einer Probe mit inhibierenden Substanzen aber anhand dieser Inhibitor-freien Standardkurve kalkuliert werden, kann die Abundanz der Target-mRNAs als zu niedrig eingeschätzt werden. Anhand der Experimente konnte demonstriert werden, dass die größte Variabilität in der RT-qPCR-basierten Quantifizierung von RNA_{LUC} durch die RNA-Präparation selbst entstand. Die cDNA-Synthese und die qPCR führten nur zu einer geringen Variabilität von einem Faktor 1,6 bzw. 1,4 in der RNA_{LUC}-Ausbeute, wodurch eine starke Inhibierung der Enzymreaktionen ausgeschlossen werden konnte. Einige Faktoren, welche die RNA-Präparation beeinflussen könnten, sind die Länge der zu untersuchenden mRNA, deren Qualität und Sekundärstruktur, die Lokalisation dieser mRNA in der Zelle sowie eine mögliche Komplexierung dieser mRNA mit Proteinen [160]. Ein kritischer Punkt bei der RNA-Präparation war das in dieser Arbeit durchgeführte Lyophilisieren der RNA-Extrakte, da während der zeitaufwendigen Prozedur von bis zu 3 h die Proben zwar gekühlt wurden und eingefroren waren aber trotzdem die Gefahr bestand, dass die RNA durch RNasen degradiert wurde. Dieser Schritt war allerdings notwendig, da durch eine

4. Diskussion

Aufkonzentrierung der RNA-Extrakte auch die Detektion weniger abundanter mRNAs, wie Ki-67 und TC3, ermöglicht wurde. Von einer Ethanol-Fällung zur Aufkonzentrierung der RNA-Extrakte wurde in dieser Arbeit abgesehen, da dieser Schritt aufgrund der geringen Nukleinsäure-Konzentration in einigen Proben nur mit einer sogenannten „Carrier“-RNA als Fäll-Hilfe durchgeführt werden kann, wodurch die Wahrscheinlichkeit für eine Kontamination mit RNasen oder fremden Nukleinsäuren erhöht wird. Außerdem sind die einzelnen Schritte zu arbeitsaufwendig und für eine Routine-Anwendung nicht realisierbar. Es kann daher nicht ausgeschlossen werden, dass die Varianzen in der RNA_{LUC}-Ausbeute zum Teil durch die Aufkonzentrierung entstanden sind. Das gängigste Verfahren zur Normalisierung der Varianzen in der Gesamt-RNA-Ausbeute, ist die Verwendung interner Referenz-RNAs, welche parallel zu der Target-mRNA detektiert werden. Die Verwendung interner Referenz-mRNAs setzt allerdings voraus, dass deren Abundanz in Urinproben verschiedener Spender sorgfältig untersucht wird [161]. Daher wurden neun verschiedene interne Referenz-mRNAs in jeweils neun unterschiedlichen Urinen über RT-qPCR bestimmt. Die Spannweite der Ct-Werte betrug für einige (m)RNAs (18S rRNA, B2M, RP II) mehr als 10 Zyklen, woraus sich Unterschiede in der mRNA-Abundanz von mehr als drei log-Stufen ergeben. Die anschließende Normalisierung des mRNA Tumormarkers uPA über die neun internen Referenz-mRNAs führte zu abweichenden Ergebnissen. Diese Erkenntnis lässt sich auf die heterogene Zell-Zusammensetzung von Urinproben zurückführen. Zudem konnte ein hoher Anteil zellfrei vorliegender GAPDH-, RPLP0- und UBC-mRNA nachgewiesen werden. Aus der Detektion der internen Referenz-mRNAs GAPDH, RPLP0 und UBC in verschiedenen Urinfraktionen ging hervor, dass eine hohe Abundanz der GAPDH- und RPLP0-RNA in der zellfreien Fraktion vorlag. Der Unterschied zwischen den einzelnen mRNAs bezüglich der zellfreien RNA-Menge im Gesamturin war erheblich. Im Gegensatz zu DNA [162,163] wurden in der vorliegenden Arbeit erstmals spezifische zellfreie RNAs im Urin detektiert. Die zellfreie GAPDH RNA nahm bei einigen Spendern sogar den Hauptanteil ein, der durchschnittliche Anteil an zellfreier RNA betrug im Gesamturin 47%. Im Gegensatz zur GAPDH mRNA lag die UBC mRNA im Durchschnitt überwiegend zellgebunden vor ($n = 21$, $UBC\ RNA_{Zellfrei} \times 100\% / \text{Gesamturin} = 17\%$, Abschnitt 3.2.1.3.3, Tabelle 3-6). Im Urin von Harnblasenkarzinompatienten kann ein Teil der zellfreien Nukleinsäuren wahrscheinlich auf einen kontinuierlichen „turnover“ der Tumoren zurückgeführt werden [151], wobei die Freisetzung in den Urin über apoptotische oder nekrotische Prozesse erfolgen kann [164]. Des Weiteren sind Zelltod-unabhängige Prozesse bekannt, welche zu extrazellulärer RNA führen können [165]. Durch die Verpackung in apoptotische Körperchen ist die extrazelluläre RNA vor dem Abbau durch RNasen im Urin geschützt. Apoptotische Körperchen sind Membran-umschlossene Vesikel die im Zuge der Apoptose produziert werden, wobei DNA und RNA scheinbar separat verpackt werden [166]. Zudem wird angenommen, dass die DNA aus den apoptotischen Körperchen möglicherweise aufgenommen und von somatischen Zellen wiederverwendet werden kann [167,168]. Es ist zwar allgemein bekannt, dass im Verlauf der Apoptose RNA degradiert [169,170], aber dadurch, dass in dieser Arbeit Random Hexamer Primer an Stelle von Oligo(dT) Primern für die Synthese von cDNA eingesetzt wurden, konnten auch mRNAs niedriger Integrität und ohne Poly(A)-Schwanz über RT-qPCR detektiert werden.

4. Diskussion

Eine weitere Quelle für zellfreie Nukleinsäuren im Urin sind zirkulierende zellfreie Nukleinsäuren. Bei der Entwicklung einer Nukleinsäure-basierten molekularen Diagnostik auf der Grundlage von Gesamturin muss daher berücksichtigt werden, dass neben Harnblasenkarzinomen auch andere urologische Karzinome und durch renal filtrierte, zellfreie Nukleinsäuren noch weitere Tumorentitäten diagnostiziert werden können [151]. Bei Patienten mit einem Nierenzellkarzinom konnten die im Tumor vorliegenden Alterationen von Mikrosatelliten auch im Urin und im Serum nachgewiesen werden. [171]. Außerdem konnte Tumor-assoziierte DNA im Urin, Plasma und Serum von Patienten mit einem Prostatakarzinom [172,173] nachgewiesen werden. Bei Patienten mit einem Harnblasenkarzinom wurde tumor-spezifische DNA sowohl im Urin aber auch im Plasma und Serum detektiert [174]. Giacomini *et al.* gehen davon aus, dass Nukleinsäuren durch die Apoptose von Lymphozyten oder anderen kernhaltigen Zellen in das Plasma von Tumorpatienten aber auch gesunden Spendern freigesetzt werden. Darauf ließen die Fragmentgrößen extrahierter DNA schließen, welche der Größe von Nukleosomen (185-200 bp) oder einem Vielfachen davon (1–5x) entsprachen [175]. Im apoptotischen Körperchen ist die zellfreie RNA vor dem Abbau durch RNasen im Serum geschützt [176] bzw. ist zellfreie RNA im Plasma vermutlich Partikel-assoziiert, wodurch diese ebenfalls vor dem Abbau durch RNasen geschützt wird [177]. Die zirkulierenden, tumorspezifischen Nukleinsäuren aus dem Blut gelangen vermutlich über die Niere in den Urin und können dort detektiert werden [178]. Es konnte gezeigt werden, dass im Urin neben der hochmolekularen, zellgebundenen DNA von mehr als 1 kb auch niedermolekulare Fragmente vorliegen, welche größtenteils nicht zellgebunden sind und eine Größe zwischen 150 und 250 bp aufweisen [179]. Su *et al.* zeigten, dass die kurzen DNA Fragmente zum Teil zirkulierend in den Urin gelangten, indem eine gut-charakterisierte Mutation im 12. Codon des *K-ras* Proto-Onkogens im Urin von Patienten mit einem Kolonkarzinom oder mit einem adenomatösen Polyp nachgewiesen wurde. Dabei waren die mutierten *K-ras* Sequenzen sehr abundant in der Fraktion kurzer DNA-Fragmente aber wesentlich weniger abundant in der hochmolekularen DNA-Fraktion. Die Übereinstimmung zwischen der Detektierbarkeit einer *K-ras* Mutation im Urin und dem entsprechenden Tumorgewebe war mit 83% erstaunlich hoch. Allerdings wurde zum einen nur eine kleine Population von 18 Patienten untersucht, zum anderen war die *K-ras* Mutation auch in 19% der Urinproben von gesunden Spendern nachweisbar.

Die Anwesenheit von zellfreier RNA neben zellgebundener mRNA im Urin zeigt, dass mittels cDNA-Microarrays gewonnene Erkenntnisse über tumorrelevante mRNAs im Tumorgewebe nicht ohne weiteres auf Gesamturin übertragen werden können. Die hohe Menge an zellfreier GAPDH RNA in einigen Urinproben (Abschnitt 3.2.1.3.3, Tabelle 3-6) war vermutlich für die schlechte diagnostische Aussagekraft des Zell-basierten mRNA-Tumormarkers uPA nach Normalisierung über GAPDH verantwortlich ($AUC_{uPA/GAPDH} = 0,359$; Abb. 3-24 B). Infolgedessen war die Verwendung des externen RNA Standards am besten geeignet, um die Varianzen in der RNA-Ausbeute zwischen verschiedenen Urinproben zu normalisieren. RNA_{LUC} wurde bei jeder Analyse als Qualitätskontrolle mitgeführt, wodurch der gesamte Analyse-Prozess überwacht werden konnte. Für einen klinischen Test ist es absolut notwendig, dass die Variabilität innerhalb der Methode

minimal gehalten und die Reproduzierbarkeit erhöht wird. Durch RNA_{LUC} konnte die Inter-Assay Variabilität (RNA-Präparation in Duplikaten, qPCR in Triplikaten) für die Detektion der GAPDH, RPLP0 und UBC mRNA reduziert werden. In einem Set aus zehn verschiedenen Urinen wurde der CV im Durchschnitt von 16,6% auf 8,61%, folglich um etwa die Hälfte reduziert (Abschnitt 3.2.1.3.1), wodurch die Detektion verschiedener mRNAs über RT-qPCR sehr robust war. Der Einsatz von kommerziell hergestellten RNA-Standards, sogenannten „*internal amplification controls*“ (IAC), welche wie RNA_{LUC} vor der RNA-Präparation zur Probe gegeben werden können, hat sich bereits als Qualitätskontrolle bewährt [180]. Bei diesen Standards wird die labile RNA in Bakteriophagen-Partikel („Armored RNA® Technologie“) verpackt, welche die RNA vor dem Abbau durch RNasen schützen. Im Verlauf der RNA-Präparation wird die RNA aus den Phagen-Proteinen freigesetzt und ist dann im cDNA-Synthese Schritt zugänglich für die Reverse Transkriptase.

Das in dieser Arbeit entwickelte robuste System zur mRNA-Präparation und – Quantifizierung wurde anschließend angewendet, um nach potentiellen mRNA-Tumormarkern zu suchen. In der vorliegenden Arbeit wurde für die Identifizierung tumorrelevanter mRNAs ein qPCR-basierter Array anstelle eines Microarrays durchgeführt. Gegenüber Microarrays haben RT-qPCR-Arrays den Vorteil, dass die Qualität der Daten sowie die Sensitivität höher ist. Ein weiterer Punkt sind die geringeren Kosten bei einem RT-qPCR-Array, somit konnte das Experiment mit einer größeren Anzahl von Proben durchgeführt werden. Außerdem musste für die nachfolgende Untersuchung identifizierter Tumormarker das Detektionssystem nicht mehr gewechselt werden. Anhand des RT-qPCR-Arrays wurde in Urinproben eines „Trainings“-Sets an Tumorpatienten mit einem G1-Tumor eine erhöhte Abundanz der ETS2, uPA, CC3, BAX und BCL2L1 mRNA gefunden. Dabei war vor allem die relative Abundanz der ETS2 mRNA im Urin der vier untersuchten Harnblasenkarzinompatienten im Durchschnitt 18-fach gegenüber Urinproben von gesunden Spendern erhöht. Für den Array wurden ausschließlich Patienten mit einem G1-Harnblasenkarzinom untersucht, da diese Gruppe von Harnblasenkarzinompatienten über die bisher publizierten RNA-Tumormarker nur mit geringen Sensitivitäten detektiert werden. Die Detektion dieser Tumorguppe ist aber auch über Standardverfahren der nicht-invasiven Diagnostik (Urinzytologie) sehr unsensitiv mit einer hohen falsch-negativ Rate (etwa 40%).

4.1.3 Phase 2 der Tumormarker-Entwicklung: klinische Relevanz identifizierter potentieller Tumormarker

Wie bei jedem diagnostischen Verfahren erfolgt die Bewertung neuer RNA-Tumormarker anhand der erzielten Sensitivität und Spezifität, das heißt, der Prozentsatz an Patientenproben, welche als richtig-positiv diagnostiziert wurden bzw. der Prozentsatz an Proben, welche als richtig-negativ erkannt wurden. Als weiteres Kriterium für die Güte eines diagnostischen Tests ist die Robustheit der verwendeten Technologie.

4. Diskussion

Die klinische Relevanz der über den Array identifizierten potentiellen mRNA-Tumormarker wurde anhand von Urinproben einer größeren „Test“-Population an gesunden Spendern und Patienten mit einem Harnblasenkarzinom über RT-qPCR untersucht. Dadurch wurde die 2. Phase in der Entwicklung eines neuen Tumormarkers eingeleitet. Aus der Analyse ergab sich eine äußerst sensitive (75,4%) und hoch-spezifische Trennung (100%) der 61 Harnblasenkarzinompatienten von den 37 gesunden Spendern über die mRNA-Ratio ETS2/uPA (AUC = 0,929; 95% Konfidenzintervall, 0,640–0,842, Abschnitt 3.2.3.1, Tabelle 3-9). Der Median der Ratio lag bei den untersuchten Tumorpatienten bei 1,44. Im Urin von gesunden Spendern lag im Verhältnis eine höhere Abundanz der uPA mRNA im Vergleich zur ETS2 mRNA vor ($\text{Median}_{\text{ETS2/uPA}} = 0,40$). Mit einem Inter-Spender Variationskoeffizienten von 45,81% war diese Ratio in den Urinproben der 37 gesunden Spender erstaunlich konstant. Durch diese relativ geringe Variation war die Positionierung des Schwellenwertes von 0,96 äußerst spezifisch, wodurch die Interpretation der Testergebnisse einfach und eindeutig war. Dies ist ein wichtiges Kriterium für die Güte eines neu-identifizierten Tumormarkers.

Neben der Sensitivität und Spezifität wird die Relevanz eines neuen Tumormarkers auch anhand der Präzision der Messung bewertet. Die Detektion der ETS2 und uPA mRNA in den untersuchten Urinen (Σ , n = 97; gesunde Spender, n = 37; Harnblasenkarzinompatienten, n = 61) war robust. Für die ETS2 mRNA betrug der mittlere Intra-Assay Variationskoeffizient der RT-qPCR 10,4%, für die uPA mRNA lag der CV bei 11,0%.

Die Tatsache, dass die Ratio aus der ETS2 und uPA mRNA die höchste diagnostische Aussagekraft der getesteten mRNA-Tumormarker aufwies war interessant, da ETS2 ein Transkriptionsfaktor ist und die Transkription des *uPA* Gens reguliert [133,181]. Die evolutionär konservierte Familie der ETS-Transkriptionsfaktoren [182] können ihre Target-Gene durch das Binden an die Konsensus-DNA-Sequenz „GGAA/T“ positiv oder negativ regulieren. Die ETS-Target Gene sind in verschiedene biologische Prozesse wie Zellproliferation, Hämatopoese, Apoptose, Differenzierung, Angiogenese sowie Transformation involviert [zusammengefasst in 183]. Watabe *et al.* zeigten durch die Stimulation einer Brustkarzinomzelllinie mit dem epidermalen Wachstumsfaktor (EGF) eine Aktivierung von ETS1 und ETS2, welche die Transkription des *uPA* Gens aktivierten. Dadurch wurde die Invasivität der untersuchten schwach-invasiven Zelllinie verstärkt [133]. Über die Aktivierung von RTKs und der sich anschließenden Ras/Raf/Mek/Erk-Kinase-Signaltransduktionskaskade wird ETS2 phosphoryliert und somit aktiviert [184]. Bei der Entstehung von oberflächlichen Harnblasenkarzinomen kommt es zu einer abnormalen Aktivierung des Rezeptor-Tyrosin-Kinase-(RTK)-Ras-Signalwegs [25], was zum einen auf eine Mutation im HRAS Gen zurückgeführt werden kann [21]. Mutationen im HRAS Gen liegen in 30–40% der oberflächlichen Harnblasenkarzinome vor (Siehe Abb. 1-2, Einleitung). Zum anderen kommt es durch eine Mutation in dem Fibroblasten-Wachstumsfaktor-Rezeptor 3 (FGFR3), einer RTK, zur Aktivierung der Ras/Raf/Mek/Erk-Kinase-Signaltransduktionskaskade [22,185]. Mutationen im FGFR3 sind bei nicht-invasiven Harnblasenkarzinomen sehr häufig (60–70%, siehe Abb. 1-2). Bei invasiven Harnblasenkarzinomen kann es ebenfalls, beispielsweise durch die Überexpression von

ERBB2, einer RTK der EGFR-Familie, zur Aktivierung des RTK-Ras-Signalweges kommen [186]. Eine weitere Aktivierung von ETS2 kann im Zuge des PI3K/Akt-Signalwegs erfolgen [187]. Dadurch könnten die erhöhten ETS2 mRNA-Abundanzen im Urin von Harnblasenkarzinompatienten erklärt werden.

Durch eine Studie von Buggy *et al.* wurde gezeigt, dass eine erhöhte Proteinexpression von ETS2 in Brustkrebskarzinomen mit der Proteinexpression von uPA korrelierte und mit der Tumorprogression sowie Metastasierung assoziiert war [188]. Die elementare Rolle von uPA bei der Invasion von Tumorzellen wurde bereits ausführlich im Kapitel 1.4 beschrieben. Für Harnblasenkarzinome konnte gezeigt werden, dass die Expression von uPA mit dem Tumorstadium korreliert und Tumoren mit einer niedrigen Expression von uPA weniger progressiv sind [189]. Aufgrund dessen wird das Protein [z.B. 39] sowie die mRNA von uPA [z.B. 190] als geeigneter Tumormarker für die Diagnostik von Harnblasenkarzinomen beschrieben. Wie bereits am Anfang des Kapitels 4.1.1 erwähnt, ist die Interpretation der erhöhten ETS2/uPA mRNA-Ratio im Urin von Harnblasenkarzinompatienten aufgrund der heterogenen Zusammensetzung des Urins sehr komplex.

Die Abundanzen der ETS2 und uPA mRNA waren in den in dieser Arbeit untersuchten Urinen von 37 gesunden Spendern und 61 Harnblasenkarzinompatienten ausreichend hoch ($\text{Median}_{\text{ETS2}} = 4,64 \times 10^5$ Kopien pro ml; $\text{Median}_{\text{uPA}} = 4,84 \times 10^5$ Kopien pro ml, normalisiert auf RNA_{LUC}). Zudem konnten diese mRNAs in allen untersuchten Urinproben detektiert werden. Eine ausreichende Abundanz der untersuchten uringebundenen Tumormarker ist in Anbetracht der Spender-abhängigen Varianz in der RNA-Ausbeute notwendig. Durch die hohe Abundanz der detektierten Marker wird vermieden, dass Patienten bei der Analyse aufgrund erreichter Nachweisgrenzen ausgeschlossen werden müssen. Im Gegensatz dazu wurde anhand einer Studie von Weikert *et al.* gezeigt, dass der Nachweis der hTERT mRNA im Urinsediment oftmals nicht oder nur nahe des Detektionslimits möglich war [191]. Dadurch war die Sensitivität in dieser Studie mit 55% sehr gering. Neben einer niedrigen Konzentration präparierter RNA kann die Tatsache, dass Tumorzellen im Urin häufig hinter einem verhältnismäßig hohen Hintergrund an nicht-entarteten sowie entzündlichen Zellen vorliegen vermutlich auch zu der geringen Sensitivität uringebundener hTERT mRNA führen.

Mit der mRNA-Tumormarker-Ratio ETS2/uPA wurden G2- und G3-Tumoren mit einer höheren Sensitivität detektiert (81%; Spezifität = 100%, Tabelle 3-9). Wurden die G3-Tumoren separat betrachtet, ergab sich sogar eine Sensitivität von 89%, für G2-Tumoren lag die Sensitivität bei 73%. Eine sensitivere Detektion von Harnblasenkarzinomen mit einem niedrigen Differenzierungsgrad (G3-Tumoren) wird in der Regel auch bei den meisten bisher in der Literatur beschriebenen mRNA-Tumormarkern festgestellt [192,193,194]. So ergab sich auch in dieser Studie für Detektion der G1-Tumoren eine geringe Sensitivität von 54% über die ETS2/uPA mRNA-Ratio. In einer zusammenfassenden Arbeit von Lokeshwar *et al.* [195] werden die in acht unterschiedlichen Arbeitsgruppen erhobenen Daten zur Sensitivität sowie Spezifität der Urinzytologie für die einzelnen Tumorgade des Harnblasenkarzinoms aufgeführt. Die daraus resultierende, gemittelte Sensitivität der Zytologie für G1- bis G3-Tumoren betrug

4. Diskussion

58% (Spannweite: 26–85%) mit einer durchschnittlichen Spezifität von 86% (71–100%). Demzufolge ist der in dieser Arbeit entwickelte Test deutlich sensitiver und spezifischer als die Urinzytologie. Die höhere diagnostische Aussagekraft der ETS2/uPA mRNA-Ratio wird vor allem bei einem Vergleich der mittleren separaten Sensitivitäten der Urinzytologie für G1-Tumoren, G2-Tumoren und G3-Tumoren mit 33% (4–75%), 61% (41–80%) bzw. 70% (41–90%) deutlich. Infolgedessen wird über die Urinzytologie nur bei drei von zehn Patienten ein vorliegender G1-Tumor erkannt, über die ETS2/uPA mRNA-Ratio sind dies immerhin schon fünf von zehn Patienten. Die über die ETS2/uPA mRNA-Ratio erzielte Sensitivität von 54% für G1-Tumoren ist zwar selbstverständlich nicht befriedigend, ist aber wie auch für G2- und G3-Tumoren der Urinzytologie überlegen.

