

Urologische Klinik und Poliklinik der Technischen Universität München
am Klinikum rechts der Isar
(Direktor: Univ.-Prof. Dr. J. E. Gschwend)

**Vergleichende Untersuchung zur Detektion von
Mikrometastasen in Lymphknoten mittels der
Histopathologie und des Epithelmarkers Cytokeratin 20 bei
eingeschränkter und ausgedehnter Lymphadenektomie
nach radikaler Zystektomie eines invasiven
Harnblasenkarzinoms**

Saskia Semmlack

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen
Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines
Doktors der Medizin
genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. E. J. Rummeny
Prüfer der Dissertation: 1. apl. Prof. Dr. M. Retz
2. Univ.-Prof. Dr. J. E. Gschwend

Die Dissertation wurde am 24.09.2013 bei der Technischen Universität München
eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 07.05.2014 angenommen.

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG	1
1.1	Epidemiologie des Harnblasenkarzinoms	1
1.2	Pathogenese und Tumorklassifizierung	2
1.3	Ätiologie	4
1.4	Klinische Symptome des Harnblasenkarzinoms	4
1.5	Therapie des Harnblasenkarzinoms	5
1.6	Prognosefaktoren für das muskelinvasive Harnblasenkarzinom.....	6
1.7	Cytokeratine.....	8
1.8	Zielsetzung und Fragestellung	10
2	MATERIAL UND METHODEN	12
2.1	Rechtliche Rahmenbedingungen	12
2.2	Organismen, Zelllinien und Gewebeproben	12
2.3	Chemikalien, Reagenzien und Geräte	12
2.4	Patientenkollektiv und Präparation des Lymphknotengewebes	14
2.4.1	Charakteristika des Patientenkollektivs	14
2.4.2	Präparation des Lymphknotengewebes	16
2.5	Anzucht und Subkultivierung der Zelllinien	17
2.6	RNA-Extraktion aus Zelllinien	17
2.7	RNA-Extraktion aus Lymphgewebe	18
2.8	cDNA-Synthese mittels Reverse-Transkriptase-PCR (RT-PCR)	19
2.9	PCR-Nachweis von Cytokeratin 20.....	19
2.10	Bestimmung der Sensitivität des CK-20-Nachweises mittels RT-PCR und Agarosegelelektrophorese	22
2.11	Statistische Auswertung.....	23
3	ERGEBNISSE	24
3.1	Etablierung und Nachweisempfindlichkeit des PCR-Assays für das CK-20-Gen.....	24
3.2	Zusammensetzung des Patientenkollektivs und Zusammenstellung des Probenmaterials	28
3.3	Ergebnisse der Histopathologie und der CK-20-PCR	30

3.4 Unterschiede in der Tumordetektion zwischen den verschiedenen anatomischen Feldern.....	34
4 DISKUSSION	41
4.1 Nachweisgrenze der CK-20-PCR	43
4.2 Vergleich der Detektionsraten der histopathologischen mit der PCR-Methode	43
4.3 Einfluss des Tumorstadiums und der anatomischen Lokalisation der Lymphknotenmetastasen auf die Detektionsrate	46
4.4 Ausblick	48
5 ZUSAMMENFASSUNG.....	49
6 LITERATURVERZEICHNIS.....	51
7 ANHANG	58