Die Mehrheit der publizierten diagnostischen mRNA-Tumormarker für das Harnblasenkarzinom wurden auf der Grundlage von Urinsediment etabliert, wobei Spontanurin oder Blasenspülungen verwendet werden. Ein bereits sehr gut untersuchter mRNA-Tumormarker für die Detektion von Harnblasenkarzinomen ist die mRNA der humanen Telomerase Reversen Transkriptase (hTERT). Die hTERT mRNA ist deswegen so attraktiv, weil die Menge der mRNA mit der Telomerase Aktivität korreliert. Während in den meisten somatischen Zellen die Telomerase nicht aktiv ist, konnte in 85% der humanen Tumore eine Telomerase-Aktivität nachgewiesen werden [196]. In einer prospektiven Studie von Weikert *et al.* (2005 b) wurde die Eignung von Urinsedimenten für einen sensitiven und spezifischen RT-qPCR-basierten Test demonstriert. Der in dieser Studie dargestellte Vergleich der Sensitivität von Urinzytologie (35%) mit derjenigen der untersuchten mRNA-Tumormarker fiel in dieser Studie ebenfalls eindeutig zugunsten der mRNA-Tumormarker hTR und hTERT aus (Sensitivität: 77% bzw. 55%) [191]. Die Spezifität war für die hTR und hTERT mRNA mit 72% bzw. 85% aber geringer als für die Urinzytologie (93%). Die hTR mRNA weist wie die ETS2/uPA mRNA eine erstaunlich gute Sensitivität auf. Die Spezifität liegt jedoch bei nur 72%. Wenn entzündliche Urine mit Leukozyten nicht in die Kontroll-Gruppe miteinbezogen wurden, konnte die Spezifität aber immerhin auf 85% verbessert werden. Ein weiterer kritischer Punkt ist die Tatsache, dass das *hTR* Gen Intron-frei ist und somit kein RT-qPCR-Amplikon entworfen werden kann, was die Amplifikation von genomischer DNA ausschließt. Demzufolge muss nicht nur bei dem Aufbau des RT-qPCR-basierten diagnostischen Tests (Phase 1 und 2) eine non-RT Kontrolle mitgeführt werden, sondern auch in allen weiteren Phasen der Tumormarker-Entwicklung. Für hTERT zeigte sich, wie oben bereits aufgeführt, dass die ungenügende Sensitivität von 55% auf die geringe Abundanz der hTERT mRNA zurückzuführen war. Aufgrund der fehlenden Robustheit bezüglich der RT-qPCR-basierten Detektion ist die hTERT mRNA somit nicht für eine Diagnostik auf der Grundlage von Urinsediment geeignet. Hohe falsch-positiv Raten und zu geringe Sensitivitäten aufgrund zu geringer hTERT mRNA Abundanzen im Urinsediment wurden auch in weiteren Studien zur nicht-invasiven Detektion von Harnblasenkarzinomen berichtet [197,198,199]. In wiederum anderen Studien zum Nachweis der hTERT mRNA im Urinsediment wurden höhere Sensitivitäten und Spezifitäten beschrieben [200,201,202].

Neben der hTERT mRNA zählt die Survivin mRNA aufgrund der hohen Spezifität zu den vielversprechenden mRNA-Tumormarkern für die nicht-invasive Detektion von

4. Diskussion

Harnblasenkarzinomen [203]. In ausdifferenzierten Zellen ist keine Survivin Expression nachweisbar, Tumorzellen hingegen weisen eine starke Expression auf [204]. Zudem konnte gezeigt werden, dass eine hohe Expression der Survivin mRNA oder des Proteins mit einem aggressiven Verhalten von Tumorzellen korreliert ist, und in unterschiedlichen Tumorentitäten korrelierte eine erhöhte Survivin Abundanz mit einem frühen Wiederauftreten der Erkrankung und kurzen Überlebensraten der Patienten [205]. Die in der Tabelle 1-1 angegebenen Sensitivitäten und Spezifitäten für uringebundene Survivin mRNA von 68–100% bzw. 100% gehen aus zwei Studien hervor, wobei die in der Studie von Weikert *et al.* (2005 a) erreichte Sensitivität von 68,6% geringer ist als die der ETS2/uPA mRNA-Ratio [194]. Zudem machten die im Allgemeinen deutlich schlechter detektierbaren G1-Harnblasenkarzinome nur etwa 4% der untersuchten Tumorklassen in dieser Studie aus. In der vorliegenden Arbeit betrug der Anteil der untersuchten G1-Tumoren hingegen 21%. Wie bei der hTERT mRNA war die Abundanz der Survivin mRNA in einigen Urinproben an der Grenze oder unter dem Detektionslimit. Sensitivitätsprobleme wie im Fall der hTERT und Survivin mRNA ließen sich zwar durch die Erhöhung des eingesetzten Urinvolumens etwas minimieren, allerdings steigt in diesem Fall auch die Wahrscheinlichkeit für die Aufkonzentrierung inhibitorischer Substanzen im Urin, zumal das in den Studien eingesetzte Volumen von 50 ml ohnehin schon sehr groß war. Auch die Verwendung einer *nested*-PCR, welche für eine Anreicherung der Target-mRNA eingesetzt werden könnte, ist aufgrund des Kosten- und Zeitaufwands für eine Diagnostik ungeeignet, abgesehen von der höheren Wahrscheinlichkeit für das Einbringen von Kontaminationen. Durch die *nested*-PCR konnten Smith *et al.* beispielsweise eine Sensitivität von 100% erreichen [206]. Auch bei der Verwendung von Urinsediment erwies sich der Nachweis der Survivin mRNA aufgrund der geringen Abundanz als problematisch, in einer Studie von Schulz *et al.* wurde lediglich eine Sensitivität von 50% erreicht [207]. Für den mRNA-Tumormarker Survivin kann zusammengefasst werden, dass die erreichten Sensitivitäten und vor allem Spezifitäten teilweise zwar sehr vielversprechend sind, aber die Survivin mRNA vor allem aufgrund der geringen Abundanz im Urinsediment für eine robuste, sensitive und nicht-invasive Tumordiagnostik jedoch eher ungeeignet erscheint.

In initialen Berichten über neue mRNA-Tumormarker waren die Sensitivitäten und Spezifitäten vieler Tumormarker höher als in den Folgestudien. Diese Feststellung ist zum Teil auf die Tatsache zurückzuführen, dass nur gesunde Spender in der Kontrollgruppe untersucht wurden und Patienten mit anderen urologischen Erkrankungen wie Harnwegsinfekten, Urozystitis (Entzündung der Blasenschleimhaut), Steinen oder Prostatavergrößerungen nicht in die Kontrollgruppe miteinbezogen wurden. Daher wurde in der vorliegenden Arbeit zusätzlich eine Gruppe von Patienten mit einer Harnwegsinfektion untersucht. Die mediane ETS2/uPA mRNA-Ratio im Urin von Infektionspatienten war etwa doppelt so hoch wie bei den Harnblasenkarzinompatienten. Hierdurch sank die Spezifität von 100% auf 75%, wodurch die identifizierte ETS2/uPA mRNA-Ratio im Gegensatz zu Survivin und hTERT nicht malignitätsspezifisch ist. Die Tatsache, dass auch benigne Erkrankungen der Blase über die ETS2/uPA mRNA-Ratio detektiert werden, beeinflusst die diagnostische Aussagekraft des Tests aber keineswegs. Die Patienten mit einer Harnwegsinfektion, welche ebenfalls eine erhöhte ETS2/uPA mRNA-Ratio zeigten und

4. Diskussion

somit zu falsch-positiven Ergebnissen führten, konnten über die ETS2/OP18 mRNA-Ratio erkannt werden. Bei diesen Patienten muss die Harnwegsinfektion erst behandelt werden, bevor eine Diagnostik durchgeführt werden kann.

Für andere diagnostische Tests wie der Nachweis des Nukleären Matrix Proteins 22 (NMP 22), welcher bereits von der FDA zugelassen ist und für die Diagnose von Harnblasenkarzinomen eingesetzt werden kann, gehen aus den verschiedenen Studien sehr unterschiedliche Spezifitäten von 56–95% (Tabelle 1-1) hervor. Bei der Induktion von Apoptose wird NMP 22 vom Zellkern der entsprechenden Urothelzelle freigesetzt. Im Urin von Harnblasenkarzinompatienten liegt eine höhere Abundanz des NMP 22 Proteins vor. Allerdings wird das Protein selbstverständlich auch von toten und sterbenden nicht-entarteten Urothelzellen und in Folge verschiedener benignen Erkrankungen des Urogenitaltraktes, wie Steinen, Infektionen, Entzündungen sowie beim Vorliegen eines Katheders oder nach einer Zystoskopie verstärkt freigesetzt [zusammengefasst in 208]. Andere Tumorentitäten wie Nierenkarzinome und Prostatakarzinome führen außerdem zu einer erhöhten Abundanz von NMP 22 im Urin. Auch die zugelassenen Immunoassays zum quantitativen Nachweis des humanen Komplement-Faktor H assoziierten Proteins, BTA stat- und BTA TRAK-Test, weisen große Unterschiede in den erreichten Spezifitäten auf (54–93% bzw. 51–95%, Tabelle 1-1). Hohe falsch-positiv Raten wurden bei den Tests generiert, wenn nicht nur eine Kontrollgruppe gesunder Spender, sondern auch Patienten mit einem Trauma, Steinleiden, Harnwegsinfekt, einer Entzündung oder anderen urologischen Tumoren untersucht wurden [209,210]. Für diese aufgezählten kommerziellen Tests und für die ETS2/uPA mRNA-Ratio ergibt sich daraus, dass die aufgezählten Patientengruppen zuvor ausgeschlossen und getrennt untersucht werden müssen.

Die in dieser Arbeit beschriebene RNA-Tumormarker Ratio ETS2/uPA ist im Vergleich zu anderen RT-qPCR-basierten Tests zur Diagnostik des Harnblasenkarzinoms sehr vielversprechend. Durch die Verwendung einer Ratio kann auf eine Normalisierung über interne Referenz-mRNAs verzichtet werden. Außerdem ist es möglich, eine relative Quantifizierung durchzuführen, wodurch schließlich die Mitführung einer Standardkurve zur Bestimmung der absoluten mRNA Kopienzahl entfällt. Dadurch können Aufwand und Kosten des Tests weiter gesenkt werden.

Ein Tumormarker kann nicht nur für die Primärdiagnose, sondern auch für die Nachuntersuchungen eingesetzt werden. Hierdurch können Rezidive noch vor der klinischen Sicherung angezeigt werden. Die Notwendigkeit für eine aufwendige Nachsorge von Harnblasenkarzinompatienten ergibt sich aus der hohen Rezidivrate dieser Tumoren von 50 bis 80%, wobei beispielsweise 15% der oberflächlichen Tumoren dann als aggressive *high grade* Tumoren auftreten [211]. Die Vorteile für die Verwendung eines Urin-assoziierten-Tumormarkers in der Nachsorge ist vor allem die Verringerung der invasiven Eingriffe (Zystoskopie ± Biopsie), die neben der Schonung des Patienten auch eine erhebliche Reduktion der anfallenden Untersuchungskosten bedeuten [212]. Die Standard-Nachsorge beinhaltet eine Zystoskopie sowie eine Urinzytologie, welche im ersten Jahr nach der Tumorentfernung in Abständen von 3 Monaten durchgeführt werden. In den darauffolgenden Jahren werden die Untersuchungen in Abständen von 6 Monaten durchgeführt.

4. Diskussion

Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurde eine mRNA-Tumormarker-Analyse im Urin von neun Tumorpatienten zusätzlich zur regulären Zystoskopie und Zytologie durchgeführt. Die Patienten wurden zweimal im Zeitraum der Studie untersucht. In den Urinproben wurde die ETS2/uPA mRNA-Ratio „blind“ nach dem Standardverfahren ermittelt und anschließend mit den Ergebnissen der Urinzytologie verglichen.

Von den achtzehn untersuchten Urinproben waren zehn zytologisch unauffällig. Neun dieser Urinproben wiesen eine geringe ETS2/uPA mRNA-Ratio auf und wurden ebenfalls als unauffällig deklariert. Bei einer Patientin mit dem klinischen Verdacht auf ein Rezidiv war der Urinzytologie-Befund unauffällig, jedoch war die Urin-assoziierte ETS2/uPA mRNA-Ratio deutlich erhöht. Anhand der Zystoskopie und einer Gewebeprobe wurde schließlich ein Harnblasenkarzinomrezidiv nachgewiesen. Nach der Entfernung des Tumors wurde die ETS2/uPA mRNA-Ratio erneut im Urin dieser Patientin bestimmt. Hier war der Urin zytologisch unauffällig und die ETS2/uPA mRNA-Ratio lag unter dem Schwellenwert.

Eine der untersuchten Urinproben wies laut Urinzytologie keine Zellatypien aber eine Mikrohämaturie sowie eine floride Blasenschleimhautentzündung auf. In diesem Fall lag die ETS2/uPA mRNA-Ratio minimal über dem Schwellenwert. Anhand der durchgeführten Zystoskopie konnte kein Harnblasenkarzinom diagnostiziert werden. Es ist vorstellbar, dass die erhöhte ETS2/uPA mRNA-Ratio auf die noch nicht abgeschlossene Regenerationsphase des Epithels nach der nur 3 Monate zuvor im Rahmen der Therapie durchgeführten intravesikalen Instillation von *bacillus Calmette-Guérin* (BCG) zurückgeführt werden kann. Im Rahmen dieser Therapie kommt es zu einer Ablösung und anschließenden Neubildung der oberen Urothelschichten. Inwieweit die BCG-Therapie einen Einfluss auf die ETS2/uPA mRNA-Ratio hat, muss noch untersucht werden.

In sieben der achtzehn Urinproben wurden zytologisch Zellatypien nachgewiesen. In diesen Proben war die ETS2/uPA mRNA-Ratio erhöht. Bei einem der Spender wurde ein Harnblasenkarzinom erstdiagnostiziert. Bei den anderen Patienten konnte zystoskopisch kein Harnblasenkarzinom diagnostiziert werden. Hier könnten ebenfalls die durchgeführten BCG-Therapien Ursache für die zytologisch detektierten Zellatypien sowie für die erhöhte ETS2/uPA mRNA-Ratio sein. Diese Beobachtung deutet an, dass die Beurteilung der RNA-Tumormarker-Analyse im Urin von BCG-behandelten Patienten, analog zur Urinzytologie, schwierig ist.

Es kann zusammengefasst werden, dass die ersten Ergebnisse zur Untersuchung der ETS2/uPA mRNA-Ratio im Urin von Tumornachsorge-Patienten vielversprechend sind. Die mRNA-Ratio scheint bei dem Aufspüren von Rezidiven sensitiver zu sein als das nicht-invasive Standardverfahren, die Urinzytologie. Allerdings ist dies natürlich bei der kleinen Fallzahl nur eine sehr vage Vermutung. Demnach wäre es notwendig, weitere Untersuchungen hinsichtlich der Eignung der ETS2/uPA mRNA-Ratio zur Nachsorge von Harnblasenkarzinompatienten durchzuführen.

4.1.4 MicroRNA-basierte Identifizierung von Harnblasenkarzinomen

Wie bereits im Abschnitt 4.1.1 erwähnt, ist die Suche nach tumorrelevanten miRNAs für den Aufbau einer nicht-invasiven Tumordiagnostik sehr vielversprechend. Um miRNA-Kandidaten zu finden, welche möglicherweise für die nicht-invasive Diagnostik von Harnblasenkarzinomen geeignet sind, wurde die miRNA-Zusammensetzung im Urin unter Verwendung eines kommerziellen RT-qPCR-Arrays untersucht. Das Array-Experiment zeigte eine erhöhte Abundanz der miR-126, miR-182 und miR-199a in den vereinten Urinproben von Harnblasenkarzinompatienten gegenüber gesunden Spendern und Patienten mit Harnwegsinfektionen an. Die Abundanz dieser miRNAs war nicht nur in der Gruppe der G2-/G3-Harnblasenkarzinompatienten erhöht, sondern auch im Urin von G1-Tumorpatienten. Das Array-Experiment bestätigte somit die angenommene Hypothese, dass nicht nur mRNAs im Urin nachweisbar sind, sondern auch miRNAs im Gesamturin vorliegen. Ferner deutete das Experiment auf eine differentielle Zusammensetzung von Urin-assoziierten miRNAs in den verschiedenen untersuchten Patientengruppen hin. Es zeigte sich ferner, dass weitere, von Volinia *et al.* bereits als tumorrelevant beschriebene, miRNAs wie miR-21, miR-17-5p, miR-191, miR-199a und miR-146 im Urin von Harnblasenkarzinompatienten ebenfalls abundant vorlagen [60]. Aus der anschließenden Detektion ausgewählter miRNAs in einzelnen Urinproben von gesunden Spendern, Patienten mit einer Harnwegsinfektion sowie Patienten mit einem Harnblasenkarzinom ergaben sich zwei interessante miRNA-Ratios. miR-126 und miR-182 *versus* miR-152. Diese beiden Ratios waren im Gesamturin von Harnblasenkarzinompatienten gegenüber gesunden Spendern signifikant erhöht ($p = 0,01$ bzw. $p = 0,004$).

Im Vergleich zu der identifizierten mRNA-Ratio ETS2/uPA war die diagnostische Aussagekraft dieser miRNA-Ratios jedoch schwächer. Für die miR-126/miR-152 miRNA-Ratio wurde eine Spezifität von 82% und eine Sensitivität von 72% für die Detektion von Harnblasenkarzinomen erreicht. Allerdings war die miR-182/miR-152 miRNA-Ratio bei den Urinen von Harnblasenkarzinomen nicht nur im Vergleich zu den Kontroll-Urinen, sondern auch zu den Urinen von Harnwegsinfektionspatienten erhöht. Trotzdem wird bei einem Vergleich mit dem mRNA-Tumormarker ETS2/uPA deutlich, dass die identifizierten miRNAs nicht so gut für den Aufbau eines diagnostischen Tests geeignet sind. Dennoch ist vor allem die sehr signifikante Erhöhung der miR-182/miR-152 Ratio eine interessante Beobachtung. Die miR-182 hat eine Vielzahl an (potentiellen) Target-mRNAs. Laut dem Online-Programm „Target Scan-Prediction of microRNA targets“ (Release 4.0, 2007; [213]) weist auch die ETS2 mRNA in dem 3'-UTR-Bereich einen konservierten Sequenzbereich für die *seed*-Sequenz („UUGCAA“) dieser miRNA auf. Die ETS2 mRNA ist daher nach diesen *in silico*-Vorhersagen ein potentielles Target der miR-182. Da in der Studie von Volinia *et al.* 75% der *in silico* vorhergesagten Interaktionen zwischen der speziellen miRNA und der angegebenen Target-mRNA bestätigt wurden [60], besteht möglicherweise ein Zusammenhang zwischen der miR-182 und ETS2 mRNA. Dieser Zusammenhang könnte möglicherweise bei der Tumorigenese von Harnblasenkarzinomen relevant sein.

4.2 Konsequenzen aus dieser Arbeit für Behandlungsstrategien beim Harnblasenkarzinom

Nach der Behandlung eines erstdiagnostizierten Harnblasenkarzinoms tritt innerhalb von 5 Jahren in mehr als der Hälfte der Fälle ein Rezidiv auf. Das Rezidivrisiko steigt beim Vorliegen von invasiven Tumoren ($\geq T1$), multiplen Tumoren, einem großen Tumordurchmesser, einer zunehmenden Entdifferenzierung und einem begleitenden Carcinoma *in situ* [214]. Infolgedessen sind eine regelmäßige, lebenslange Kontrolle mittels Zystoskopie sowie prophylaktische Behandlungen erforderlich. Es liegt nahe, dass die hohen Rezidivraten möglicherweise auf eine Limitierung der Behandlungsoptionen von Harnblasenkarzinomen zurückgeführt werden können. Die Strategien zur Behandlung eines Harnblasenkarzinoms werden in der Tabelle 4-1 aufgeführt. Etwa 80% der Harnblasenkarzinome sind oberflächlich (Ta-, Cis-Tumoren) und werden durch transurethrale Resektion (TUR) behandelt, bei invasiven pT1- und G3-Tumoren besteht gegebenenfalls die Indikation zur radikaleren Nachresektion. Daher werden oberflächliche G3-Harnblasenkarzinome nach der TUR immuntherapeutisch mit *Bacillus Calmette-Guérin* (BCG) und/oder Chemotherapeutika wie beispielsweise Mitomycin C (MMC) intravesikal behandelt. Durch die intravesikale Therapie kann es sogar nach unvollständiger TUR bei einem Drittel bis einer Hälfte der Patienten zur kompletten Regression kommen. Bei G3, T1-Patienten ist die Tumorprogressionsrate hoch (40–50%, Abbildung 1-2) und 36% der Patienten sterben innerhalb von 5 Jahren an der Erkrankung [215]. Invasive Harnblasenkarzinome (T2-, T3-, T4-Tumoren) werden durch radikale Zystektomie mit pelviner Lymphadenektomie behandelt. Zusätzlich wird der Patient bestrahlt oder mit Zytostatika behandelt. Da eine Chemotherapie eine extreme Belastung für den Patienten darstellt, würde man eine derartige Therapie nur dann einleiten, wenn der Tumor in Nachbarorgane gewachsen ist und damit die Wahrscheinlichkeit der Ausbildung von Fernmetastasen sehr hoch ist. Bei metastasierenden Harnblasenkarzinomen besteht das Behandlungskonzept aus einer kombinierten Chemotherapie mit Cisplatin und Gemcitabin (GEM). Die Effizienz dieser Behandlungen ist allerdings unbefriedigend und es kommt in 50–70% der Fälle zur Rezidivbildung [216].

Tabelle 4-1 Behandlungsstrategien beim Harnblasenkarzinom

Tumorklassifizierung	Behandlungsstrategie	Sterberate (%)*
Ta, G1		<5
Ta, G2		10
Ta, G3	TUR + BCG-Therapie oder intravesikuläre Chemotherapie (MMC)	10-25
T1, G1		20
T1, G2		25
Carcinoma <i>in situ</i>	intravesikuläre Behandlung mit BCG; wenn nach 3 Monaten keine Remission erreicht wurde sollte erneut eine Instillation oder eine Zystektomie erfolgen	–
T1, G3	gegebenenfalls radikale Zystektomie + Chemo- oder Strahlentherapie	30-40
T2-T4	Radikale Zystektomie + Chemo- oder Strahlentherapie	–
N+/M+	Chemotherapie	–

*zusammengefasst in [5]

4. Diskussion

Ein Hauptgrund für die schlechte Wirksamkeit von Chemotherapeutika wie MMC, CDDP oder GEM besteht darin, dass viele Tumoren eine Resistenz gegenüber einer Vielzahl von Chemotherapien aufweisen (*Multi Drug Resistance, MDR*). Neben der Überexpression von anti-apoptotischen Genen [217], spielt die Überexpression von Wirkstoff-ausschleusenden Pumpen, die vermehrte Reparatur beschädigter DNA und die Überexpression von Enzymen zur Detoxifizierung und Eliminierung des entsprechenden Wirkstoffs eine entscheidende Rolle bei der Entwicklung der MDR [218]. Daraus ergibt sich die Notwendigkeit neuer Therapieansätze, um sowohl eine Progression des Tumors als auch einer Rezidivbildung zu verhindern.

Ein vielversprechender Ansatz, ist die Identifizierung therapierelevanter mRNA-Targets im Urin von Harnblasenkarzinompatienten, deren sequenzspezifische Hemmung durch Nukleinsäurewirkstoffe möglicherweise zur Chemosensibilisierung der Tumorzellen führt. Dadurch könnte die Wirksamkeit von Chemotherapien deutlich erhöht werden. Dieser Ansatz ist besonders attraktiv, da es nur der Sequenz des identifizierten mRNA-Targets bedarf, um mit der Validierung zu beginnen. Die Blase ist aufgrund der guten Zugänglichkeit für eine lokale Instillation von Nukleinsäurewirkstoffen besonders geeignet und potentielle Nebenwirkungen wie unspezifische Toxizität limitieren sich auf dieses Organ [219]. Die Sequenz-spezifische Hemmung dieser Targets kann über siRNAs erreicht werden. Dabei handelt es sich um synthetische doppelsträngige RNA Moleküle mit einer typischen Länge von 21-23 Basenpaaren. Die Suppression der Target-RNAs erfolgt über RNA-Interferenz (RNAi). Dabei wird die siRNA im Zytoplasma in den RNA-induced silencing complex (RISC) integriert. Der *antisense*-Strang der siRNA bindet zusammen mit RISC an die Target-mRNA, wodurch die mRNA durch die Nuklease-Aktivität von RISC degradiert wird. Erste *in vivo* Arbeiten mit Maus-Modellen zeigen, dass durch die RNAi-basierte Hemmung von Tumor-assoziierten Genen (EphA2) das Tumorstadium innerhalb von 4 Wochen auf 50% reduziert werden konnte [220]. Für das Harnblasenkarzinom liegen ebenfalls erste *in vivo* Experimente vor, welche eine Inhibition des Tumorstadiums nach siRNA-vermittelter Suppression von *Polo-like kinase-1* zeigen [221].

Durch die Analyse der mRNA-Zusammensetzung im Urin von Harnblasenkarzinompatienten konnte neben der diagnostischen mRNA-Ratio ETS2/uPA die malignitätsspezifische mRNA-Tumormarker Ratio OP18/UPK1A identifiziert werden. Durch die Ratio ergab sich eine höchst signifikante Trennung der Ta- und T1-Tumoren von den progressiveren T2- bis T3- sowie Tis-Tumoren bzw. der G1- und G2-Tumoren von den G3-Tumoren ($p < 0,0001$, Abschnitt 3.2.3.2). Bei Patienten mit einem höheren Tumorstadium bzw. einem höheren Tumorstadium war die OP18/UPK1A mRNA-Ratio signifikant höher. Dadurch, dass die OP18/UPK1A mRNA-Ratio im Urin von Harnwegsinfektionspatienten und gesunden Spendern keinen signifikanten Unterschied aufwies, kann davon ausgegangen werden, dass es sich bei dieser Ratio um einen malignitätsspezifischen Tumormarker handelt. Ein prognostischer Marker zur Erfassung des Malignitäts-Potentials eines Tumors ist insofern hilfreich, da zur Zeit die Klassifizierungen nach Differenzierungsgrad oder Tumorstadium (Infiltrationstiefe) die primären prognostischen Variablen darstellen, und somit die Therapiestrategie (Tabelle 1-2) maßgeblich beeinflussen.

4. Diskussion

Die Abundanz der UPK1A mRNA im Urin der G2-Tumorgruppe war nicht signifikant verschieden von der G3-Tumorgruppe. Die signifikant erhöhte Abundanz der OP18 mRNA im Urin der G3-Tumorpatienten war somit ausschlaggebend für die Erhöhung der mRNA-Ratio. Die signifikant erhöhte Abundanz der OP18 mRNA im Urin von Patienten mit einem progressiven Harnblasenkarzinom ist eine neue Erkenntnis und geht konform mit Daten, die bei anderen Tumorentitäten bereits erhoben wurden. Diese Beobachtungen führten zu der Frage, ob die UPK1A und OP18 mRNA mögliche Tumor-Targets für das Harnblasenkarzinom darstellen und somit möglicherweise eine neue Therapieoption für das Harnblasenkarzinom bieten. Zur Untersuchung dieser Hypothese wurde ein Zellkulturmodell aus der gut-differenzierten „G1“-Harnblasenkarzinom-Zelllinie RT-4 ohne *p53*-Mutation und der invasiven, moderat-differenzierten „G3“-Harnblasenkarzinom-Zelllinie ECV-304 mit einer *p53*-Mutation erstellt. In diesem Zellkulturmodell war die OP18/UPK1A mRNA-Ratio in der „G1“-Zelllinie etwa zwei log-Stufen geringer als in der „G3“-Zelllinie. Dadurch waren die *in vitro*-Voraussetzungen zur näheren Charakterisierung der UPK1A und OP18 mRNA erfüllt. Anschließend wurde mit Hilfe von siRNAs untersucht, ob eine Suppression dieser mRNAs eine Veränderung des malignen Phänotyps der Zelllinien bewirkte. Der maligne Phänotyp zeichnet sich durch Unabhängigkeit von wachstumsfördernden Signalen, durch Sensitivitätsverlust gegenüber wachstumshemmenden Signalen, durch Verhinderung von Apoptose, durch unbegrenztes Zellwachstum, durch fortwährende Angiogenese sowie durch Invasion und Metastasierung aus [127].

Es zeigte sich, dass die Viabilität von ECV-304 Zellen nach der Suppression der beiden mRNAs deutlich auf 40% reduziert wurde, was ein vielversprechender Ausgangspunkt für die weitere Charakterisierung dieser mRNAs war. Der Rückgang der Zellviabilität ging in den OP18 mRNA-supprimierten ECV-304 Zellen mit einer stark erhöhten CC3/TC3 mRNA-Ratio einher. CC3 ist ein Apoptose-Aktivator. TC3 ist eine Spleißvariante von CC3. Die mRNA kodiert ein instabiles Protein mit anti-apoptischen Eigenschaften [121]. Eine erhöhte CC3/TC3 mRNA-Ratio war somit ein Indiz für eine wahrscheinliche Induktion des programmierten Zelltods, der Apoptose. Weitere Versuche zeigten, dass in den OP18 mRNA-supprimierten ECV-304-Zellen tatsächlich Apoptose über Caspase 3/7 induziert wurde. Nach Suppression der UPK1A mRNA wurde hingegen keine erhöhte Caspase 3/7-Aktivität nachgewiesen, was darauf hindeutete, dass ein Caspase 3/7-unabhängiger Zelltod zu dem Rückgang der Zellviabilität führte. Neben dem Rückgang der Zellviabilität wurde eine deutlich vermehrte Ausbildung von Vakuolen beobachtet, welche sich zum Teil über das gesamte Zytoplasma ausbreiteten. Vakuolen entstehen nach der Induktion von Autophagie, treten aber auch vermehrt bei einem Zelltod durch Nekrose auf [222]. Durch die Verwendung von Monodansylcadaverin (MDC) wurde nach der Suppression von UPK1A das gesamte Zytoplasma der Zellen diffus angefärbt, wodurch geschlossen wurde, dass die Integrität der Plasmamembran nach der Herunterregulation der UPK1A mRNA nicht mehr gegeben war und der Farbstoff dadurch in die Zelle diffundieren konnte. Das in dieser Arbeit zum Nachweis von Autophagosomen verwendete MDC scheint, ähnlich wie der Fluoreszenzfarbstoff Propidium-Iodid (PI), verstärkt durch nicht-intakte Membranen zu diffundieren und gab demnach einen Hinweis auf Nekrose. Normalerweise werden

4. Diskussion

nekrotische Zellen durch eine PI-Färbung quantitativ nachgewiesen, wobei dieser Fluoreszenzfarbstoff durch die zerstörte Zellmembran diffundiert und den Zellkern anfärbt. Das Auftreten einer Nekrose nach der Suppression der UPK1A mRNA wurde zuerst nicht in Betracht gezogen, da Nekrose eine Konsequenz aus pathophysiologischen Bedingungen, wie beispielsweise einer Infektion, einer Entzündung oder einer Ischämie (bei Unterbrechung der Durchblutung eines Gewebes infolge mangelnder arterieller Blutzufuhr) ist. Ein vermehrtes Auftreten von Nekrose in UPK1A mRNA-supprimierten Zellen wäre allerdings eine interessante Beobachtung, da *in vitro* die UPK1A mRNA Expression deutlich geringer in den invasiven ECV-304-Zellen gegenüber den gut-differenzierten RT-4-Zellen war. *Ex vivo* wurde beobachtet, dass die UPK1A mRNA Abundanz im Vergleich zu OP18 im Urin von G3-Harnblasenkarzinompatienten gegenüber G2-Harnblasenkarzinompatienten nicht signifikant erhöht war. Möglicherweise kommt es unter anderem durch eine Suppression von UPK1A in Tumoren zu einem Umgehen des apoptotischen Zelltods, indem vermehrt ein nekrotischer Zelltod vorliegt. Diese vermutete Transformation wird unterstützt durch die Tatsache, dass in progressiveren Tumoren eine genetisch-bedingte Resistenz gegenüber der Induktion von Apoptose ausgeprägt ist (Expression anti-apoptotischer Gene wie *c-myc* und *BCL-2*), wobei es vermehrt zu einer chronischen nicht-apoptotischen Tumor-Lyse kommen kann. Infolge des erhöhten nekrotischen Tumorzelltods und der konsequenten Freisetzung von Gefahrensignalen in Abwesenheit von Pathogen-assoziierten Erkennungsmolekülen könnte sich in der Tumor-Mikroumgebung eine Art chronische Entzündungssituation einstellen, welche charakterisiert ist durch Angiogenese, Stromagenese und der Suppression der adaptiven Immunantwort [zusammengefasst in 223]. Zu den Pathogen-assoziierten Erkennungsmolekülen gehört auch UPK1A, welches ein Rezeptormolekül für das uropathogene Bakterium *E. coli* ist [224]. Das bakterielle Adhäsion FimH bindet UPK1A, wodurch es zur bakteriellen Invasion, zum Abschilfern des Epithels und zur Induktion von Apoptose kommt [225,226]. Die in dieser Arbeit gemachten Beobachtungen geben einen Hinweis, dass UPK1A möglicherweise als Tumorsuppressor in Blasenepithelzellen fungiert und demnach einen Einfluss auf die Tumorigenese von Harnblasenkarzinomen hat.

Im Gegensatz zu UPK1A wurde OP18 unter Verwendung von siRNAs bereits ausführlicher untersucht [z.B. 227,228], da schon länger bekannt ist, dass Op18 eine Schlüsselrolle in der Regulation der Zellproliferation übernimmt [229]. Es wird angenommen, dass OP18 die Aufgabe eines Schalters in diversen Signaltransduktionskaskaden übernimmt und dadurch Zellwachstum sowie Differenzierung beeinflusst werden [230]. Bei der Zellteilung bewirkt OP18 die Depolymerisierung der Mikrotubuli im Verlauf der Anaphase und/oder verhindert die Polymerisierung von Tubulin-Heterodimeren [231]. Zu Beginn der Mitose wird die depolymerisierende Aktivität von OP18 durch Phosphorylierung eingestellt, um die Ausbildung der mitotischen Spindel zu gewährleisten [232]. Anhand von Zellkulturversuchen konnte gezeigt werden, dass die Phosphorylierung von OP18 über die *cdc2* erfolgt [233,234]. Dies wurde in K562-Zellen anhand der Überexpression einer OP18-Mutante mit einer Mutation in der *cdc2*-Bindestelle gezeigt [235], was wie die Inhibition von OP18 [236] zum Arrest des Zellzyklus in der G₂/M-Phase führte. Aus der Arbeit von Alli *et al.* geht hervor, dass durch die Hemmung von

4. Diskussion

OP18 diverse p53 Wildtyp Funktionen (z.B: Zellzyklus-Regulation) in Brustkrebskarzinom-Zelllinien mit mutierten p53 Proteinen wiederhergestellt wurden [228]. Die siRNA-vermittelte Suppression von OP18 hatte auch in dieser eine vermehrte Induktion von Apoptose zur Folge. Für die Regulation der OP18-Transkription ist p53 folglich essentiell [125]. In den RT-4-Zellen, welche Wildtyp p53 exprimieren, war die Suppression der OP18 mRNA sehr ineffektiv. Schon 48 h nach der Transfektion war die Expression der OP18 mRNA wieder vergleichbar mit der Kontrolle. Diese Beobachtung deutet darauf hin, dass hier der siRNA-vermittelten Hemmung der OP18 mRNA-Expression sehr wahrscheinlich durch Wildtyp p53 entgegengesteuert wird.

Die partielle Wiederherstellung des p53 Wildtyps über die Suppression von OP18 ist sehr attraktiv, weil Wildtyp p53 in viele Prozesse eingebunden ist, welche über Leben oder Tod entscheiden [237]. In normalen Zellen kann die Transkription von OP18 durch Wildtyp p53 unterdrückt werden und bei Beschädigung der DNA wird der Tumorsuppressor und Transkriptionsaktivator p53 in aktiver und stabilisierter Form akkumuliert. Dadurch wird der Zellzyklus am G1/S-Übergang gestoppt, die Reparatur beschädigter DNA induziert und Apoptose eingeleitet [238]. Da in vielen aggressiven und schwertherapierbaren Karzinomen dominant-negative p53 Mutationen vorliegen, repräsentiert die Hemmung von OP18 einen neuen Ansatz zur Behandlung von Karzinomen mit aberranter p53 Funktion. In diesem Zusammenhang wurde untersucht, ob eine Suppression der OP18 mRNA in den ECV-304-Zellen nach einer Behandlung mit Cisplatin zur Chemosensibilisierung führte. Aus diesem Versuch ging hervor, dass die Suppression von OP18 bei einer Gabe von 12 µg/ml Cisplatin zu einer signifikanten Reduktion der Zellviabilität auf 37% der Kontrolle führte. Die Suppression der UPK1A mRNA führte hingegen nicht zu einer Chemosensibilisierung. Die Ergebnisse geben die Aussicht, dass die Verwendung von Gesamturin nicht nur für die Entwicklung eines diagnostischen Tests für Harnblasenkarzinome geeignet ist, sondern auch die Möglichkeit bietet, nach potentiellen Tumor-Targets zu suchen.

5. Zusammenfassung

Die Identifikation von leicht zugänglichen Tumormarkern zur präzisen, nicht-invasiven und robusten Tumordiagnostik beim Harnblasenkarzinom ist überaus erstrebenswert, weil derzeit kein Urin-assoziiertes diagnostisches Tumormarker für das Harnblasenkarzinom bekannt ist, welcher den invasiven „Goldstandard“, die Zystoskopie, ersetzen könnte. Durch die Entwicklung der quantitativen PCR-Technik ist der Nachweis Nukleinsäure-basierter Tumormarker attraktiv geworden. Grundsätzlich ermöglicht diese Technik eine schnelle und höchstgenaue Quantifizierung jeglicher Nukleinsäure-Sequenzen in einem heterogenen Probenmaterial, wobei schon wenige Moleküle des Markers für eine Detektion ausreichend sind.

Hier diente die quantitative PCR als Methodenplattform, um im Urin von Harnblasenkarzinompatienten nach potentiellen RNA-Tumormarkern zu suchen. Auf der Grundlage Urin-assoziiertes RNA wurde das Ziel verfolgt, eine robuste, sensitive und spezifische Tumordiagnostik zu entwickeln. Hierfür wurden, teilweise unter Verwendung kommerzieller Verfahren, Protokolle zur Präparation und Quantifizierung von *messenger*-RNA (mRNA)- und micro-RNA (miRNA)-Sequenzen neu entwickelt.

Die Analyse der Urin-assoziierten Zusammensetzung von insgesamt 157 miRNA-Spezies ergab eine hohe Abundanz von miR-126 und miR-182 im Urin der Harnblasenkarzinompatienten gegenüber gesunden Spendern. Diese miRNAs wurden anschließend in einem größeren „Test“-Set an Urinproben über RT-qPCR nachgewiesen. Aus den Untersuchungen ging die miR-126/miR-152-Ratio hervor, welche eine Trennung der Harnblasenkarzinompatienten (n = 29) von gesunden Spendern (n = 11) mit einer Spezifität von 82% und einer Sensitivität von 72% ermöglichte. Darüber hinaus wurde die miR-182/miR-152 Ratio identifiziert, welche ebenfalls im Urin von Harnblasenkarzinompatienten verglichen mit gesunden Spendern signifikant erhöht war. Die diagnostische Aussagekraft dieser miRNA-Ratios wurde anschließend mit derjenigen von mRNA-Tumormarkern verglichen.

Hierfür wurde analog zu den miRNAs ein RT-qPCR-Array zur Detektion von 84 verschiedenen tumorrelevanten mRNAs durchgeführt. Potentielle mRNA-Tumormarker wurden ausgewählt und zusammen mit in der Literatur beschriebenen mRNA-Tumormarkern im Urin eines Test-Sets von 61 Harnblasenkarzinompatienten und 37 gesunden Spendern über RT-qPCR nachgewiesen. Aus dieser Analyse wurde die mRNA-Ratio ETS2/uPA entwickelt. Hiermit war eine äußerst sensitive (75,4%) und hochspezifische (100%) Unterscheidung der Harnblasenkarzinompatienten von den gesunden Spendern möglich, die diagnostische Aussagekraft der miRNA-Ratios und besonders auch der Urinzytologie wurde deutlich übertroffen. Zudem war die RT-qPCR-basierte Detektion von ETS2- und uPA-Sequenzen mit einem mittleren Variationskoeffizienten von jeweils 11% (n = 98) sehr robust. Dies ist von zentraler Bedeutung für einen diagnostischen Test.

Weiterhin wurde die malignitätsspezifische mRNA-Ratio OP18/UPK1A in Urinproben identifiziert. Die OP18/UPK1A mRNA-Ratio hat einen prognostischen Wert, da diese die Erkennung progressiver Harnblasenkarzinome ermöglicht. Diese Beobachtung führte zu der näheren tumorbiologischen Charakterisierung von UPK1A- und OP18 mRNA unter

5. Zusammenfassung

Einbeziehung siRNA-vermittelter phänotypischer „*knock-downs*“. Die siRNA-vermittelte Suppression der OP18 mRNA führte in der „G3“-Harnblasenkarzinomzelllinie ECV-304 zur Induktion von Apoptose und zu einer Chemosensibilisierung bei der Behandlung mit dem Chemotherapeutikum Cisplatin.

Der in dieser Arbeit entwickelte nicht-invasive Test zum Nachweis von RNA-Tumormarkern aus Gesamturin-Proben beschreibt einen neuartigen diagnostischen Zugang. Die anhand dieses Verfahrens identifizierte mRNA-Tumormarker-Ratio ETS2/uPA ermöglicht eine sensitive, spezifische, robuste und nicht-invasive Detektion des Harnblasenkarzinoms. Schließlich können aus dieser Analyse auch neuartige therapeutische Tumor-Targets wie OP18 identifiziert werden.