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

A-LA	Ausgedehnte Lymphadenektomie
bp	Basenpaare
cDNA	complementary Deoxyribonucleic acid (komplementäre Säure)
CHO	chinesische Ovarialhamsterzellen
CK	Cytokeratin
DNA	Deoxyribonucleic acid (Deoxyribonukleinsäure)
dNTP	Deoxyribonucleotide triphosphate (Deoxyribonukleotidtriphosphat)
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
E-LA	Eingeschränkte Lymphadenektomie
LK	Lymphknoten
mRNA	messenger ribonucleic acid (Boten-RNA)
PBS	phosphat buffered saline (Phosphatpuffer)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
RNA	Ribonucleic Acid (Ribonukleinsäure)
RCF	relative Zentrifugalbeschleunigung
rpm	rounds per minute (Umdrehungen in der Minute)
RPMI	Zellkulturmedium (Roswell Park Memorial Institute)
RT-PCR	Reverse-Transkriptase-PCR
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1:	Schematische Darstellung der TNM-Klassifikation	3
Abbildung 2:	Topographisch-anatomische Zuordnung der Lymphknotenfelder bei eingeschränkter und ausgedehnter Lymphadenektomie wie sie im Rahmen der LEA-Studie vorgenommen wurde.	15
Abbildung 3:	Schematische Darstellung der Teilung der Lymphknoten für die Untersuchungen.	16
Abbildung 4:	Agarosegelelektrophorese (1,5 %) der Amplifikationsprodukte der CK-20-PCR der humanen Blasenkarzinom-Zelllinie RT 112.	25
Abbildung 5:	Agarosegelelektrophorese (1,5 %) des 836 bp großen β -Aktin-Genfragmentes der humanen Blasenkarzinom-Zelllinie RT 112.	25
Abbildung 6:	Agarosegelelektrophorese (1,5 %) der Amplifikationsprodukte des CK-20-Gens der humanen Blasenkarzinom-Zelllinie RT 4.	26
Abbildung 7:	Agarosegelelektrophorese (1,5 %) der Amplifikationsprodukte des CK-20-Gens aus sieben Lymphknoten (LK) aus Level 4 und 5.	27
Abbildung 8:	Häufigkeitsverteilung des Alters von 41 Patienten mit einem muskelinvasiven Harnblasenkarzinom zum Zeitpunkt der Operation.	28
Abbildung 9:	Schematische Übersicht über die Zusammenstellung des Probenmaterials.	29
Abbildung 10:	Häufigkeit der CK-20-positiven Lymphknoten (LK, n = 395) in Abhängigkeit ihrer Zuordnung zu Feldern der eingeschränkten und ausgedehnten Lymphadenektomie.	36
Abbildung 11:	Häufigkeit und topografisch-anatomische Zuordnung der CK-20-positiven Lymphknoten (LK) der 15 Patienten mit einem negativen histopathologischen Befund.	37
Abbildung 12:	Häufigkeit und topografisch-anatomische Zuordnung der CK-20-positiven Lymphknoten (LK) von 6 Patienten mit einem positiven histopathologischen Befund.	38
Abbildung 13:	Häufigkeit und topografisch-anatomische Zuordnung der CK-20-positiven Lymphknoten (LK) von 11 Patienten mit eingeschränkter Lymphknotenadenektomie	39
Abbildung 14:	Häufigkeit der CK-20 positiven Lymphknoten der 10 Patienten mit ausgedehnter Lymphadenektomie.	40

TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1:	Verwendete PCR-Primer	20
Tabelle 2:	Häufigkeitsverteilung der 751 untersuchten Lymphknoten in Abhängigkeit vom pT-Stadium und dem Lymphadenektomietyp	30
Tabelle 3:	Ergebnisse der histopathologischen Untersuchung und der CK-20-PCR von insgesamt 751 Lymphknoten (LK) von 41 Patienten.	31
Tabelle 4:	Vergleichende prozentuale Auswertung der Ergebnisse der histopathologischen Untersuchung und der CK-20-PCR von 395 Lymphknoten von 11 Patienten mit eingeschränkter Lymphadenektomie (E-LA) und 10 Patienten mit ausgedehnter Lymphadenektomie (A-LA).	33
Tabelle 5:	Prozentualer Anteil der histopathologisch negativen (pN0) und gleichzeitig	34
Tabelle 6:	Häufigkeit der positiven CK-20-Befunde für 395 kartografierte Lymphknoten (21 Patienten) in Abhängigkeit vom Entnahmeort.	35
Tabelle 7:	Ergebnisse der eingeschränkten Lymphadenektomie aller histopathologisch negativen und CK-20-PCR positiven Lymphknoten	58
Tabelle 8:	Ergebnisse der ausgedehnten Lymphadenektomie aller histopathologisch negativen und CK-20-PCR positiven Lymphknoten,	59

1 EINLEITUNG

In Deutschland erkranken laut den Angaben im Krebsregister seit dem Jahr 2000 jährlich etwa 21.400 Männer und 7.300 Frauen neu an einem Harnblasenkarzinom von denen im Jahr 2004 zirka 3.300 Männer und 1800 Frauen verstarben (Robert-Koch-Institut 2010). Es handelt sich um den häufigsten malignen Tumor des Urogenitaltraktes der Frau; bei den Männern steht er nach dem Prostatakarzinom an zweiter Stelle (Kirkali *et. al* 2005). In Europa sind mehr als 90 % der malignen Tumore der Harnblase Urothelkarzinome. Plattenepithelkarzinome, Adenokarzinome und die Urachuskarzinome kommen selten vor. Die 5-Jahres-Überlebensrate beim Harnblasenkarzinom beträgt 82 % (alle Stadien; American Cancer Society 2007).