6. Literaturverzeichnis

1. Zaak D, Hungerhuber E, Schneede P, Stepp H, Frimberger D, Corvin S, Schmeller S, Kriegmair M, Hofstetter A, Knüchel A. Role of 5-aminolevulinic acid in the detection of urothelial premalignant lesions. *Cancer*. 2002; 95:1234-8.
2. Rübber H, Bubenzer J, Bokenkamp, Lutzeyer W, Rathert P. Grading of transitional cell tumors of the urinary tract by urine cytology. *Urol Res* 1979;7:83-91.
3. Oosterlinck W, Lobel B, Jakse G, Malmström PU, Stöckle M, Sternberg C; European Association of Urology (EAU) Working Group on Oncological Urology. Guidelines on bladder cancer. *Eur Urol*. 2002;41:105-12.
4. Stein JP, Grossfeld GD, Ginsberg DA, Esrig D, Freeman JA, Figueroa AJ, Skinner DG, Cote RJ. Prognostic markers in bladder cancer: a contemporary review of the literature. *J Urol* 1998;160:645-59.
5. Kitamura H, Tsukamoto T. Early bladder cancer: concept, diagnosis, and management. *Int J Clin Oncol* 2006;11:28-37.
6. Konety BR. Molecular markers in bladder cancer: a critical appraisal. *Urol Oncol* 2006;24:326-37.
7. Schultz IJ, Witjes JA, Swinkels DW, de Kok JB. Bladder cancer diagnosis and recurrence prognosis: Comparison of markers with emphasis on survivin. *Clinica Chimica Acta* 2006;368:20-32.
8. Kausch I, Böhle A. Nichtinvasive Urindiagnostik des Harnblasenkarzinoms. Was ist gesichert? *Urologe [A]* 2003;42:912-921.
9. Fradet Y, Lockhart C. Performance characteristics of a new monoclonal antibody test for bladder cancer: ImmunoCyt. *Can J Urol* 1997;4:400-405.
10. Toma MI, Friedrich MG, Hautmann SH, Jäkel KT, Erbersdobler A, Hellstern A, Huland H. Comparison of the ImmunoCyt test and urinary cytology with other urine tests in the detection and surveillance of bladder cancer. *World J Urol* 2004;22:145-9.
11. Ellis WJ, Blumenstein BA, Ishak LM, Enfield DL. Clinical evaluation of the BTA TRAK assay and comparison to voided urine cytology and the Bard BTA test in patients with recurrent bladder tumors. The Multi Center Study Group. *Urology* 1997;50:882-7.
12. Tsihlias J, Grossman HB. The utility of fibrin/fibrinogen degradation products in superficial bladder cancer. *Urol Clin N Am* 2000;27:39-46.
13. Lokeshwar VB, Obek C, Soloway MS, Block NL. Tumor-associated hyaluronic acid: a new sensitive and specific urine marker for bladder cancer. *Cancer Res* 1997;57:773-7.
14. Sheinfeld J, Reuter VE, Melamed MR, Fair WR, Morse M. Enhanced bladder cancer detection with the Lewis X Antigen as a marker of neoplastic transformation. *J Urol* 1990;143:285-288.
15. Skacel M, Fahmy M, Brainard JA, Pettay JD, Biscotti CV, Liou LS, Procop GW, Jones JS, Ulchaker J, Zippe CD, Tubbs RR. Multitarget fluorescence in situ hybridization assay detects transitional cell carcinoma in the majority of patients with bladder cancer and atypical or negative urine cytology. *J. Urol*. 2003;169:2101-5.
16. Tyrkus M, Powell L, Fakr W. Cytogenetic studies of carcinomata in situ of the bladder: prognostic implications. *J Urol* 1992;148:44-6.
17. Engeler D., Wyler S, Schmid H-P. Das Harnblasenkarzinom (I). Ätiologie, Epidemiologie und Diagnostik. *Onkologie* 2005;1:12-14.
18. Wittekind, C, Nenning H. Pathologie und Prognosefaktoren des Harnblasenkarzinoms. *Der Onkologe* 2003;3: 227-235.
19. Epstein JI. The new World Health Organization/International Society of Urological Pathology (WHO/ISUP) classification for TA, T1 bladder tumors: is it an improvement? *Crit Rev Oncol Hematol*. 2003;47:83-9.
20. Buyru N, Tigli H, Ozcan F, Dalay N. Ras oncogene mutations in urine sediments of patients with bladder cancer. *J Biochem Mol Biol*. 2003;36:399-402.
21. Reddy EP, Reynolds RK, Santos E, Barbacid M. A point mutation is responsible for the acquisition of transforming properties by the T24 human bladder carcinoma oncogene. *Nature* 1982;300:149-152.
22. Cappellen D, De Oliveira C, Ricol D, de Medina S, Bourdin J, Sastre-Garau X, Chopin D, Thiery JP, Radvanyi F. Frequent activating mutations of FGFR3 in human bladder and cervix carcinomas. *Nat. Genet.* 1999;23:18-20.
23. Billerey C, Chopin D, Aubriot-Lorton MH, Ricol D, Gil Diez de Medina S, Van Rhijn B, Bralet MP, Lefrere-Belda MA, Lahaye JB, Abbou CC, Bonaventure J, Zafrani ES, van der Kwast T, Thiery JP, Radvanyi F. Frequent FGFR3 mutations in papillary non-invasive bladder (pTa) tumors. *Am. J. Pathol*. 2001;158:1955-9.
24. Wu XR. Urothelial tumorigenesis: a tale of divergent pathways. *Nature Reviews Cancer* 2005;5:713-725
25. Wolff EM, Liang G, Jones PA. Urothelial tumorigenesis: a tale of divergent pathways. *Nat Rev Cancer* 2005;5:713-725.
26. Quelle DE, Zindy F, Ashmun RA, Sherr CJ. Alternative reading frames of the INK4a tumor suppressor gene encode two unrelated proteins capable of inducing cell cycle arrest. *Cell*. 1995;83:993-1000.
27. Hirai H, Roussel MF, Kato JY, Ashmun RA, Sherr CJ. Novel INK4 proteins, p19 and p18, are specific inhibitors of the cyclin D-dependent kinases CDK4 and CDK6. *Mol Cell Biol*. 1995;15:2672-81.

6. Literaturverzeichnis

28. Orlow I, LaRue H, Osman I, et al. Deletions of the INK4A gene in superficial bladder tumors: association with recurrence. *Am J Pathol* 1999;155:105-113.
29. Cordon-Cardo C. Molecular alterations in bladder cancer. *Cancer Surv* 1998;32:115-131.
30. Stein JP, Ginsberg DA, Grossfeld GD, Chatterjee SJ, Esrig D, Dickinson MG, Groshen S, Taylor CR, Jones PA, Skinner DG, Cote RJ. Effect of p21WAF1/CIP1 expression on tumor progression in bladder cancer. *J Natl Cancer Inst.* 1998;90:1072-9.
31. Chatterjee SJ, George B, Goebell PJ, Alavi-Tafreshi M, Shi SR, Fung YK, Jones PA, Cordon-Cardo C, Datar RH, Cote RJ. Hyperphosphorylation of pRb: a mechanism for RB tumour suppressor pathway inactivation in bladder cancer. *J Pathol.* 2004;203:762-70.
32. Logothetis CJ, Xu HJ, Ro JY, Hu SX, Sahin A, Ordonez N, Benedict WF. Altered expression of retinoblastoma protein and known prognostic variables in locally advanced bladder cancer. *J Natl Cancer Inst.* 1992;84:1256-61.
33. Esrig D, Elmajian D, Groshen S, Freeman JA, Stein JP, Chen SC, Nichols PW, Skinner DG, Jones PA, Cote RJ. Accumulation of nuclear p53 and tumor progression in bladder cancer. *N Engl J Med.* 1994;331:1259-64.
34. Williams SG, Stein JP. Molecular pathways in bladder cancer. *Urol Res.* 2004;32:373-385.
35. Sanchez-Carbayo M. Recent advances in bladder cancer diagnostics. *Clinical Biochemistry* 2004;37:562-571.
36. Andreasen PA, Kjøller L, Christensen L, Duffy MJ. The urokinase-type plasminogen activator system in cancer metastasis: a review. *Int J Cancer.* 1997;72:1-22.
37. Chapman HA. Plasminogen activators, integrins, and the coordinated regulation of cell adhesion and migration. *Curr Opin Cell Biol.* 1997;9:714-24.
38. Rabbani SA, Mazar AP. The role of the plasminogen activation system in angiogenesis and metastasis. *Surg Oncol Clin N Am.* 2001;10:393-415.
39. Casella R, Shariat SF, Monoski MA, Lerner SP. Urinary levels of urokinase-type plasminogen activator and its receptor in the detection of bladder carcinoma. *Cancer.* 2002;95:2494-9.
40. Kanayama H. Matrix metalloproteinases and bladder cancer. *J Med Invest.* 2001;48:31-43.
41. Davies B, Waxman J, Wasan H, Abel P, Williams G, Krausz T, Neal D, Thomas D, Hanby A, Balkwill F. Levels of matrix metalloproteinases in bladder cancer correlate with tumor grade and invasion. *Cancer Res.* 1993;53:5365-9.
42. Gerhards S, Jung K, Koenig F, Danilchenko D, Hauptmann S, Schnorr D, Loening SA. Excretion of matrix metalloproteinases 2 and 9 in urine is associated with a high stage and grade of bladder carcinoma. *Urology.* 2001;57:675-9.
43. Alfano D, Iaccarino I, Stoppelli MP. Urokinase signaling through its receptor protects against anoikis by increasing BCL-xL expression levels. *J Biol Chem* 2006;281:17758-17767.
44. Crippa MP. Urokinase-type plasminogen activator. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 2007;39:690-4.
45. Papanicolaou GN, Marshall VE. Urine sediment smears as a diagnostic procedure in cancers of the urinary tract. *Science* 1945;101:519-523.
46. Sidransky D, von Eschenbach A, Tsai YC et al.. Identification of p53 gene mutations in bladder cancers and urine samples. *Science* 1991;252:706-709.
47. Mao L, Schoenberg MP, Scicchitano M et al. Molecular detection of primary bladder cancer by microsatellite analysis. *Science* 1996;271:659-662.
48. Simoneau M, Aboukassim TO, LaRue H, Rousseau F, Fradet Y. Four tumor suppressor loci on chromosome 9q in bladder cancer: evidence for two novel candidate regions 9q22.3 and 9q31. *Oncogene* 1999;18:157-163.
49. van Rhijn BW, Lurkin I, Kirkels WJ, van der Kwast TH, Zwarthoff EC. Microsatellite analysis-DNA test in urine competes with cystoscopy in follow-up of superficial bladder carcinoma: a phase II trial. *Cancer.* 2001;92:768-75.
50. Wadlow R and Ramaswamy S. DNA microarrays in clinical cancer research. *Curr Mol Med.* 2005;5:111-20.
51. Dyrskjøt L, Thykjaer T, Kruhøffer M, Jensen JL, Marcussen N, Hamilton-Dutoit S, Wolf H, Orntoft TF. Identifying distinct classes of bladder carcinoma using microarrays. *Nat Genet* 2003;33:90-6.
52. Schultz IJ, Wester K, Straatman H, Kiemeny LA, Babjuk M, Mares J, et al. Prediction of recurrence in Ta urothelial cell carcinoma by real-time quantitative PCR analysis: a microarray validation study. *Int J Cancer* 2006;119:1915-9.
53. Croce CM, Calin GA. MiRNAs, cancer, and stem cell division. *Cell* 2005; 122:6-7.
54. Caldas C, Brenton JD. Sizing up miRNAs as cancer genes. *Nat Med* 2005; 11:712-714.
55. Hammond SM. MicroRNAs as oncogenes. *Curr Opin Genet Dev* 2006;16:4-9.
56. Cummins JM and Velculescu VE. Implications for micro-RNA profiling for cancer diagnosis. *Oncogene* 2006;25:6220-6227.
57. Poy MN, Eliasson L, Krutzfeldt J, Kuwajima S, Ma X, Macdonald PE, Pfeffer S, Tuschl T, Rajewsky N, Rorsman P, Stoffel M. A pancreatic-islet specific miRNA regulates insulin secretion. *Nature.* 2004;432:226-30.
58. Cheng AM, Byrom MW, Shelton J, Ford LP. Antisense inhibition of human miRNAs and indications for an involvement of miRNA in cell growth and apoptosis. *Nucleic Acids Research* 2005;33:1290-1297.

6. Literaturverzeichnis

59. Lu J, Getz G, Miska EA, Alvarez-Saavedra E, Lamb J, Peck D, Sweet-Cordero A, Ebert BL, Mak RH, Ferrando AA, Downing JR, Jacks T, Horvitz HR, Golub TR. MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature* 2005;435:834-838.
60. Volinia S, Calin GA, Liu CG, Ambs S, Cimmino A, Petrocca F, Visone R, Iorio M, Roldo C, Ferracin M, Prueitt RL, Yanaihara N, Lanza G, Scarpa A, Vecchione A, Negrini M, Harris CC, Croce CM. A microRNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103:2257-61.
61. Goessl C. Noninvasive molecular detection of cancer - the bench and the bedside. *Curr Med Chem* 2003;10:691-706.
62. Cronin M, Ghosh K, Sistare F, Quackenbush J, Vilker V, O'Connell. Universal RNA reference materials for gene expression. *Clin Chem* 2004;50:1464-1471.
63. Fleige S, Walf V, Huch S, Prgomet C, Sehm J, Pfaffl MW. Comparison of relative mRNA quantification models and the impact of RNA integrity in quantitative real-time RT-PCR. *Biotechnol Lett* 2006;28:1601-1613.
64. Bustin SA. Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems. *Journal of Molecular Endocrinology* 2002;29:23-39.
65. Antonov J, Goldstein DR, Oberli A, Baltzer A, Pirota M, Fleischmann A, Altermatt HJ, Jaggi R. Reliable gene expression measurements from degraded RNA by quantitative real-time PCR depend on short amplicons and a proper normalization. *Laboratory Investigation* 2005;85:1040-1050.
66. Medeiros M, Sharma VK, Ding R, Yamaji K, Li B, Muthukumar T, Valverde-Rosas S, Hernandez AM, Munoz R, Suthanthiran M. Optimization of RNA yield, purity and mRNA copy number by treatment of urine cell pellets with RNAlater. *J Immunol Methods* 2003;279:135-42.
67. Hanke M, Kausch I, Dahmen G, Jocham D, Warnecke JM. Detailed Technical Analysis of Urine RNA-Based Tumor Diagnostics Reveals ETS2/Urokinase Plasminogen Activator to Be a Novel Marker for Bladder Cancer. *Clin Chem*. 2007 Oct 5; [Epub ahead of print]
68. Kleppe K, Ohtsuka E, Kleppe R, Molineux I, Khorana HG. Studies on polynucleotides. XCVI. Repair replications of short synthetic DNA's as catalyzed by DNA polymerases. *J Mol Biol*. 1971;56:341-61.
69. Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*. 1988;239:487-91.
70. Higuchi R, Dollinger G, Walsh PS, Griffith R. Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Biotechnology (N Y)* 1992;10:413-7.
71. Wittwer CT, Herrmann MG, Moss AA, Rasmussen RP. Continuous fluorescence monitoring of rapid cycle DNA amplification. *Biotechniques*. 1997;22:130-1, 134-8.
72. Holland PM, Abramson RD, Watson R, Gelfand DH. Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'----3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1991;88:7276-80.
73. Bernard PS, Wittwer CT. Real-time PCR technology for cancer diagnostics. *Clin Chem* 2002; 48:1178-1185.
74. Tyagi S, Kramer FR. Molecular beacons: probes that fluoresce upon hybridization. *Nat Biotechnol*. 1996;14:303-8.
75. Caplin BE, Rasmussen RP, Bernard PS, Wittwer CT. LightCycler hybridization probes. *Biochemica* 1999;1:5-8.
76. Kutuyavin IV, Afonina IA, Mills A, Gorn VV, Lukhtanov EA, Belousov ES, Singer MJ, Walburger DK, Likhov SG, Gall AA, Dempcy R, Reed MW, Meyer RB, Hedgpeth J. 3'-minor groove binder-DNA probes increase sequence specificity at PCR extension temperatures. *Nucleic Acids Res*. 2000;28:655-61.
77. Whitcombe D, Theaker J, Guy SP, Brown T, Little S. Detection of PCR products using self-probing amplicons and fluorescence. *Nat Biotechnol*. 1999;17:804-7.
78. Nazarenko I, Lowe B, Darfler M, Ikonomi P, Schuster D, Rashtchian A. Multiplex quantitative PCR using self-quenched primers labeled with a single fluorophore. *Nucleic Acids Res*. 2002;30:e37
79. Mifflin TE, Estey CA, Felder RA. Robotic automation performs a nested RT-qPCR analysis for HCV without introducing sample contamination. *Clinica Chimica Acta* 2000; 290:199-211.
80. Sirover MA. New insights into an old protein: the functional diversity of mammalian glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *Biochimica et Biophysica Acta* 1999;1432:99-102.
81. Goidin D, Mamessier A, Staquet MJ, Schmitt D, Berthier-Vergnes O. Ribosomal 18S RNA prevails over glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase and beta-actin genes as internal standard for quantitative comparison of mRNA levels in invasive and noninvasive human melanoma cell subpopulations. *Analytical Biochemistry* 2001;295:17-21.
82. de Kok JB, Roelofs RW, Giesendorf BA, Pennings JL, Waas ET, Feuth T, Swinkels DW, Span PN. Normalization of gene expression measurements in tumor tissues: comparison of 13 endogenous control genes. *Lab. Invest*. 2005;85:154-9.
83. Garcia-Vallejo JJ, Van Het Hof B, Robben J, Van Wijk JA, Van Die I, Joziase DH, Van Dijk W. Approach for defining endogenous reference genes in gene expression experiments. *Anal. Biochem*. 2004;329:293-9.
84. Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, Speleman F. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol*. 2002;3:RESEARCH0034

6. Literaturverzeichnis

85. Ohl F, Jung M, Xu C, Stephan C, Rabien A, Burkhardt M, Nitsche A, Kristiansen G, Loening SA, Radonić A, Jung K. Gene expression studies in prostate cancer tissue: which reference gene should be selected for normalization? *J Mol Med*. 2005;83:1014-24.
86. Zuker M. Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucleic Acids Res*. 2003;31:3406-15.
87. Patzel V, Steidl U, Kronenwett R, Haas R, Sczakiel G. A theoretical approach to select effective antisense oligodeoxyribonucleotides at high statistical probability. *Nucleic Acids Res*. 1999; 27:4328-34.
88. Elbashir M, Martinez J, Patkaniowska A, Lendeckel W, Tuschl T. Functional anatomy of siRNAs for mediating efficient RNAi in *Drosophila melanogaster* embryo lysate. *EMBO J* 2001;20:6877-6888.
89. Porcelli AM, Ghelli A, Zanna C, Valente P, Ferroni S, Rugolo M. Apoptosis induced by staurosporine in ECV304 cells requires cell shrinkage and upregulation of Cl⁻ conductance. *Cell Death Differ*. 2004;11:655-62.
90. Meng F, Henson R, Lang M, Wehbe H, Maheshwari S, Mendell JT, Jiang J, Schmittgen TD, Patel T. Involvement of human micro-RNA in growth and response to chemotherapy in human cholangiocarcinoma cell lines. *Gastroenterology*. 2006;130:2113-29.
91. Krützfeldt J, Rajewsky N, Braich R, Rajeev KG, Tuschl T, Manoharan M, Stoffel M. Silencing of microRNAs in vivo with 'antagomirs'. *Nature*. 2005;438:685-9.
92. Bustin SA. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *Journal of Molecular Endocrinology* 2000;25:169-193.
93. Aerts JL, Gonzales MI, Topalian SL. Selection of appropriate control genes to assess expression of tumor antigens using real-time RT-PCR. *Biotechniques*. 2004;36:84-6, 88, 90-1.
94. Dheda K, Huggett JF, Bustin SA, Johnson MA, Rook G, Zumla A. Validation of housekeeping genes for normalizing RNA expression in real-time PCR. *Biotechniques* 2004;37:112-4, 116, 118-9.
95. Radonić A, Thulke S, Mackay IM, Landt O, Siegert W, Nitsche A. Guideline to reference gene selection for quantitative real-time PCR. *Biochem Biophys Res Commun*. 2004;313:856-62.
96. Lee PD, Sladek R, Greenwood CM, Hudson TJ. Control genes and variability: absence of ubiquitous reference transcripts in diverse mammalian expression studies. *Genome Res*. 2002;12:292-7.
97. Ririe KM, Rasmussen RP, Wittwer CT. Product differentiation by analysis of DNA melting curves during the polymerase chain reaction. *Anal Biochem*. 1997;245:154-60.
98. Moll R, Wu XR, Lin JH, Sun TT. Uroplakins, specific membrane proteins of urothelial umbrella cells, as histological markers of metastatic transitional cell carcinomas. *Am J Pathol* 1995;147:1383-1397.
99. Wu XR, Manabe M, Yu J, Sun TT. Large scale purification and immunolocalization of bovine uroplakins I, II, and III. Molecular markers of urothelial differentiation. *J Biol Chem* 1990;265:19170-9.
100. Kageyama S, Yoshiki T, Isono T, Tanaka T, Kim CJ, Yuasa T, Okada Y. High expression of human uroplakin Ia in urinary bladder transitional cell carcinoma. *Jpn J Cancer Res*. 2002;93:523-31.
101. Osman I, Kang M, Lee A, Deng FM, Polsky D, Mikhail M, Chang C, David DA, Mitra N, Wu XR, Sun TT, Bajorin DF. Detection of circulating cancer cells expressing uroplakins and epidermal growth factor receptor in bladder cancer patients. *Int J Cancer*. 2004;111:934-9.
102. Chen G, Wang H, Gharib TG, Huang CC, Thomas DG, Shedden KA, Kuick R, Taylor JM, Kardia SL, Misek DE, Giordano TJ, Iannettoni MD, Orringer MB, Hanash SM, Beer DG. Overexpression of oncoprotein 18 correlates with poor differentiation in lung adenocarcinomas. *Mol. Cell Proteomics*. 2003;2:107-16.
103. Melhem R, Hailat N, Kuick R, Hanash SM. Quantitative analysis of Op18 phosphorylation in childhood acute leukemia. *Leukemia*. 1997;11:1690-5.
104. Nylander K, Marklund U, Brattsand G, Gullberg M, Roos G. Immunohistochemical detection of oncoprotein 18 (Op18) in malignant lymphomas. *Histochem J* 1995;27:155-60.
105. Hailat N, Strahler J, Melhem R, Zhu XX, Brodeur G, Seeger RC, Reynolds CP, Hanash N-myc gene amplification in neuroblastoma is associated with altered phosphorylation of a proliferation related polypeptide (Op18). *Oncogene*. 1990;5:1615-8.
106. Friedrich B, Grönberg H, Landström M, Gullberg M, Bergh A. Differentiation-stage specific expression of oncoprotein 18 in human and rat prostatic adenocarcinoma. *Prostate*. 1995;27:102-9.
107. Yuan RH, Jeng YM, Chen HL, Lai PL, Pan HW, Hsieh FJ, Lin CY, Lee PH, Hsu HC. Stathmin overexpression cooperates with p53 mutation and osteopontin overexpression, and is associated with tumour progression, early recurrence, and poor prognosis in hepatocellular carcinoma. *J Pathol*. 2006;209:549-58.
108. Kouzu Y, Uzawa K, Koike H, Saito K, Nakashima D, Higo M, Endo Y, Kasamatsu A, Shiiba M, Bukawa H, Yokoe H, Tanzawa H. Overexpression of stathmin in oral squamous-cell carcinoma: correlation with tumour progression and poor prognosis. *Br J Cancer*. 2006;94:717-23.
109. Price DK, Ball JR, Bahrani-Mostafavi Z, Vachris JC, Kaufman JS, Naumann RW, Higgins RV, Hall JB. The phosphoprotein Op18/stathmin is differentially expressed in ovarian cancer. *Cancer Invest*. 2000;18:722-30.
110. Curmi PA, Noguès C, Lachkar S, Carelle N, Gonthier MP, Sobel A, Lidereau R, Bièche I. Overexpression of stathmin in breast carcinomas points out to highly proliferative tumours. *Br J Cancer*. 2000 ;82:142-50.
111. Rubin CI, Atweh GF. The role of stathmin in the regulation of the cell cycle. *Journal of Cellular Biochemistry* 2004;93:242-250.