1.1 Epidemiologie des Harnblasenkarzinoms

In den USA beträgt das Verhältnis erkrankter Männer zu Frauen 3:1 bis 4:1, in Italien 7:1 (Schatte *et al.* 2000, Gloeckler *et al.* 2003). Auch in Deutschland erkranken Männer dreimal so häufig wie Frauen (Robert-Koch-Institut 2010, Jocham 2003). Der Grund für den Geschlechterunterschied ist bisher unklar. Scosyrev *et al.* (2012) vermutete, dass das vermehrte Auftreten bei Männern mit einer höheren beruflichen Exposition gegenüber karzinogenen Stoffe in Zusammenhang stehen könnte. Kienzle-Pfeilsticker (2001) wies darauf hin, dass mehr Männer als Frauen alkoholabhängig werden und Alkohol als einer der Risikofaktoren für die Entstehung eines Harnblasenkarzinoms gilt.

Das Durchschnittsalter bei der Erstdiagnose beträgt bei Männern 69,0 Jahre und bei Frauen 73,4 Jahre (Coleman *et al.* 2004, Pashos *et al.* 2002). Bei der Erstmanifestation weisen 70 % der Patienten ein oberflächliches Harnblasenkarzinom auf, bei 30 % besteht bereits eine Infiltration der *Muskularis* (Eichenauer *et al.* 2003).

1.2 Pathogenese und Tumorklassifizierung

Die Hälfte der Urothelkarzinome treten multilokulär auf, d. h. das innerhalb der Blase an verschiedenen Stellen mehrerer Tumore vorliegen. In bis zu 70 % der Fälle treten sie an der Hinter- und Seitenwand auf (Jones *et al.* 2008).

Die hervorragende Blut- und Lymphgefäßversorgung der Harnblasenmuskulatur fördert eine frühzeitige hämatogene und lymphogene Tumorstreuung (Ganten *et al.* 2002, Böcker *et al.* 2004, Jones *et al.* 2008). Vor allem die Obturatoriusregion verzeichnet mehr als 70 % der Lymphknotenmetastasen, gefolgt von den Lymphknoten im Bereich der *A. iliaca externa* und *communis*. Ist der Tumor schon fortgeschritten, kann es zur Ausbildung von Fernmetastasen in der Lunge, Leber und im Skelettsystems kommen (Jocham *et al.* 2003, Kausch *et al.* 2007).

Wie andere Krebsarten - mit Ausnahme der Hirntumore - werden auch die Stadien der Urothelkarzinome histopathologisch nach der TNM-Klassifikation (T = Tumor, N = Node, M = Metastasis) der „Union International Contre le Cancer“ (<http://www.uicc.org>) eingeteilt und zusätzlich der Malignitätsgrad der Tumorzellen mit einem dreistufigen Klassifikationsschema (G = Grading) erfasst:

- gut differenziert (G1)
- mittelgradig differenziert (G2)
- niedrig differenziert (G3).

Seit 2004 gibt es eine neue WHO-Klassifikation (Pellucchi *et al.* 2011), die den papillären hochdifferenzierten Tumor, der keine Schichtstörung aufweist, vom papillären Karzinom abgrenzt. Das papilläre Karzinom wird als papilläre urotheliale Neoplasie „of low malignant potential“ (PUNLMP) bezeichnet. Die papillären urothelialen Karzinome werden nur noch in zwei Malignitätsgrade differenziert: „low grade“ und „high grade“ (Lopez-Beltran *et al.* 2004, Seitz *et al.* 2005). Auch der nichtinvasive papilläre Tumor, der auf die *Mukosa* (Tumorstadien pTa) oder auf die *Lamina propria* (Tumorstadium pT1) beschränkt ist, kann invasiv werden (Tumorstadien pT2, pT3, pT4) und wächst dann exophytisch (vgl. dazu Abbildung 1).

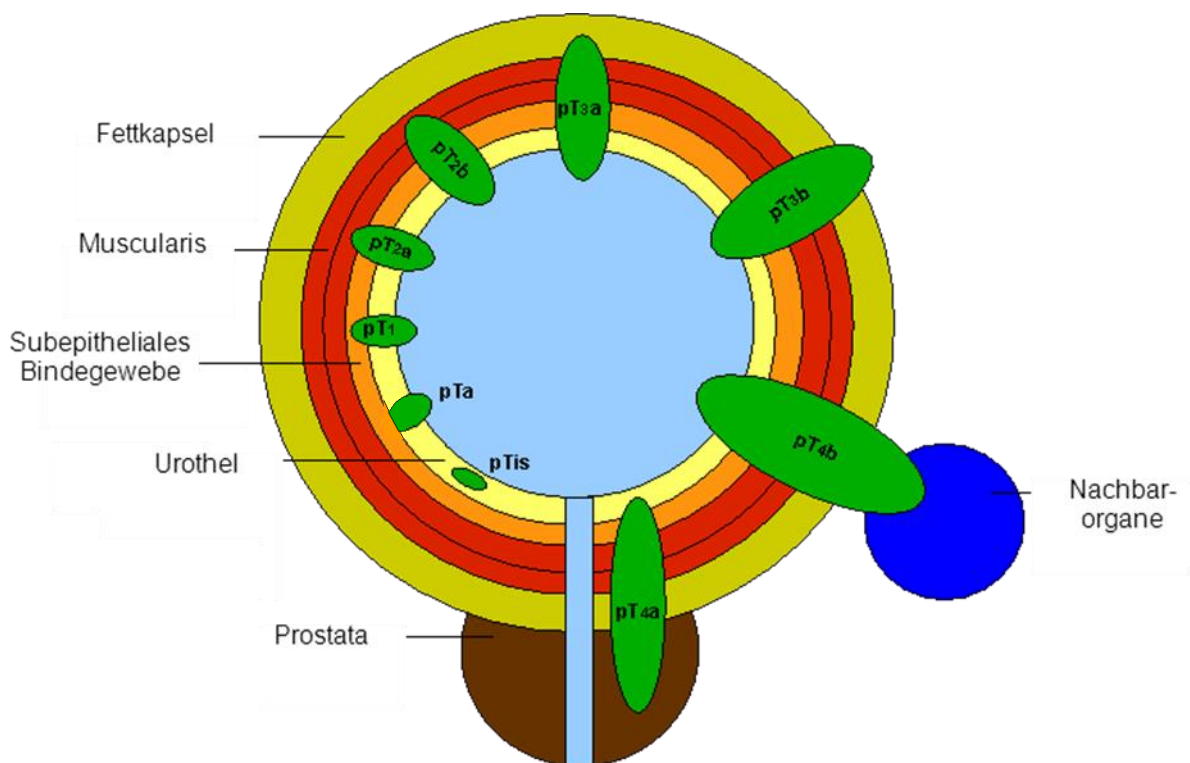


Abbildung 1: Schematische Darstellung der TNM-Klassifikation (leicht modifiziert nach <http://de.wikipedia.org/wiki/Blasenkrebs>). Die neun Stadien sind den jeweiligen Gewebsschichten zugeordnet.
 pTis und pTa: Tumore haben Basalmembran noch nicht infiltriert;
 pT1: Tumorausdehnung max. 2 cm Basalmembran bereits durchbrochen und subepitheliales Bindegewebe infiltriert;
 pT2: muskelinvasiver Tumor;
 pT3: Tumor infiltriert perivesikales Gewebe;
 pT4: Einwachsen in Nachbarorgane (Prostata, Uterus, Vagina und Beckenwand).

Ein pTa-Tumor ist ein nicht invasiver papillärer Tumor mit günstiger Überlebensprognose (Rosin 1995). Patienten mit pTa-Karzinomen hatten eine 5-Jahres-Überlebensrate von 80 % bis 90 % und eine Rezidivrate von 60 %.

Im Stadium pTis handelt es sich um ein *Carcinoma in situ* (flacher Tumor). Das *Carcinoma in situ* infiltriert zwar nicht die *Lamina propria mucosae*, jedoch gilt dies als eine Sonderform, da es eine obligate Vorstufe des muskelinvasiven Harnblasenkar-

zinoms ist. Bei einem pT2-Tumor liegt bereits eine Invasion der Blasenmuskulatur vor. Im Stadium pT3 ist bereits das perivesikale Gewebe infiltriert, was entweder nur mikroskopisch (pT3a) oder bereits makroskopisch (pT3b) erkennbar ist. Im fortgeschrittenen Stadium pT4 kommt es zur Infiltration in benachbarte Organe. Die positiven histopathologischen Befunde werden nach TNM-Klassifikation bezüglich des Vorhandenseins maligner Lymphknoten weiter differenziert in N1 (Lymphknotenmetastase ≤ 2 cm) und N2 (Lymphknotenmetastase 2 bis 5 cm).