6. Literaturverzeichnis

112. Marklund U, Larsson N, Melander GH, Brattsand G, Gullberg M. Oncoprotein 18 is a phosphorylation-responsive regulator of microtubule dynamics. *EMBO J* 1996;15:5290-5298.
113. Scholzen T, Gerdes J. The Ki-67 Protein: From the Known and the Unknown. *J Cell Physiol* 2000;182:311-322.
114. Santos LL, Amaro T, Pereira SA, Lameiras CR, Lopes P, Bento MJ, Oliveira J, Criado B, Lopes CS. Expression of cell-cycle regulatory proteins and their prognostic value in superficial low-grade urothelial cell carcinoma of the bladder. *Eur J Surg Oncol.* 2003;29:74-80.
115. Menke TB, Boettcher K, Krüger S, Kausch I, Boehle A, Sczakiel G, Warnecke JM. Ki-67 protein concentrations in urothelial bladder carcinomas are related to Ki-67-specific RNA concentrations in urine. *Clin Chem.* 2004;50:1461-3.
116. Reed JC. Proapoptotic multidomain Bcl-2/Bax-family proteins: mechanisms, physiological roles, and therapeutic opportunities. *Cell Death Differ* 2006;13:1378-86.
117. Le Bras M, Rouy I, Brenner C. The modulation of inter-organelle cross-talk to control apoptosis. *Med Chem* 2006;2:1-12.
118. Ito M, Jiang C, Krumm K, Zhang X, Pecha J, Zhao J, Guo Y, Roeder RG, Xiao H. TIP30 deficiency increases susceptibility to tumorigenesis. *Cancer Res.* 2003;63:8763-7.
119. Hsu T, Trojanowska M, Watson DK. Ets proteins in biological control and cancer. *J Cell Biochem* 2004;91:896-903.
120. Mistry SJ, Atweh GF. Stathmin expression in immortalized and oncogene transformed cells. *Anticancer Res* 1999;19:573-7.
121. Whitman S, Wang X, Shalaby R, Shtivelman E. Alternatively spliced products CC3 and TC3 have opposing effects on apoptosis. *Mol Cell Biol.* 2000 20:583-93.
122. Fowles LF, Martin ML, Nelsen L, Stacey KJ, Redd D, Clark YM, Nagamine Y, McMahon M, Hume DA, Ostrowski MC. Persistent activation of mitogen-activated protein kinases p42 and p44 and ets-2 phosphorylation in response to colony-stimulating factor 1/c-fms signaling. *Mol Cell Biol.* 1998; 18:5148-56.
123. Smith JL, Schaffner AE, Hofmeister JK, Hartman M, Wei G, Forsthoefel D, Hume DA, Ostrowski MC. ets-2 is a target for an akt (Protein kinase B)/jun N-terminal kinase signalling pathway in macrophages of motheaten-viable mutant mice. *Mol Cell Biol* 2000;20:8026-34.
124. Song J, Duncan MJ, Li G, Chan C, Grady R, Stapleton A, Abraham SN. A novel TLR4-mediated signaling pathway leading to IL-6 responses in human bladder epithelial cells. *PLoS Pathog.* 2007;3:e60
125. Johnsen JI, Aurelio ON, Kwaja Z, Jörgensen GE, Pellegata NS, Plattner R, Stanbridge EJ, Cajot JF. p53-mediated negative regulation of stathmin/Op18 expression is associated with G(2)/M cell-cycle arrest. *Int J Cancer.* 2000;88:685-91.
126. International Agency for Research on Cancer, TP53 genetic variations in human cancer, IARC release R7, 2002
127. Hanahan D, Weinberg RA. The Hallmarks of Cancer. *Cell* 2000;100:57-70.
128. Shankavaram UT, Reinhold WC, Nishizuka S, Major S, Morita D, Chary KK, Reimers MA, Scherf U, Kahn A, Dolginow D, Cossman J, Kaldjian EP, Scudiero DA, Petricoin E, Liotta L, Lee JK, Weinstein JN. Transcript and protein expression profiles of the NCI-60 cancer cell panel: an integromic microarray study. *Mol Cancer Ther.* 2007;6:820-32.
129. Luo XN, Mookerjee B, Ferrari A, Mistry S, Atweh GF. Regulation of phosphoprotein p18 in leukemic cells. Cell cycle regulated phosphorylation by p34cdc2 kinase. *J Biol Chem.* 1994;269:10312-8.
130. Sugimoto M, Kuo ML, Roussel MF, Sherr CJ. Nucleolar Arf tumor suppressor inhibits ribosomal RNA processing. *Mol Cell.* 2003;11:415-24.
131. Xiao H, Palhan V, Yang Y, Roeder RG. TIP30 has an intrinsic kinase activity required for up-regulation of a subset of apoptotic genes. *EMBO J.* 2000;19:956-63.
132. Shi M, Zhang X, Wang P, Zhang HW, Zhang BH, Wu MC. TIP30 regulates apoptosis-related genes in its apoptotic signal transduction pathway. *World J Gastroenterol.* 2005;11:221-7.
133. Watabe T, Yoshida K, Shindoh M, Kaya M, Fujikawa K, Sato H, Seiki M, Ishii S, Fujinaga K. The Ets-1 and Ets-2 transcription factors activate the promoters for invasion-associated urokinase and collagenase genes in response to epidermal growth factor. *Int J Cancer.* 1998;77:128-37.
134. Duchrow M. Klonierung, Charakterisierung und Funktionsanalyse des proliferationsassoziierten Ki-67 Antigens. Kumulative Habilitationsschrift, verfasst an der Universität zu Lübeck, 2003.
135. van Oijen MG, Medema RH, Slootweg PJ, Rijkssen G. Positivity of the proliferation marker Ki-67 in noncycling cells. *Am J Clin Pathol.* 1998;110:24-31.
136. Niemann A, Takatsuki A, Elsässer H-P. The lysosomotropic agent monodansylcadaverine also acts as a solvent polarity probe. *The Journal of Histochemistry & Cytochemistry* 2000;48:251-258.
137. Okada H, Mak TW. Pathways of apoptotic and non-apoptotic death in tumour cells. *Nat Rev Cancer.* 2004;4:592-603.
138. Ogier-Denis E, Codogno P. Autophagy: a barrier or an adaptive response to cancer. *Biochimica et Biophysica Acta* 2003;1603:113-128.
139. Zaak D, Hungerhuber E, Schneede P, Stepp H, Frimberger D, Corvin S, Schmeller N, Kriegmair M, Hofstetter A, Knuechel R. Role of 5-aminolevulinic acid in the detection of urothelial premalignant lesions. *Cancer.* 2002;95:1234-8.

6. Literaturverzeichnis

140. Jocham D, Witjes F, Wagner S, Zeylemaker B, van Moorselaar J, Grimm MO, Muschter R, Popken G, König F, Knüchel R, Kurth KH. Improved detection and treatment of bladder cancer using hexaminolevulinat imaging: a prospective, phase III multicenter study. *J Urol.* 2005;174:862-6.
141. Groskopf J, Aubin SM, Deras IL, Blase A, Bodrug S, Clark C, Brentano S, Mathis J, Pham J, Meyer T, Cass M, Hodge P, Macairan ML, Marks LS, Rittenhouse H. APTIMA PCA3 molecular urine test: development of a method to aid in the diagnosis of prostate cancer. *Clin Chem.* 2006;52:1089-95.
142. Bai VU, Kaseb A, Tejwani S, Divine GW, Barrack ER, Menon M, Pardee AB, Reddy GP. Identification of prostate cancer mRNA markers by averaged differential expression and their detection in biopsies, blood, and urine. *Proc Natl Acad Sci* 2007;104:2343-8.
143. Sandvik AK, Alsberg BK, Nørsett KG, Yadetie F, Waldum HL, Lægreid A. Gene expression analysis and clinical diagnosis. *Clinica Chimica Acta* 2006;363:157-164.
144. Calin GA, Croce CM. MicroRNA signatures in human cancers. *Nat Rev Cancer.* 2006;6:857-66.
145. Mizuarai S, Takahashi K, Kobayashi T, Kotani H. Advances in isolation and characterization of homogeneous cell populations using laser microdissection. *Histol Histopathol.* 2005;20:139-46.
146. Wang T, Brown MJ. mRNA quantification by real time TaqMan polymerase chain reaction: validation and comparison with RNase protection. *Anal Biochem.* 1999;269:198-201.
147. Parker RM, Barnes NM. mRNA: detection by in Situ and northern hybridization. *Methods Mol Biol.* 1999;106:247-83.
148. Hod Y. A simplified ribonuclease protection assay. *Biotechniques.* 1992;13:852-4.
149. Park JY, Kim SY, Lee JH, Song J, Noh JH, Lee SH, Park WS, Yoo NJ, Lee JY, Nam SW. Application of amplified RNA and evaluation of cRNA targets for spotted-oligonucleotide microarray. *Biochem Biophys Res Commun.* 2004;325:1346-52.
150. Seshi B, Kumar S, King D. Multilineage gene expression in human bone marrow stromal cells as evidenced by single-cell microarray analysis. *Blood Cells Mol Dis.* 2003;31:268-85.
151. Müller M, Goessl C, Krause H, Miller K. Molekulare Diagnostik in der urologischen Onkologie. *Der Urologe [A]* 5 2003;42:660-668.
152. Ståhlberg A, Håkansson J, Xian X, Semb H, Kubista M. Properties of the reverse transcription reaction in mRNA quantification. *Clin Chem.* 2004;50:509-15.
153. Buell GN, Wickens MP, Payvar F, Schimke RT. Synthesis of full length cDNAs from four partially purified oviduct mRNAs. *J Biol Chem.* 1978;253:2471-82.
154. Zhang J, Byrne CD. Differential priming of RNA templates during cDNA synthesis markedly affects both accuracy and reproducibility of quantitative competitive reverse-transcriptase PCR. *Biochem J.* 1999;337:231-41.
155. Ståhlberg A, Kubista M, Pfaffl M. Comparison of reverse transcriptases in gene expression analysis. *Clin Chem.* 2004;50:1678-80.
156. Wang X, Seed B. A PCR primer bank for quantitative gene expression analysis. *Nucleic Acids Res.* 2003;31:e154.
157. Yi X, Shay JW, Wright WE. Quantitation of telomerase components and hTERT mRNA splicing patterns in immortal human cells. *Nucleic Acids Res.* 2001;29:4818-25.
158. Wilson IG. Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification. *Appl Environ Microbiol.* 1997; 63:3741-51.
159. Bustin SA. Real-time, fluorescence-based quantitative PCR: a snapshot of current procedures and preferences. *Expert Rev Mol Diagn.* 2005;5:493-8.
160. Kubista M, Andrade JM, Bengtsson M, Forootan A, Jonák J, Lind K, Sindelka R, Sjöback R, Sjögreen B, Strömbom L, Ståhlberg A, Zoric N. The real-time polymerase chain reaction. *Mol Aspects Med.* 2006;27:95-125.
161. Pérez-Novó CA, Claeys C, Speleman F, Van Cauwenberge P, Bachert C, Vandesompele J. Impact of RNA quality on reference gene expression stability. *Biotechniques.* 2005;39:52, 54, 56.
162. Tong YK, Lo YM. Diagnostic developments involving cell-free (circulating) nucleic acids. *Clin Chim Acta.* 2006;363: 187-96.
163. Mao L, Schoenberg MP, Scicchitano M, Erozan YS, Merlo A, Schwab D, Sidransky D. Molecular detection of primary bladder cancer by microsatellite analysis. *Science.* 1996;271:659-62.
164. Bryzgunova OE, Skvortsova TE, Kolesnikova EV, Starikov AV, Rykova EY, Vlassov VV, Laktionov PP. Isolation and comparative study of cell-free nucleic acids from human urine. *Ann N Y Acad Sci.* 2006;1075:334-40.
165. Stroun M, Anker P, Beljanski M, Henri J, Lederrey C, Ojha M, Maurice PA. Presence of RNA in the nucleoprotein complex spontaneously released by human lymphocytes and frog auricles in culture. *Cancer Res.* 1978; 38:3546-54.
166. Halicka HD, Bedner E, Darzynkiewicz Z. Segregation of RNA and separate packaging of DNA and RNA in apoptotic bodies during apoptosis. *Exp Cell Res.* 2000;260:248-56.
167. Holmgren L, Szeles A, Rajnavölgyi E, Folkman J, Klein G, Ernberg I, Falk KI. Horizontal transfer of DNA by the uptake of apoptotic bodies. *Blood.* 1999;93:3956-63.
168. Bergsmedh A, Szeles A, Henriksson M, Bratt A, Folkman MJ, Spetz AL, Holmgren L. Horizontal transfer of oncogenes by uptake of apoptotic bodies. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001;98:6407-11.
169. Nadano D, Sato TA. Caspase-3-dependent and -independent degradation of 28 S ribosomal RNA may be involved in the inhibition of protein synthesis during apoptosis initiated by death receptor engagement. *J Biol Chem.* 2000;275:13967-73.

6. Literaturverzeichnis

170. Del Prete MJ, Robles MS, Guáo A, Martínez-A C, Izquierdo M, Garcia-Sanz JA. Degradation of cellular mRNA is a general early apoptosis-induced event. *FASEB J.* 2002;16:2003-5.
171. Eisenberger CF, Schoenberg M, Enger C, Hortopan S, Shah S, Chow NH, Marshall FF, Sidransky D. Diagnosis of renal cancer by molecular urinalysis. *J Natl Cancer Inst.* 1999;91:2028-32.
172. Goessl C, Krause H, Müller M, Heicappell R, Schrader M, Sachsinger J, Miller K. Cancer Res. Fluorescent methylation-specific polymerase chain reaction for DNA-based detection of prostate cancer in bodily fluids. 2000;60:5941-5.
173. Jerónimo C, Usadel H, Henrique R, Silva C, Oliveira J, Lopes C, Sidransky D. Quantitative GSTP1 hypermethylation in bodily fluids of patients with prostate cancer. *Urology.* 2002;60:1131-5.
174. Utting M, Werner W, Dahse R, Schubert J, Junker K. Microsatellite analysis of free tumor DNA in urine, serum, and plasma of patients: a minimally invasive method for the detection of bladder cancer. *Clin Cancer Res* 2002;8:35-40.
175. Giacona MB, Ruben GC, Iczkowski KA, Roos TB, Porter DM, Sorenson GD. Cell-free DNA in human blood plasma: length measurements in patients with pancreatic cancer and healthy controls. *Pancreas* 1998;17:89-97.
176. Hasselmann DO, Rappl G, Tilgen W, Reinhold U. Extracellular tyrosinase mRNA within apoptotic bodies is protected from degradation in human serum. *Clin Chem* 2001;47:1488-9.
177. Tsui NB, Ng EK, Lo YMD. Stability of endogenous and added RNA in blood specimens, serum, and plasma. *Clin Chem* 2002;48:1647-53.
178. Botezatu I, Serdyuk O, Potapova G, Shelepov V, Alechina R, Molyaka Y, Ananév 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;46:1078-84.
179. Su Y, Wang M, Brenner DE., Ng A, Melkonyan H, Umansky S, Syngal S, Block TM.. Human Urine contains Small, 150 to 250 nucleotide-sized, soluble DNA derived from the circulation and may be useful in the detection of colorectal cancer. *J Mol Diagn* 2004, 6:101–107.
180. Pasloske BL, Walkerpeach CR, Obermoeller RD, Winkler M, DuBois DB. Armored RNA technology for production of ribonuclease-resistant viral RNA controls and standards. *J Clin Microbiol.* 1998;36:3590-4.
181. Cirillo G, Casalino L, Vallone D, Caracciolo A, De Cesare D, Verde P. Role of distinct mitogen-activated protein kinase pathways and cooperation between Ets-2, ATF-2, and Jun family members in human urokinase-type plasminogen activator gene induction by interleukin-1 and tetradecanoyl phorbol acetate. *Mol Cell Biol.* 1999;19:6240-52.
182. Foulds CE, Nelson ML, Blaszczyk AG, Graves BJ. Ras/mitogen-activated protein kinase signaling activates Ets-1 and Ets-2 by CBP/p300 recruitment. *Mol Cell Biol* 2004; 24: 10954-64.
183. Hsu T, Trojanowska M, Watson DK. Ets Proteins in Biological Control and Cancer. *Journal of Cellular Biochemistry* 2004;91:896-903.
184. Fowles LF, Martin ML, Nelsen L, Stacey KJ, Redd D, Clark YM, Nagamine Y, McMahon M, Hume DA, Ostrowski MC. Persistent activation of mitogen-activated protein kinases p42 and p44 and ets-2 phosphorylation in response to colony-stimulating factor 1/c-fms signaling. *Mol Cell Biol.* 1998; 18:5148-56.
185. Billerey C, Chopin D, Aubriot-Lorton MH, Ricol D, Gil Diez de Medina S, Van Rhijn B, Bralet MP, Lefrere-Belda MA, Lahaye JB, Abbou CC, Bonaventure J, Zafrani ES, van der Kwast T, Thierry JP, Radvanyi F. Frequent FGFR3 mutations in papillary non-invasive bladder (pTa) tumors. *Am. J. Pathol.* 2001;158:1955-9.
186. Knowles MA. Molecular subtypes of bladder cancer: Jekyll and Hyde or chalk and cheese? *Carcinogenesis.* 2006;27:361-73.
187. Smith JL, Schaffner AE, Hofmeister JK, Hartman M, Wei G, Forsthoefel D, Hume DA, Ostrowski MC. ets-2 is a target for an akt (Protein kinase B)/jun N-terminal kinase signalling pathway in macrophages of motheaten-viable mutant mice. *Mol Cell Biol* 2000;20:8026-34.
188. Buggy Y, Maguire TM, McDermott E, Hill ADK, O'Higgins N, Duffy MJ. Ets2 transcription factor in normal and neoplastic human breast tissue. *European Journal of Cancer* 2006;42:85-491.
189. Liebert M, Seigne J. Characteristics of invasive bladder cancer: histological and molecular markers. *Semin Urol. Oncol* 1996;14:62-72.
190. Bhuvaramurthy V, Schroeder J, Denkert C, Kristiansen G, Schnorr D, Loening SA, Jung K, Staack A. In situ gene expression of urokinase-type plasminogen activator and its receptor in transitional cell carcinoma of the human bladder. *Oncol Rep.* 2004;12:909-13.
191. Weikert S, Krause H, Wolff I, Christoph F, Schrader M, Emrich T, Miller K, Müller M. Quantitative evaluation of telomerase subunits in urine as biomarkers for noninvasive detection of bladder cancer. *Int J Cancer* 2005;117:274-80.
192. Christoph F, Muller M, Schostak M, Soong R, Tabiti K, Miller K. Quantitative detection of cytokeratin 20 mRNA expression in bladder carcinoma by real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *Urology* 2004;64:157-61.
193. Schultz IJ, Kiemeny LA, Willems JL, Swinkels DW, Witjes JA, de Kok JB. Survivin and MKI67 mRNA expression in bladder washings of patients with superficial urothelial cell carcinoma correlate with tumor stage and grade but do not predict tumor recurrence. *Clin Chem* 2006;52:1440-2.

6. Literaturverzeichnis

194. Weikert S, Christoph F, Schrader M, Krause H, Miller K, Muller M. Quantitative analysis of survivin mRNA expression in urine and tumor tissue of bladder cancer patients and its potential relevance for disease detection and prognosis. *Int J Cancer* 2005;116:100-4.
195. Lokeshwar VB, Habuchi T, Grossman HB, Murphy WM, Hautmann SH, Hemstreet GP 3rd, Bono AV, Getzenberg RH, Goebell P, Schmitz-Dräger BJ, Schalken JA, Fradet Y, Marberger M, Messing E, Droller MJ. Bladder tumor markers beyond cytology: International Consensus Panel on bladder tumor markers. *Urology*. 2005;66:35-63.
196. Nakamura TM, Morin GB, Chapman KB, Weinrich SL, Andrews WH, Lingner J, Harley CB, Cech TR. Telomerase catalytic subunit homologs from fission yeast and human. *Science* 1997;277:955-9.
197. de Kok JB, van Balken MR, Ruers TJ, Swinkels DW, Klein Gunnewiek JM. Clin Chem. Detection of telomerase activity in urine as a tool for noninvasive detection of recurrent bladder tumors is poor and cannot be improved by timing of sampling. 2000;46:2014-5.
198. Bialkowska-Hobrzanska H, Bowles L, Bukala B, Joseph MG, Fletcher R, Razvi H. Comparison of human telomerase reverse transcriptase messenger RNA and telomerase activity as urine markers for diagnosis of bladder carcinoma. *Mol Diagn*. 2000;5:267-77.
199. Neves M, Ciofu C, Larousserie F, Fleury J, Sibony M, Flahault A, Soubrier F, Gattegno B. Prospective evaluation of genetic abnormalities and telomerase expression in exfoliated urinary cells for bladder cancer detection. *J Urol*. 2002;167:1276-81.
200. Melissourgous N, Kastrinakis NG, Davilas I, Foukas P, Farmakis A, Lykourinas M. Detection of human telomerase reverse transcriptase mRNA in urine of patients with bladder cancer: evaluation of an emerging tumor marker. *Urology*. 2003;62:362-7.
201. Bowles L, Bialkowska-Hobrzanska H, Bukala B, Nott L, Razvi H. A prospective evaluation of the diagnostic and potential prognostic utility of urinary human telomerase reverse transcriptase mRNA in patients with bladder cancer. *Can J Urol* 2004;11:2438-44.
202. Ito H, Kyo S, Kanaya T, Takakura M, Koshida K, Namiki M, Inoue M. Detection of human telomerase reverse transcriptase messenger RNA in voided urine samples as a useful diagnostic tool for bladder cancer. *Clin Cancer Res*. 1998;4:2807-10.
203. Akhtar M, Gallagher L, Rohan S. Survivin: role in diagnosis, prognosis, and treatment of bladder cancer. *Adv Anat Pathol*. 2006;13:122-6.
204. Ambrosini G, Adida C, Altieri DC. A novel anti-apoptosis gene, survivin, expressed in cancer and lymphoma. *Nat Med*. 1997;3:917-21.
205. Altieri DC. Survivin, versatile modulation of cell division and apoptosis in cancer. *Oncogene*. 2003;22:8581-9.
206. Smith SD, Wheeler MA, Plescia J, Colberg JW, Weiss RM, Altieri DC. Urine detection of survivin and diagnosis of bladder cancer. *JAMA*. 2001;285:324-8.
207. Schultz IJ, Kiemeny LA, Karthaus HF, Witjes JA, Willems JL, Swinkels DW, Gunnewiek JM, de Kok JB. Survivin mRNA copy number in bladder washings predicts tumor recurrence in patients with superficial urothelial cell carcinomas. *Clin Chem*. 2004;50:1425-8.
208. Liou LS. Urothelial cancer biomarkers for detection and surveillance. *Urology*. 2006;67(Suppl 3A):25-34
209. Oge O, Atsü N, Sahin A, Ozen H. Comparison of BTA stat and NMP22 tests in the detection of bladder cancer. *Scand J Urol Nephrol*. 2000;34:349-51.
210. Zimmerman RL, Bagley D, Hawthorne C, Bibbo M. Utility of the Bard BTA test in detecting upper urinary tract transitional cell carcinoma. *Urology*. 1998;51:956-8.
211. Mariappan P, Smith G. A surveillance schedule for G1Ta bladder cancer allowing efficient use of check cystoscopy and safe discharge at 5 years based on a 25-year prospective database. *J Urol*. 2005;173:1108-11.
212. Nam RK, Redelmeier DA, Spiess PE, Sampson HA, Fradet Y, Jewett MA. Comparison of molecular and conventional strategies for followup of superficial bladder cancer using decision analysis. *J Urol*. 2000;163:752-7.
213. Lewis BP, Burge CB, Bartel DP. Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell*. 2005;120:15-20.
214. Vom Dorp F, Kausch I, Jocham D. Diagnostik des nichtinvasiven Harnblasenkarzinoms. *Deutsches Ärzteblatt* 2007;104:A797-A802.
215. Kaubisch S, Lum BL, Reese J, Freiha F, Torti FM. Stage T1 bladder cancer grade is primary determinant for risk of muscle invasion. *J Urol* 1991; 146:28.
216. Böhle A, Bock PR. Intravesical bacille Calmette-Guérin versus mitomycin C in superficial bladder cancer: formal meta-analysis of comparative studies on tumor progression. *Urology* 2004;63:682-686.
217. Duggan BJ, Gray S, Johnston SR, Williamson K, Miyaki H, Gleave M. The role of antisense oligonucleotides in the treatment of bladder cancer. *Urol Res*. 2002; 30: 137-147.
218. Shabbits, JA, Hu Y, Mayer LD. Tumor Chemosensitization Strategies Based on Apoptosis Manipulations. *Mol Cancer Therapeutics* 2003; 2:805-813.
219. Fuessel S, Meye A, Kraemer K, Kunze D, Hakenberg OW, Wirth MP. Synthetic nucleic acids as potential therapeutic tools for treatment of bladder carcinoma. *Eur Urol*. 2007;51:315-26.
220. Landen CN Jr, Chavez-Reyes A, Bucana C, Schmandt R, Deavers MT, Lopez-Berestein G, Sood AK. Therapeutic EphA2 gene targeting in vivo using neutral liposomal small interfering RNA delivery. *Cancer Res*. 2005;65:6910-8.

6. Literaturverzeichnis

221. Nogawa M, Yuasa T, Kimura S, Tanaka M, Kuroda J, Sato K, Yokota A, Segawa H, Toda Y, Kageyama S, Yoshiki T, Okada Y, Maekawa T. Intravesical administration of small interfering RNA targeting PLK-1 successfully prevents the growth of bladder cancer. *J Clin Invest.* 2005;115:978-85.
222. Okada H, Mak TW. Pathways of apoptotic and non-apoptotic death in tumour cells. *Nat Rev Cancer.* 2004;4:592-603.
223. Zeh HJ 3rd, Lotze MT. Addicted to death: invasive cancer and the immune response to unscheduled cell death. *J Immunother.* 2005;28:1-9.
224. Zhou G, Mo WJ, Sebbel P, Min G, Neubert TA, Glockshuber R, Wu XR, Sun TT, Kong XP. Uroplakin Ia is the urothelial receptor for uropathogenic *Escherichia coli*: evidence from in vitro FimH binding. *J Cell Sci.* 2001;114:4095-103.
225. Martinez JJ, Mulvey MA, Schilling JD, Pinkner JS, Hultgren SJ. Type 1 pilus-mediated bacterial invasion of bladder epithelial cells. *EMBO J.* 2000;19:2803-12.
226. Mulvey MA, Lopez-Boado YS, Wilson CL, Roth R, Parks WC, Heuser J, Hultgren SJ. Induction and evasion of host defenses by type 1-piliated uropathogenic *Escherichia coli*. *Science.* 1998;282:1494-7.
227. Tamura K, Yoshie M, Hara T, Isaka K, Kogo H. Involvement of stathmin in proliferation and differentiation of immortalized human endometrial stromal cells. *J Reprod Dev.* 2007;53:525-33.
228. Alli E, Yang JM, Hait WN. Silencing of stathmin induces tumor-suppressor function in breast cancer cell lines harboring mutant p53. *Oncogene* 2007;26:1003-12.
229. Sobel A, Bouterin MC, Beretta H, Chneiweiss VD, Peyro-Saint-Paul et al.. Intracellular substrates for extracellular signaling. Characterization of a ubiquitous, neuron-enriched phosphoprotein (stathmin). *J Biol Chem* 1989;264:3765-3772.
230. Curmi PA, Noguès C, Lachkar S, Carelle N, Gonthier MP, Sobel A, Lidereau R, Bièche I. Overexpression of stathmin in breast carcinomas points out to highly proliferative tumours. *Br J Cancer.* 2000;82:142-50.
231. Rubin CI, Atweh GF. The role of stathmin in the regulation of the cell cycle. *Journal of Cellular Biochemistry* 2004;93:242-250
232. Marklund U, Larsson N, Melander GH, Brattsand G, Gullberg M. Oncoprotein 18 is a phosphorylation-responsive regulator of microtubule dynamics. *EMBO J* 1996;15:5290-5298.
233. Brattsand G, Marklund U, Nylander K, Roos G, Gullberg M. Cell-cycle-regulated phosphorylation of oncoprotein 18 on Ser16, Ser25 and Ser38. *Eur J Biochem.* 1994;220:359-68.
234. Luo XN, Mookerjee B, Ferrari A, Mistry S, Atweh GF. Regulation of phosphoprotein p18 in leukemic cells. Cell cycle regulated phosphorylation by p34cdc2 kinase. *J Biol Chem.* 1994;269:10312-8.
235. Marklund U, Larsson N, Melander GH, Brattsand G, Gullberg M. Oncoprotein 18 is a phosphorylation-responsive regulator of microtubule dynamics. *EMBO J* 1996;15:5290-5298.
236. Iancu C, Mistry SJ, Arkin S, Wallenstein S, Atweh GF. Effects of stathmin inhibition on the mitotic spindle. *J Cell Sci.* 2001;114:909-16.
237. Stiewe T. The p53 family in differentiation and tumorigenesis. *Nat Rev Cancer* 2007;7:165-68.
238. Vousden KH and Lu X. Live or let die: the cell's response to p53. *Nat Rev Cancer* 2002;2:594-604.

7. Anhang

7.1 RT-qPCR-basierte Analyse der miRNA-Zusammensetzung im Urin von Harnblasenkarzinompatienten

In der folgenden Tabelle sind die Ergebnisse der RT-qPCR-Arrays dargestellt. Aufgeführt sind die Ct-Werte von 157 verschiedenen miRNAs aus gepoolten Urinproben der verschiedenen Spendergruppen (1. gesunde Donoren, 2. Patienten mit einem G1-Harnblasenkarzinom, 3. Patienten mit einem G2-, G3-Harnblasenkarzinom, 4. Patienten mit einer Harnwegsinfektion). Darüber hinaus wird die relative Abundanz der miRNAs in den Gruppen 2–3 gegenüber den Kontroll-Urinen aufgeführt (farblich unterlegt). Hierbei wurde auf die interne Referenz-RNA RNUB6 normalisiert. MicroRNAs, welche zur weiteren Analyse in einzelnen Urinproben ausgewählt wurden, werden in der Tabelle durch einen Kasten hervorgehoben.

7. Anhang

Tabelle 7-1 A Ct-Werte aus der RT-qPCR-Array-basierten Amplifikation von 157 verschiedenen miRNAs im Urin (Die Legende ist in der Tabelle 7-1 B aufgeführt)

miRNA	Ct-Wert				relative Abundanz		
	Gesunde Spender	G1-Tumoren	G2- + G3-Tumoren	Infektionen	G1-Tumoren	G2- + G3-Tumoren	Infektionen
miR-9	35,80	35,94	33,73	34,40	-4,11	-2,30	-11,96
miR-9*	37,82	40,00	36,95	40,00	-3,68	-17,03	-10,70
miR-10a	32,92	33,07	33,78	35,34	-1,01	-7,62	-14,12
miR-15a	31,96	31,50	30,32	31,01	1,52	-1,35	-1,37
miR-15b	32,17	30,59	29,60	31,14	3,29	1,41	-1,29
miR-16	29,80	26,66	26,02	28,39	10,26	3,27	1,03
miR-17-3p	36,61	35,89	34,26	36,71	1,82	1,21	-2,83
miR-17-5p	36,69	31,70	30,21	33,34	3,50	21,26	3,86
miR-19a	31,63	30,48	29,29	31,42	2,45	1,21	-2,28
miR-20	32,97	30,82	30,24	32,82	4,89	1,58	-2,38
miR-21	28,57	28,14	26,28	28,50	1,48	1,16	-2,51
miR-23a	31,00	31,19	30,20	30,13	-1,04	-2,41	-1,44
miR-23b	32,34	33,50	33,33	34,08	-2,03	-8,34	-8,82
miR-25	31,90	30,09	28,63	31,33	3,86	2,30	-1,78
miR-26a	30,06	29,95	29,57	29,61	1,19	-2,99	-1,93
miR-26b	31,30	31,10	30,48	30,80	1,27	-2,38	-1,87
miR-27a	33,76	31,90	31,76	31,33	4,00	-1,05	2,04
miR-27b	31,64	32,25	31,89	32,96	-1,39	-4,99	-6,59
miR-28	34,97	35,25	34,57	35,54	-1,10	-3,18	-3,92
miR-29a	30,69	31,04	29,63	30,22	-1,16	-2,01	-1,91
miR-29b	32,23	30,58	30,36	31,61	3,46	-1,15	-1,72
miR-29c	29,68	28,92	29,09	29,83	1,87	-2,79	-2,93
miR-30a-3p	31,77	34,18	33,68	35,54	-4,82	-15,78	-36,00
miR-30b	29,36	30,40	29,91	31,21	-1,87	-6,15	-9,51
miR-30c	29,38	30,72	30,07	31,37	-2,30	-6,77	-10,48
miR-30d	30,13	30,70	29,90	32,02	-1,35	-3,58	-9,78
miR-30e	31,90	32,14	30,93	32,79	-1,07	-2,14	-4,89
miR-31	32,19	31,04	30,65	31,55	2,45	-1,66	-1,69
miR-34a	34,21	32,38	32,42	33,75	3,92	-1,21	-1,92
miR-34b	40,00	40,00	40,00	40,00	1,10	-4,20	-2,64
miR-34c	40,00	40,00	40,00	40,00	1,10	-4,20	-2,64
miR-92	31,30	29,84	28,00	31,54	3,03	2,35	-3,12
miR-95	35,97	37,43	37,76	38,51	-2,50	-14,52	-15,35
miR-96	36,20	35,40	34,27	37,99	1,92	-1,10	-9,13
miR-98	35,39	34,94	33,98	35,65	1,51	-1,58	-3,16
miR-99a	31,86	33,05	32,91	33,42	-2,07	-8,69	-7,78
miR-100	31,87	33,22	32,95	33,82	-2,31	-8,88	-10,20
miR-103	31,82	30,92	30,00	31,18	2,06	-1,19	-1,69
miR-104	40,00	40,00	40,00	40,00	1,10	-4,20	-2,64
miR-105	40,00	40,00	38,15	38,95	1,10	-1,16	-1,27
miR-106a	30,51	30,67	29,93	30,10	-1,01	-2,81	-1,99
miR-107	36,47	36,19	36,02	37,54	1,34	-3,07	-5,54
miR-122a	36,02	40,00	38,48	40,00	-14,32	-23,10	-41,64
miR-124a	37,46	40,00	39,32	40,00	-5,28	-15,24	-15,35
miR-124b	36,01	33,99	34,03	32,01	4,47	-1,06	6,06
miR-125a	31,89	30,94	31,19	33,61	2,13	-2,58	-8,69
miR-125b	30,30	32,12	31,42	32,56	-3,20	-9,13	-12,64
miR-126	37,65	33,37	31,72	37,19	21,41	14,52	-1,92
miR-127	39,70	39,51	36,52	40,00	1,26	2,16	-3,25
miR-128a	37,79	37,15	35,98	36,00	1,72	-1,20	1,31
miR-128b	40,00	39,07	36,96	38,27	2,10	1,96	1,26
miR-129	37,01	37,84	37,99	36,91	-1,61	-8,28	-2,46
miR-130a	33,15	32,18	30,02	35,06	2,16	2,08	-9,92
miR-130b	35,24	34,12	32,27	34,56	2,39	1,87	-1,65
miR-132	35,15	36,77	34,50	36,10	-2,79	-2,68	-5,10
miR-133a	40,00	40,00	34,06	39,25	1,10	14,62	-1,57
miR-133b	35,63	35,27	33,10	35,64	1,41	1,38	-2,66
miR-134	40,00	40,00	38,85	40,00	1,10	-1,89	-2,64
miR-135a	33,66	35,65	36,01	37,39	-3,61	-21,41	-35,02
miR-135b	34,22	33,67	32,90	36,59	1,61	-1,68	-13,64
miR-137	40,00	38,65	40,00	40,00	2,81	-4,20	-2,64
miR-138	36,93	36,77	36,91	40,00	1,23	-4,14	-22,16
miR-139	36,44	37,00	35,76	35,69	-1,34	-2,62	-1,57
miR-140	33,63	34,48	33,16	32,58	-1,64	-3,03	-1,27
miR-141	31,49	30,33	30,13	32,06	2,46	-1,64	-3,92
miR-142-3p	29,08	30,02	27,68	27,34	-1,74	-1,59	1,27
miR-142-5p	32,77	33,97	32,37	31,43	-2,08	-3,18	-1,04
miR-144	40,00	40,00	36,74	40,00	1,10	2,28	-2,64
miR-145	33,92	36,11	33,04	31,94	4,14	-2,28	1,49
miR-146	34,30	33,88	31,81	33,02	1,47	1,34	-1,09
miR-147	40,00	40,00	40,00	40,00	1,10	-4,20	-2,64
miR-148a	31,98	31,92	31,41	31,48	1,15	-2,83	-1,87
miR-149	34,65	34,14	33,49	36,89	1,57	-1,88	-12,47
miR-150	36,76	33,84	32,15	35,02	8,34	5,82	1,27
miR-151	34,71	33,79	32,87	36,43	2,08	-1,17	-8,69
miR-152	34,90	35,90	34,60	40,00	-1,82	-3,41	-90,51
miR-154	39,29	40,00	40,00	40,00	-1,48	-6,87	-4,32
miR-154*	40,00	40,00	40,00	40,00	1,10	-4,20	-2,64
miR-155	37,31	40,00	37,06	40,00	-5,86	-3,53	-17,03
miR-181a	34,02	34,18	32,47	33,90	-1,01	-1,43	-2,43
miR-181b	33,59	34,68	32,85	34,09	-1,93	-2,51	-3,73
miR-181c	37,63	37,08	36,71	37,91	1,61	-2,22	-3,20
miR-182	37,22	33,27	32,50	36,83	17,03	6,28	-2,01

7. Anhang

Tabelle 7-1 B Ct-Werte aus der RT-qPCR-Array-basierten Amplifikation von 157 verschiedenen miRNAs im Urin

miRNA	Ct-Wert			relative Abundanz			
	Gesunde Spender	G1-Tumoren	G2 + G3-Tumoren	G1-Tumoren	G2 + G3-Tumoren	Infektionen	
miR-182*	40,00	40,00	37,88	40,00	1,10	1,04	-2,64
miR-183	40,00	36,74	36,05	40,00	10,56	3,68	2,64
miR-184	36,96	40,00	40,00	40,00	-7,46	-34,54	-21,71
miR-185	36,68	34,64	32,83	36,14	4,53	3,43	-1,82
miR-186	32,59	32,55	31,50	32,52	1,13	-1,97	-2,51
miR-187	36,93	36,06	34,91	38,26	2,01	-1,04	-6,63
miR-189	40,00	40,00	40,00	40,00	1,10	-4,20	-2,64
miR-190	38,44	40,00	37,76	40,00	-2,68	-2,62	-7,78
miR-191	30,69	30,32	29,21	30,10	1,42	-1,51	-1,75
miR-193	38,49	37,70	34,73	37,64	1,91	3,23	-1,46
miR-194	30,57	32,58	31,63	34,20	3,66	-8,75	-32,67
miR-195	35,29	32,58	32,37	34,70	7,21	1,803	-1,75
miR-197	32,45	33,82	31,32	31,89	-2,35	-1,92	-1,79
miR-198	40,00	38,13	36,91	37,88	4,03	2,03	1,65
miR-199a	40,00	37,38	36,67	40,00	6,77	2,39	2,64
miR-199a*	34,98	36,08	32,27	33,31	-1,95	1,56	1,21
miR-199b	37,05	37,51	36,88	35,34	-1,25	3,73	2,64
miR-199s	40,00	37,43	34,88	40,00	6,54	8,28	2,64
miR-200a	30,80	30,54	29,65	32,52	1,32	-1,89	-8,69
miR-200b	31,63	31,13	30,40	33,20	1,56	-1,79	-7,84
miR-200c	30,82	29,79	29,32	31,64	2,25	-1,48	-4,66
miR-203	29,60	30,48	30,78	29,85	-1,67	-9,51	-3,14
miR-204	26,33	25,81	26,61	25,92	1,58	-5,10	-1,99
miR-205	30,12	28,93	28,19	30,39	2,51	-1,10	-3,18
miR-210	32,34	31,50	30,05	33,05	1,97	1,16	-4,32
miR-211	33,12	34,99	34,70	35,03	-3,32	-12,55	-9,92
miR-213	40,00	36,62	40,00	39,19	11,47	4,20	-1,51
miR-214	36,10	36,96	34,60	36,98	-1,65	-1,48	-4,86
miR-215	34,72	35,16	35,02	36,77	-1,23	-5,17	-10,93
miR-216	39,15	40,00	40,00	40,00	-1,64	-7,57	-4,76
miR-218	35,38	36,16	36,01	37,47	-1,56	-6,50	-11,24
miR-219	40,00	40,00	40,00	40,00	1,10	-4,20	-2,64
miR-220	35,93	33,23	32,72	34,49	7,16	2,20	1,03
miR-221	32,59	33,44	32,18	33,58	-1,64	-3,16	-5,24
miR-222	32,56	32,52	32,18	32,75	1,13	-3,23	-3,01
miR-223	25,28	27,45	25,44	24,53	-4,08	-4,69	-1,57
miR-224	34,54	36,32	34,65	36,67	-3,12	4,53	-11,55
miR-226	37,39	36,01	34,43	37,09	2,87	1,85	-2,14
miR-296	40,00	40,00	38,40	40,00	1,10	-1,39	-2,64
miR-299	35,06	34,94	33,16	34,90	1,20	-1,13	-2,36
miR-301	40,00	40,00	38,67	40,00	1,10	-1,67	-2,64
miR-302a	40,00	40,00	40,00	40,00	1,10	-4,20	-2,64
miR-302b	37,80	40,00	39,35	40,00	-4,17	-12,30	-12,13
miR-302b*	40,00	40,00	40,00	40,00	1,10	-4,20	-2,64
miR-302c	36,00	34,96	34,02	36,22	2,27	-1,06	-3,07
miR-302d	40,00	40,00	40,00	40,00	1,10	-4,20	-2,64
miR-320	32,00	30,88	29,76	31,69	2,39	1,13	-2,13
miR-323	38,92	40,00	40,00	40,00	-1,92	-8,88	-5,58
miR-324-5p	33,68	33,76	32,20	35,46	1,04	-1,51	-9,06
miR-325	40,00	40,00	37,81	40,00	1,10	1,09	-2,64
miR-326	38,30	40,00	36,61	38,12	-2,95	-1,30	-2,33
miR-328	34,73	35,99	34,13	35,51	-2,17	-2,77	-4,53
miR-330	36,29	38,48	36,60	37,02	-4,14	-5,21	-4,38
miR-331	32,07	32,12	31,49	32,44	1,06	-2,81	-3,41
miR-335	34,77	34,79	33,31	35,75	1,09	-1,53	-5,21
miR-337	40,00	40,00	33,93	38,84	1,10	16,00	-1,18
miR-338	34,36	34,83	32,27	32,40	-1,26	1,01	1,47
miR-339	35,44	35,58	33,17	35,65	1,00	1,15	3,05
miR-340	38,46	40,00	36,87	37,73	-2,64	-1,39	-1,59
miR-342	33,04	33,49	31,82	33,81	-1,24	-1,80	-4,50
miR-367	40,00	40,00	39,57	40,00	1,10	-3,12	-2,64
miR-368	40,00	40,00	40,00	40,00	1,10	-4,20	-2,64
miR-370	40,00	38,02	35,33	40,00	4,35	6,06	2,64
miR-371	31,11	31,90	33,28	32,15	-1,57	-18,90	-5,43
miR-372	40,00	40,00	40,00	40,00	1,10	-4,20	-2,64
miR-373	40,00	39,55	39,61	39,38	1,51	-3,20	-1,72
miR-373*	40,00	40,00	40,00	40,00	1,10	-4,20	-2,64
miR-374	35,87	35,14	34,29	35,71	1,83	-1,40	-2,36
let-7a	31,84	30,67	30,30	32,19	2,55	-1,45	-3,60
let-7b	30,30	29,69	28,85	31,52	1,68	-1,54	-6,15
let-7d	31,05	29,33	28,69	31,81	3,63	1,22	-4,47
let-7e	36,25	36,07	36,00	40,00	1,25	-3,53	-35,51
let-7g	33,55	31,48	30,98	33,59	4,63	1,41	-2,71
let-7i	33,02	31,86	30,85	33,51	2,46	1,07	-3,71

> 2-fach erniedrigte Abundanz
< 2-fach erhöhte bzw. erniedrigte miRNA Abundanz
> 2-fach erhöhte miRNA Abundanz

7.2 Charakteristika entworfener qPCR-Amplikons

Die folgenden Abbildungen fassen die Charakteristika verwendeter qPCR-Amplikons zusammen.