1.3 Ätiologie

Der größte Risikofaktor für die Entstehung eines Harnblasenkarzinoms ist der Nikotinkonsum. Das Erkrankungsrisiko hängt unter anderem vom Teergehalt, Art des Tabaks, Anzahl der gerauchten Zigaretten, Filter und Inhalation ab (Zeegers *et al.* 2004, Schmelz *et al.* 2006) und männliche Raucher haben im Durchschnitt ein 3,6-fach höheres Erkrankungsrisiko als Frauen (Brennan *et al.* 2000, 2001). Laut Silverman *et al.* (1992) können auch Medikamente wie Cyclophosphamid, Phenacetin und nicht-steroidale Antirheumatika Auslöser sein. Auch karzinogene Substanzen wie synthetische Stickstoffdünger (Mensing *et al.* 2003), auf Organphosphat-basierende Pestizide (Webster *et al.* 2002) und aromatische Amine (Wu *et al.* 2007) werden als Auslöser bei Berufsgruppen diskutiert, die mit diesen Stoffen häufig Umgang haben. Es wird vermutet, dass ein ständiger Kontakt mit dem Urin und den darin mitgeführten krebserregenden Stoffen einen negativen Einfluss auf das Urothel ausüben. Aus diesem Hintergrund wurde der Blasenkrebs für einige Berufssparten als Berufskrankheit anerkannt (Sadetzki *et al.* 2000). Zu den gefährdeten Berufsgruppen gehören Beschäftigte in der Chemie-, Stahl- und Lederindustrie sowie Zahntechniker, Automechaniker und Frisöre.

1.4 Klinische Symptome des Harnblasenkarzinoms

Das Leitsymptom des Harnblasenkarzinoms ist die schmerzlose Hämaturie. Weitere Symptome sind häufiger Harndrang, Pollakisurie und Dysurie, die denen einer Blasenentzündung ähneln. Flankenschmerzen weisen auf ein fortgeschrittenes Stadium

hin und sind oft Ausdruck einer Harnstauungsniere bei Tumordinfiltration der Ureterostien, dies kann bis zum postrenalen Nierenversagen führen (Haag *et al.* 2008).

Suprapubische Schmerzen oder Lymphödeme der unteren Extremitäten können auf ein fortgeschrittenes Stadium mit extravasikaler Tumorausbreitung bzw. lymphogener Metastasierung hinweisen. Bei einer Makrohämaturie oder gehäuften Miktionsbeschwerden sollte daher umgehend eine Diagnostik zum Ausschluss eines Harnblasenkarzinoms durchgeführt werden.

1.5 Therapie des Harnblasenkarzinoms

Grundlage einer jeden Therapie ist eine möglichst gesicherte Diagnose. Bei Verdacht auf ein Harnblasenkarzinom erfolgt eine zystoskopische Diagnostik mit transurethraler Resektion und histopathologischer Untersuchung des entnommenen Gewebes. Zur Feststellung des Tumorstaging werden zusätzlich bildgebende Verfahren wie die Einzelphotonen-Emissionscomputertomographie eingesetzt. Zur Tumorverkleinerung und zur Schaffung optimaler Operationsbedingungen kann in einigen Fällen eine präoperative (neoadjuvante) Chemotherapie angebracht sein.

Für die Therapie eines oberflächlichen Harnblasenkarzinoms ist eine vollständige transurethrale Resektion des Tumors entscheidend. Nach kompletter Entfernung ist eine Immuntherapie in Form einer intravesikalen Instillationstherapie mit Tuberkelbakterien BCG (Bacillus Calmette-Guérin) indiziert. In Deutschland werden vor allem die Zytostatika Doxorubicin und Mitomycin verwendet. Nach 5 bis 6 Wochen erfolgt - je nach Grad der Differenzierung und des Tumorstadiums - eine erneute Nachresektion von möglicherweise zurückgebliebenen Tumorresten. Um das Rezidivrisiko zu mindern, wird gegebenenfalls eine erneute Durchführung der lokalen Chemotherapie empfohlen.