Abb. T-1 bis T-8 und R1-R10

Entwurf und Charakterisierung von qPCR-Amplikons. (A) In der oberen Bildhälfte ist der chromosomale Abschnitt des entsprechenden Gens mit der Verteilung von Exons und Introns dargestellt (für die 18S rRNA sowie RNA_{LUC} entfällt diese Abbildung; für RNA_{LUC} wird stattdessen das verwendete Plasmid abgebildet). In der mittleren Bildhälfte ist die nach der Transkription der DNA vorliegende mRNA abgebildet. In der unteren Bildhälfte werden die entworfene qPCR-Amplikons, bestehend aus *forward* und *reverse* Primer sowie der TaqMan®-Sonde (entfällt bei der Verwendung von SYBR®Green I) dargestellt. Die Sequenzen werden jeweils in der 5'-3'-Richtung präsentiert.

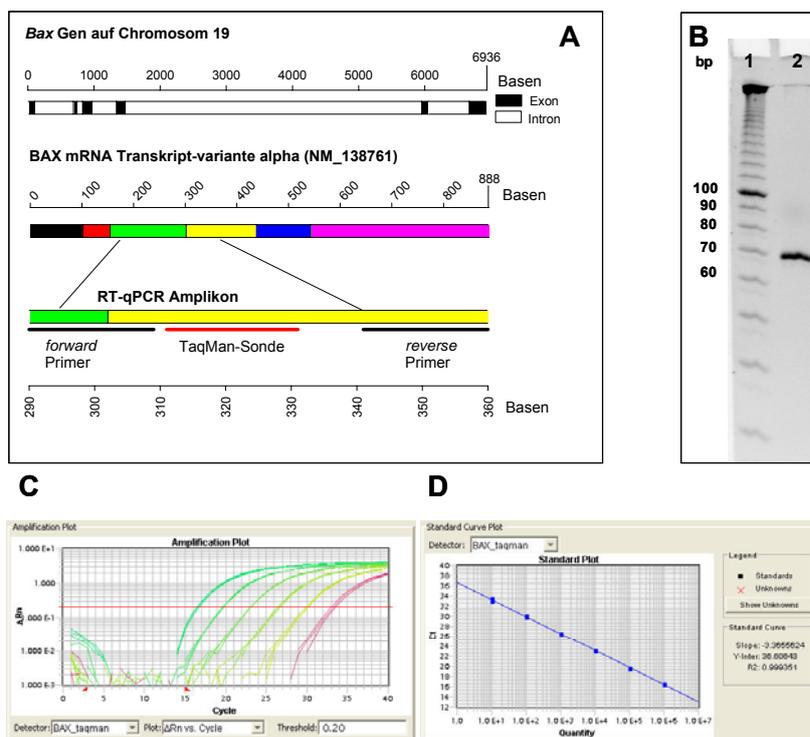
(B) Darstellung der PCR-Produkte nach der Amplifikation der mRNA über RT-qPCR anhand einer nativen Agarosegel- oder Polyacrylamidgelelektrophorese (neben dem DNA-Größenmarker sind die entsprechenden Fragmentlängen angegeben). Im Fall der Verwendung von SYBR®Green I als Fluoreszenzreporter werden unter **(B)** die Dissoziationskurven der PCR-Produkte dargestellt.

(C) Amplifikationsplots nach dem Lauf der qPCR. Dargestellt ist die normalisierte Fluoreszenz *versus* der Anzahl gefahrener qPCR-Zyklen. Die Kurven gehen aus Triplikaten oder Duplikaten der Amplifikationen von fünf oder sechs seriellen Verdünnungen des qPCR-Standards hervor. Die rote Linie repräsentiert den Schwellenwert bei normalisierter Fluoreszenz, welcher zur Berechnung der Ct-Werte diene.

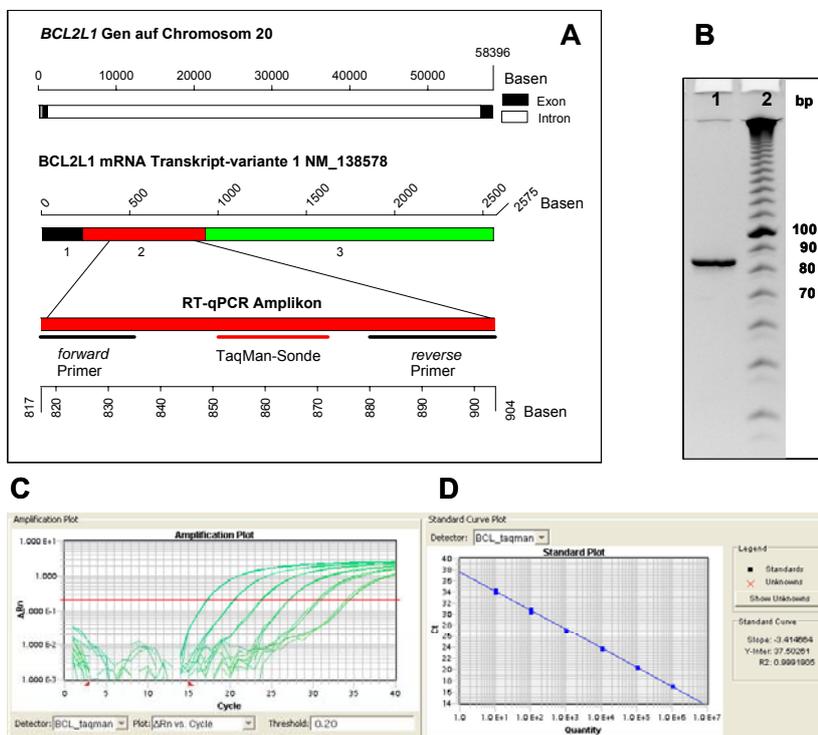
(D) Abbildung der Standardkurven für die absolute Quantifizierung. Hierbei wurden die aus der Abb. **(C)** resultierenden Ct-Werte (y-Ordinate) gegen die eingesetzten Kopienzahlen des qPCR-Standards (x-Ordinate) aufgetragen.

7.2.1 qPCR-Amplikons der mRNA-Tumormarker

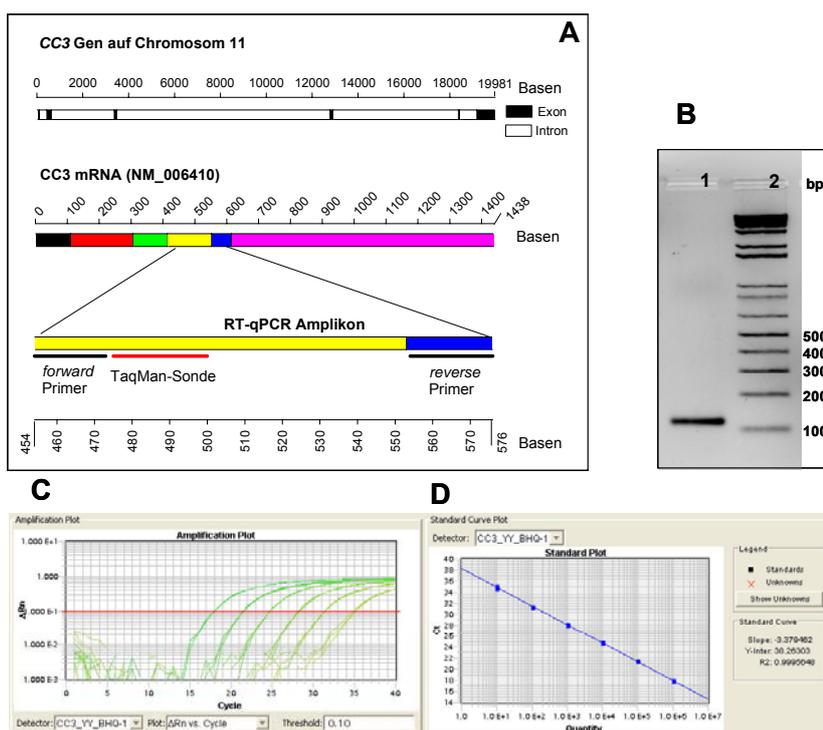
T-1 Amplikon für BAX mRNA



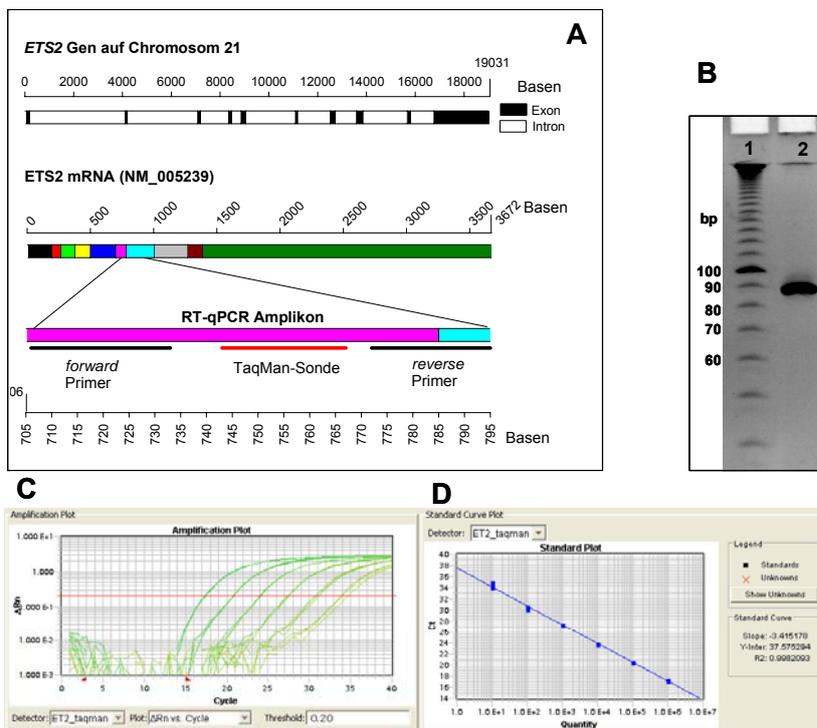
T-2 Amplikon für BCL2L1 mRNA



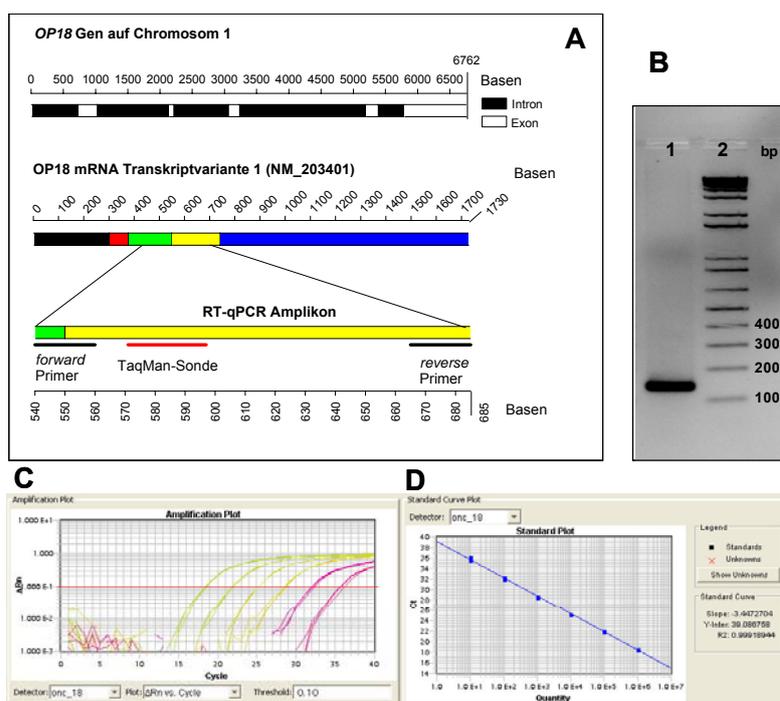
T-3 Amplikon für CC3 mRNA



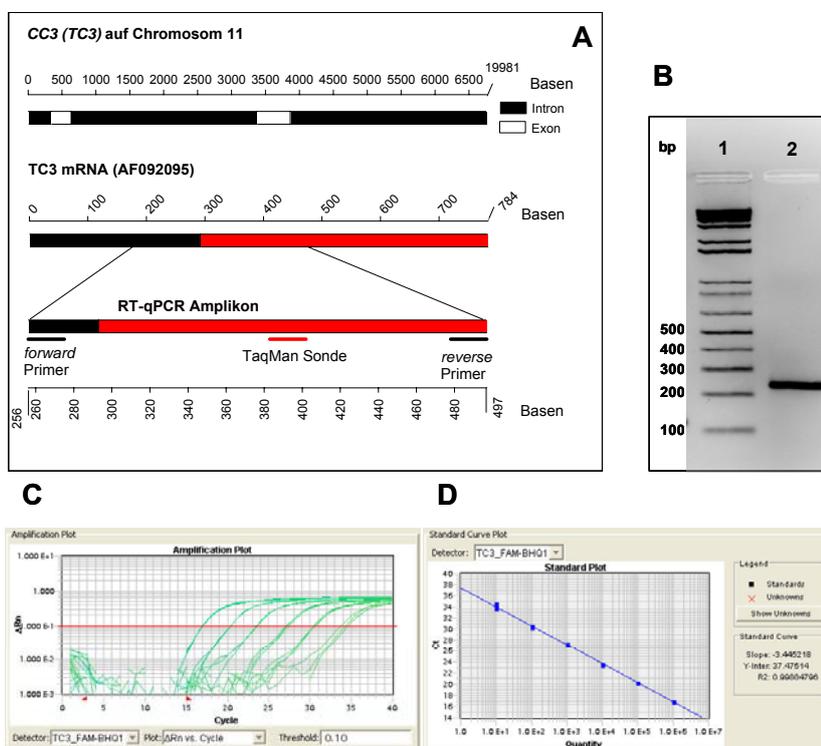
T-4 Amplikon für ETS2 mRNA



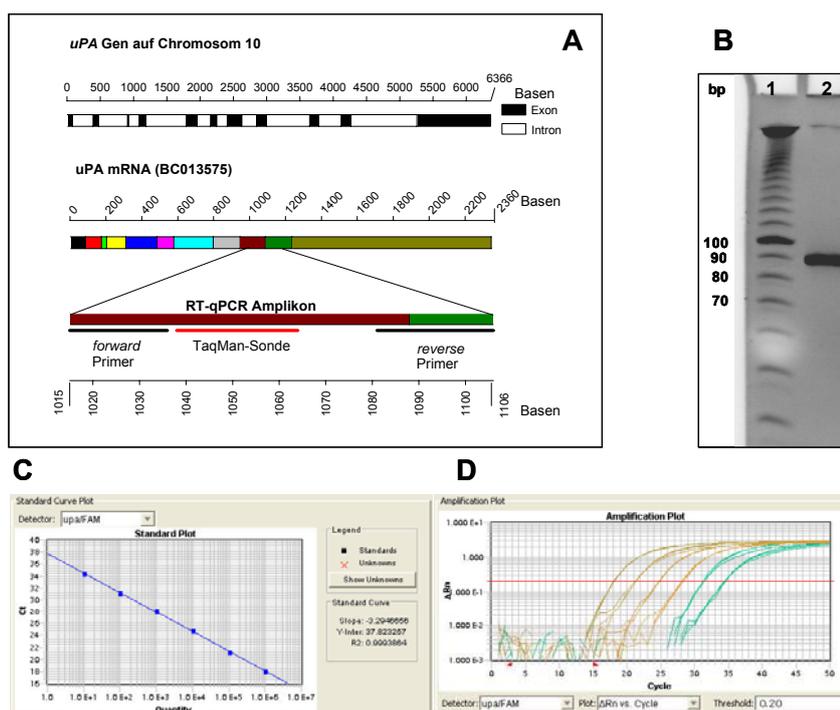
T-5 Amplikon für OP18 mRNA



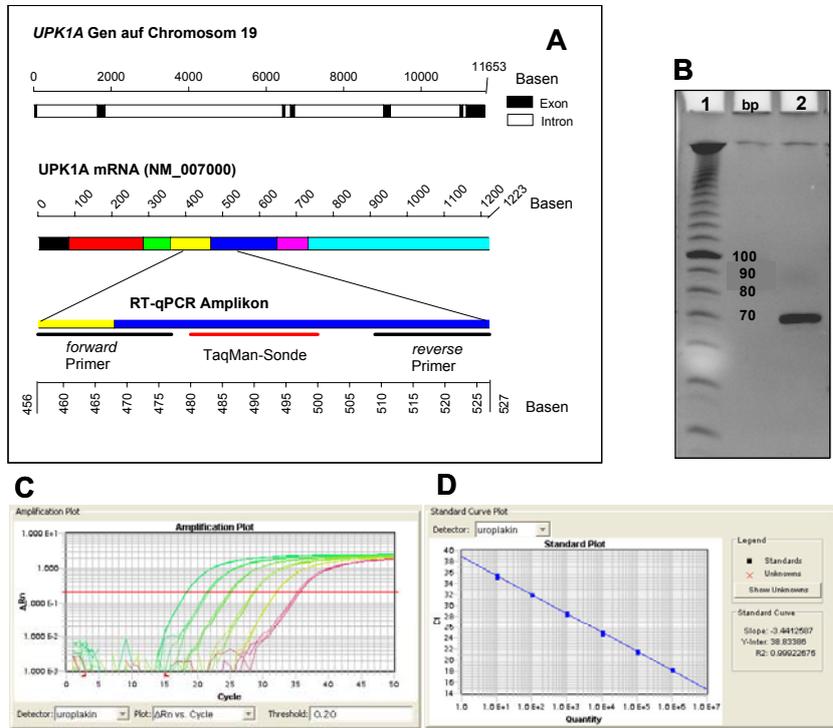
T-6 Amplikon für TC3 mRNA



T-7 Amplikon für uPA mRNA

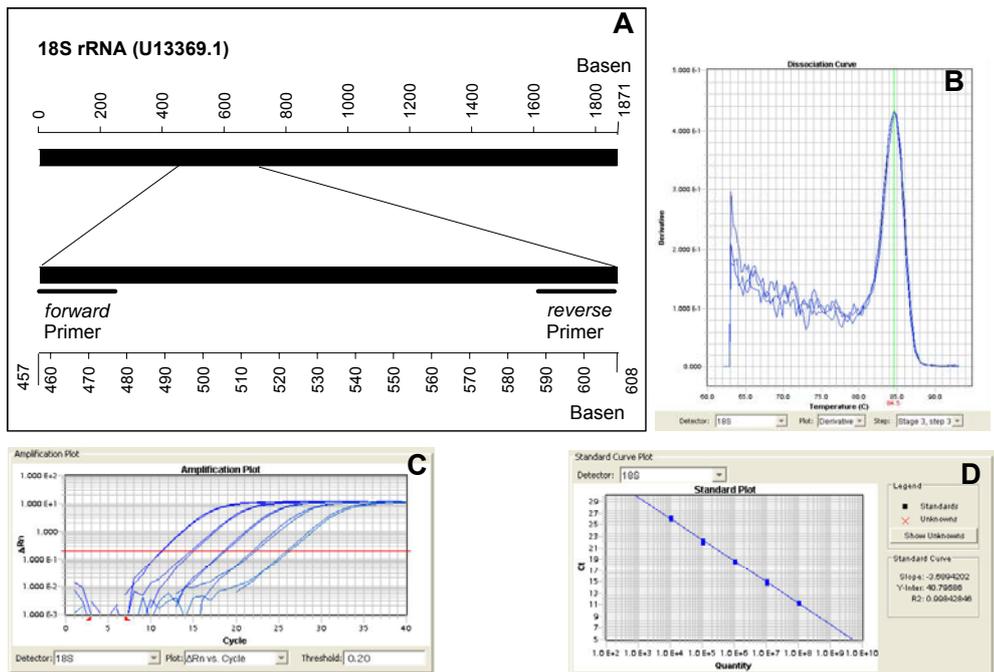


T-8 Amplikon für UPK1A mRNA

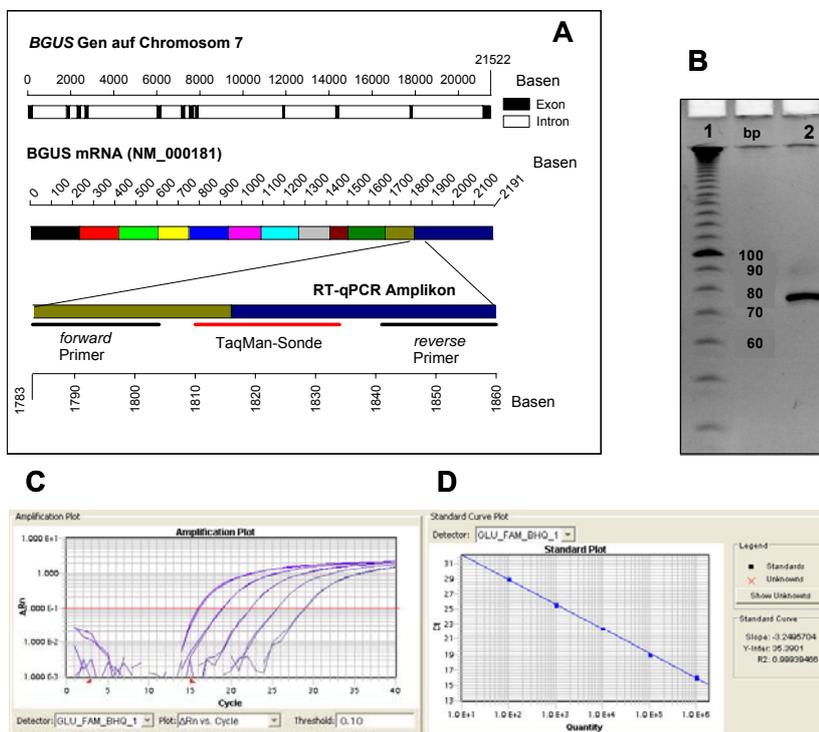


7.2.2 qPCR-Amplikons der Referenz-RNAs

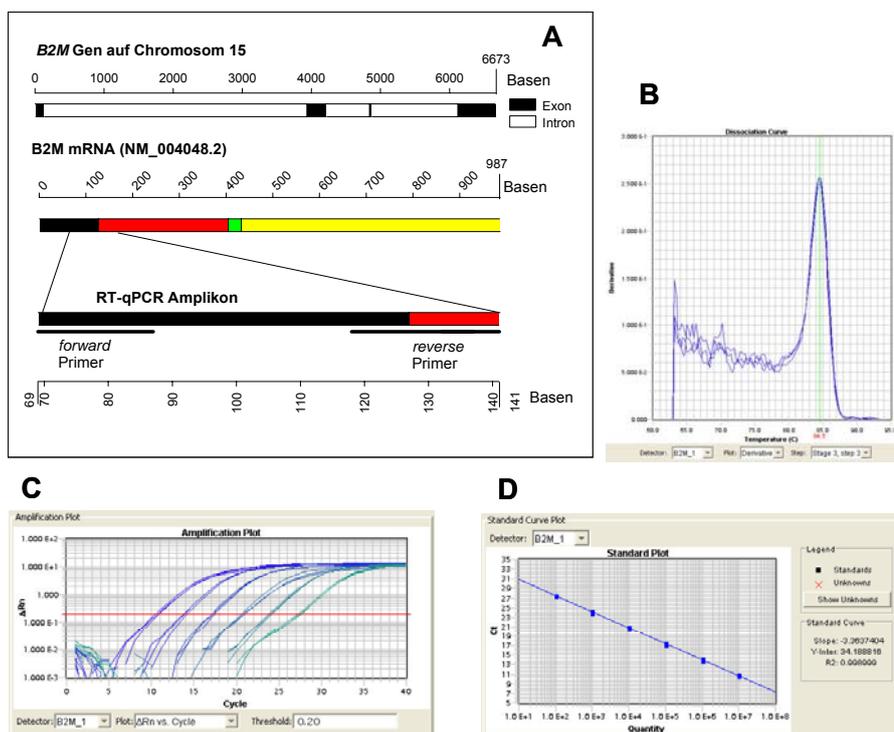
R-1 Amplikon für 18S rRNA



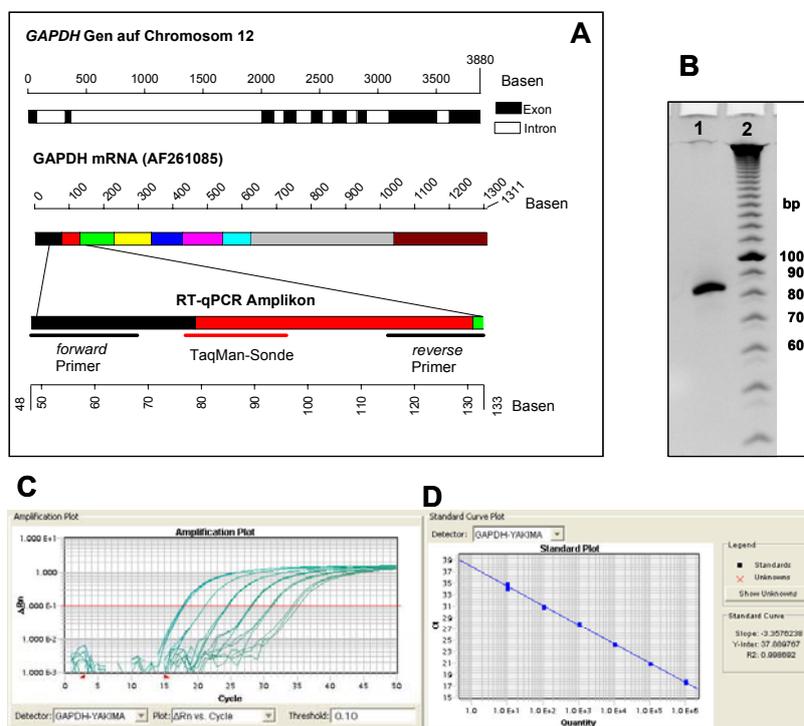
R-2 Amplikon für BGUS mRNA



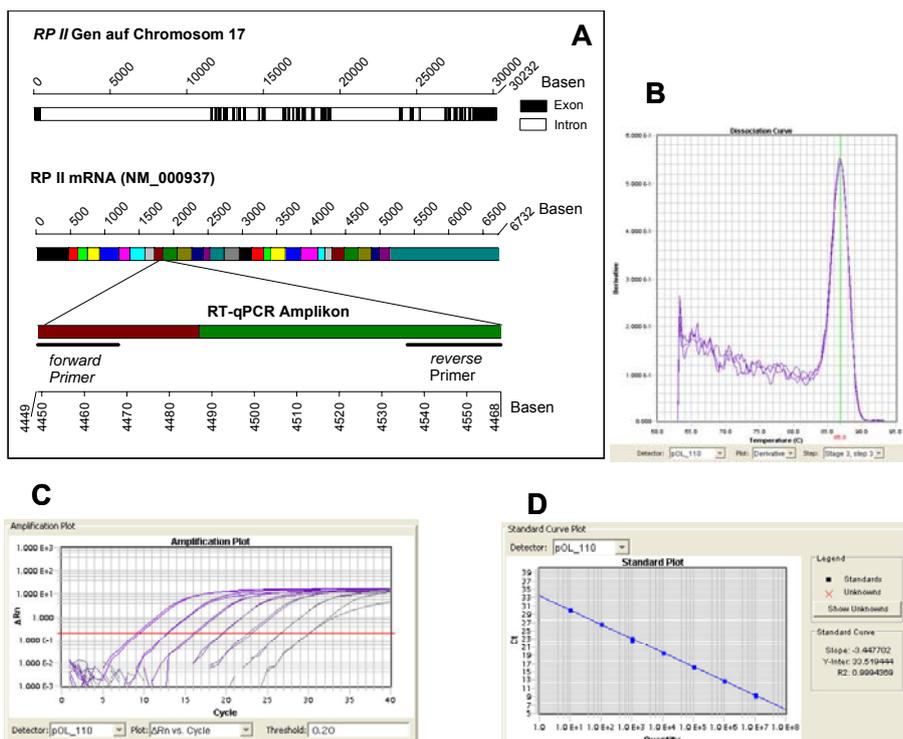
R-3 Amplikon für B2M mRNA



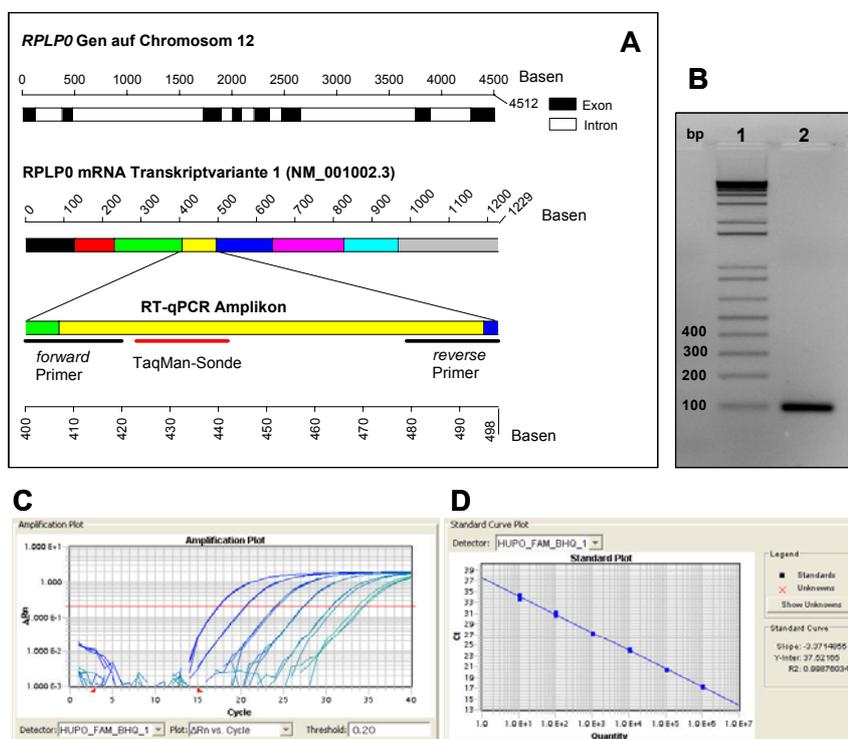
R-4 Amplikon für GAPDH mRNA



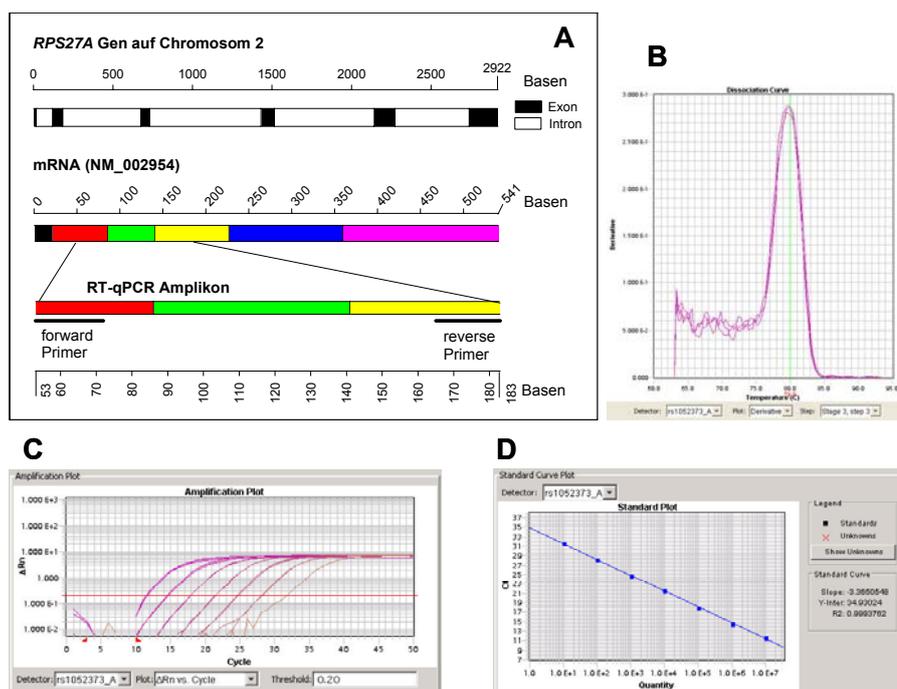
R-5 Amplikon für RP II mRNA



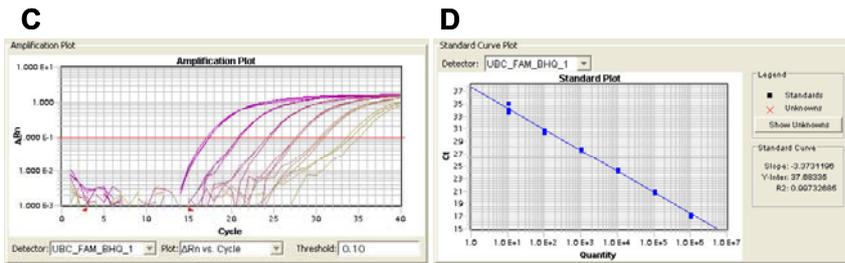
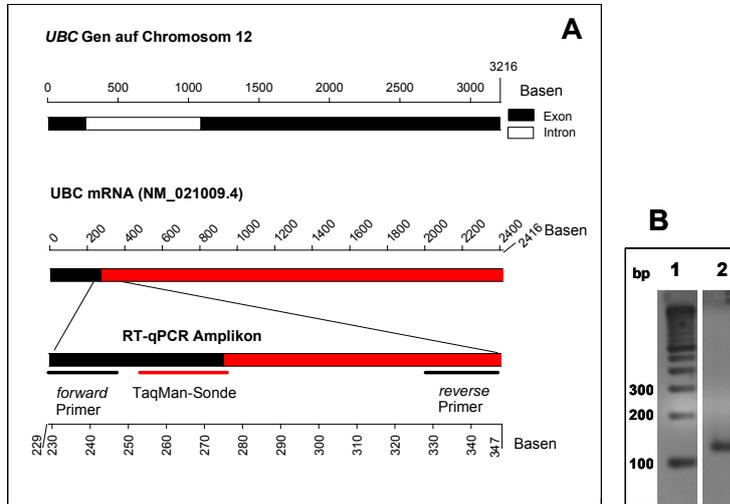
R-6 Amplikon für RPLP0 mRNA



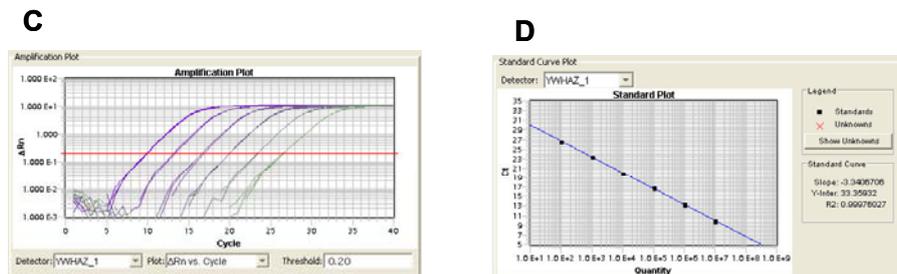
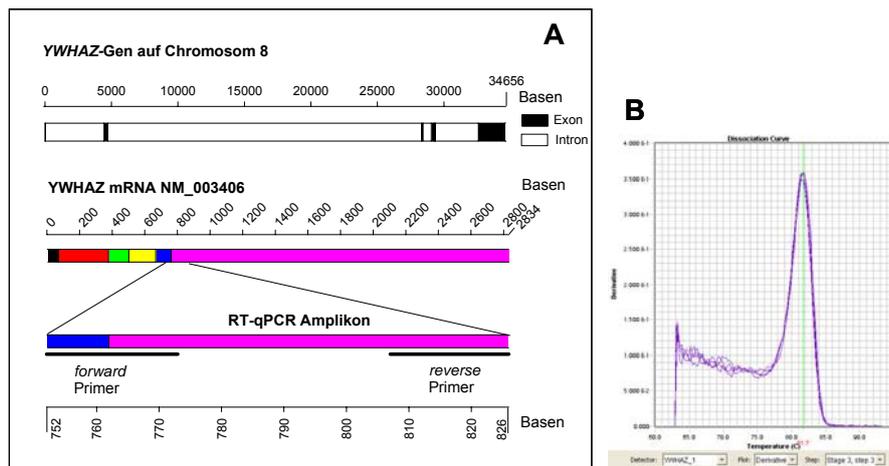
R-7 Amplikon für RPS27A mRNA



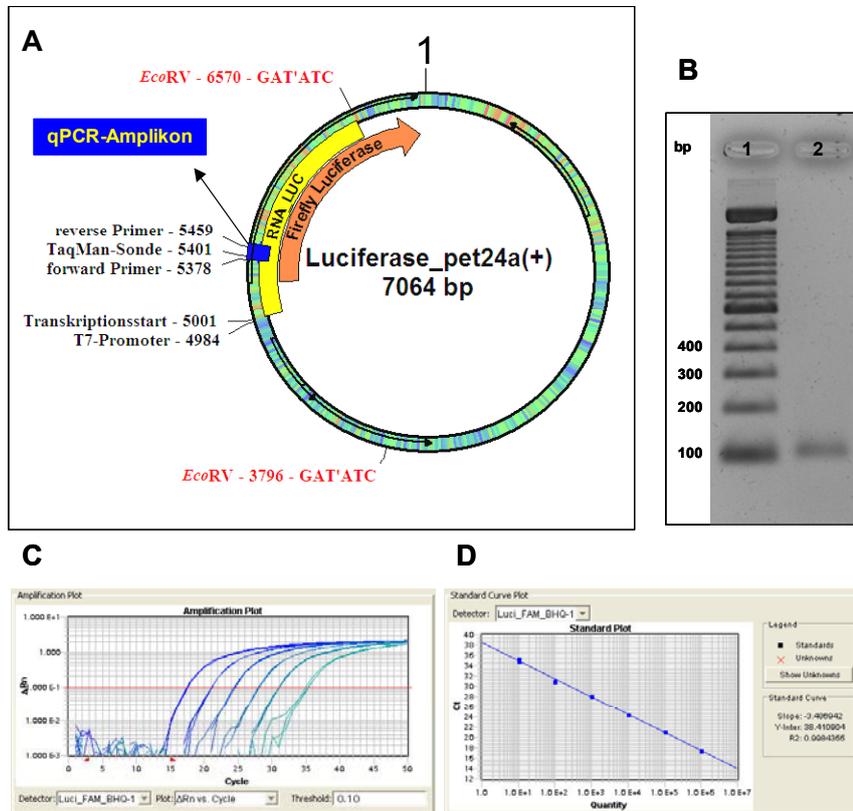
R-8 Amplikon für UBC mRNA



R-9 Amplikon für YWHAZ mRNA



R-10 Amplikon für RNA_{LUC} RNA



7.3 Diagnostische Aussagekraft Urin-assoziiertes mRNA-Tumormarker

Die diagnostische Aussagekraft Urin-assoziiertes mRNA-Tumormarker-Ratios (Abschnitt 3.2.2) wurde über ROC-Analysen ermittelt. Die aus der Analyse hervorgegangenen AUCs werden in der Tabelle 7-2 aufgelistet.

Tabelle 7-2 AUCs untersuchter RNA-Tumormarker-Ratios im Gesamturin von 37 gesunden Spendern und 61 Patienten mit einem Harnblasenkarzinom

mRNA-Ratio	AUC	Asymptotisches Konfidenzintervall, 95%	
		Untere Grenze	Obere Grenze
ETS2/uPA	0,929	0,882	0,976
ETS2/CC3	0,757	0,657	0,857
ETS2/BAX	0,755	0,656	0,853
ETS2/BCL2L1	0,727	0,622	0,832
ETS2/UPK1A	0,665	0,556	0,773
Ki-67/uPA	0,657	0,546	0,768
Ki-67/BCL2L1	0,643	0,528	0,758
ETS2/OP18	0,638	0,520	0,756
ETS2/GAPDH	0,638	0,527	0,750
Ki-67/CC3	0,627	0,509	0,746
Ki-67/UPK1A	0,625	0,511	0,738
Ki-67/OP18	0,614	0,494	0,733
OP18/UPK1A	0,590	0,478	0,702
CC3/uPA	0,588	0,473	0,704
OP18/BAX	0,576	0,463	0,690
OP18/uPA	0,575	0,459	0,691
OP18/CC3	0,574	0,460	0,689
Ki-67/GAPDH	0,572	0,450	0,693
BAX/uPA	0,570	0,455	0,686
OP18/BCL2L1	0,564	0,450	0,679
CC3/BAX	0,559	0,445	0,674
BAX/UPK1A	0,557	0,443	0,672
BCL2L1/UPK1A	0,527	0,410	0,644
BCL2L1/uPA	0,527	0,410	0,644
CC3/UPK1A	0,524	0,410	0,638
Ki-67/ETS2	0,519	0,390	0,649
CC3/BCL2L1	0,519	0,401	0,637
BAX/BCL2L1	0,514	0,391	0,637
OP18/GAPDH	0,447	0,333	0,561
BCL2L1/GAPDH	0,373	0,263	0,482
CC3/GAPDH	0,370	0,261	0,478
UPK1A/GAPDH	0,367	0,258	0,477
BAX/GAPDH	0,366	0,258	0,473
uPA/GAPDH	0,359	0,250	0,469
BAX/Ki-67	0,353	0,236	0,470

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unerlaubte Hilfsmittel angefertigt zu haben. Die Dissertation wurde in der vorgelegten oder in ähnlicher Form noch bei keiner anderen Institution eingereicht. Ich habe bisher keine erfolglosen Promotionsversuche vorgenommen.

Lübeck, den 23.10.2007

Merle Hanke

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. G. Sczakiel, der es mir ermöglicht hat, diese Arbeit anzufertigen. Außerdem möchte ich ihm für die gute Unterstützung und die objektive wissenschaftliche Kritik danken.

Dr. Jens M. Warnecke möchte ich für die gute Betreuung und die ständige Diskussionsbereitschaft während dieser Arbeit danken.

Allen Mitarbeitern des Instituts für Molekulare Medizin danke ich herzlich für die angenehme und freundliche Arbeitsatmosphäre und für die große Hilfsbereitschaft.

Nancy Jahn, Carsten Geist und Sandra Laufer möchte ich für die Hilfe beim Korrekturlesen dieser Arbeit danken. Darüber hinaus möchte ich mich bei Euch für die lustige Zeit im Labor und im Büro bedanken, wodurch man schnell nach einem missglückten Experiment wieder gute Laune bekam.

Ein großer Dank gilt auch Tim Menke und den Teams aus den Lübecker Arzt-Praxen Dr. Höppner & Dr. Horn, Dr. Träder und Dr. Thomas, welche zahlreiche Urinproben für mich gesammelt haben.

Bei Michael Schütt möchte ich mich herzlich für die mRNA-Strukturanalysen mittels mfold bedanken, aber natürlich auch für die stets gute Laune und Hilfe bei allen Problemen rund um den PC.

Außerdem möchte ich mich herzlich bei Kai Höfig und Biggi Branke aus dem Institut für Pathologie bedanken, die mir bei der Suche nach miRNAs in den „Pipi-Proben“ geholfen haben.

Anna, Dir möchte ich nicht nur dafür danken, dass Du trotz Atlantik bei jeder Frage gleich an meiner Seite standest, sondern auch für den Zugwind, der mir genügend Aktivierungsenergie gegeben hat.

Bei meinen Eltern, bei meiner Schwester und Tom möchte ich mich für die aufmunternden Gespräche bedanken und für die starke Unterstützung.