Wenn die Diagnostik Hinweise auf das Vorliegen eines muskelinvasiven Karzinoms gibt oder aber es nach Resektion und Instillationstherapie von oberflächlichen Karzinomen immer wieder zu Rezidiven kommt, ist eine radikale Zystektomie notwendig. Dabei wird zusätzlich zur Lymphadenektomie die Harnblase entfernt und bei Männern, Prostata, Samenleiter und Samenblase; bei Frauen wird eine Hysterektomie und evtl. Adnexektomie durchgeführt. Aufgrund von Multimorbiditäten bei Patienten,

wird von einer radikalen Zystektomie abgesehen und alternativ eine kombinierte Strahlen-/Chemotherapie durchgeführt. Bei lokalen Lymphknotenmetastasen ist eine neoadjuvante oder adjuvante Chemotherapie vorzusehen.

Bei inoperablen Tumor oder bereits metastasierten Harnblasenkarzinom wird eine Polychemotherapie eingeleitet, die nach dem sogenannten MVAC-Schema erfolgt. Es besteht aus der Gabe der Zytostatika Methotrexat, Vinblastin, Adriamycin und Cisplatin. Seit 2002 wird auch Gemcitabin und Cisplatin eingesetzt, die sich equipotent zum MVAC-Schema verhält. Maase *et al.* (2000) halten die Kombination Gemcitabin/Cisplatin bei besserer Verträglichkeit für genauso wirksam wie das MVAC-Schema.

1.6 Prognosefaktoren für das muskelinvasive Harnblasenkarzinom

Als Prognosefaktoren für das Blasenkarzinom werden von den meisten Autoren und Studien der Differenzierungsgrad, die Infiltrationstiefe (pT-Stadium) und die Größe des Tumors herangezogen. Die relative 5-Jahresüberlebensrate selbst variiert jedoch, weil der Erkrankungsgrad und die Ausbreitung in Abhängigkeit vom Zeitpunkt der Diagnose sehr verschieden sein können.

Für das muskelinvasive Harnblasenkarzinom wurden als stadienunabhängige 5-Jahres-Überlebensraten von Bertz *et al.* (2006) 57 % für Männer und 53 % für Frauen angegeben. Patienten, deren Lymphknoten bereits befallen waren, haben nach Meinung dieser Autoren nur noch eine geringe Aussicht auf Heilung. Laut Autenrieth *et al.* (2012) ist die Aussagekraft von Lymphknotenstudien eingeschränkt, weil nicht nur die Lymphknotenanzahl aufgrund der individuellen anatomischen Unterschiede der Patienten schwankt, sondern darüber hinaus die Gründlichkeit des Operateurs und des Pathologen eine erhebliche untersuchungsabhängige Schwankung mit sich bringen kann, wie Fang *et al.* (2010) feststellten: Nach Einführung der Regel, dass pro Patient mindestens ≥ 16 Lymphknoten entnommen werden mussten, stieg der Anteil der Patienten mit ≥ 16 entnommenen Lymphknoten um 26,4 % gegenüber der Gruppe, die vor der Einführung dieser Regel operiert worden war. Die Überlebensrate der Patienten stieg nach mindestens 2-jähriger Beobachtung von 41,5 % in der Gruppe derjenigen, die vor der Regeleinführung operiert worden war, auf 72,3 %. Auf

diesem Hintergrund sollten Überlebensraten verschiedener Untersuchungen, die den Lymphknotenstatus berücksichtigen, kritisch bewertet werden.

Stein *et al.* (2001) untersuchten 1054 Personen (davon 80 % Männer) mit invasivem Harnblasenkarzinom nach einer radikalen Zystektomie.

Patienten mit einem Tumor der Stadien pT2 und pT3a und gleichzeitig histopathologisch negativen Lymphknoten hatten eine rezidivfreie 5-Jahres-Überlebensrate von 89 % (pT2) und 87 % (pT3a); nach 10 Jahren lag sie bei 78 % bzw. 76 %. Patienten mit einem organüberschreitenden Tumor (pT3b und pT4) und gleichzeitigem Lymphknotenstatus pN0 hatten eine signifikant höhere Wahrscheinlichkeit ein Rezidiv zu entwickeln als Patienten mit organbegrenzten Karzinomen ($p < 0,001$). Auch Madersbacher *et al.* (2003) stellten fest, dass, Rezidive bei organbegrenzten Tumoren seltener sind als bei Patienten mit organüberschreitendem Harnblasenkarzinom. Die letztgenannten Autoren analysierten 507 Patienten, die eine radikale Zystektomie und pelvinen Lymphadenektomie erhalten hatten. Von den 217 Patienten mit organbegrenzten Tumoren und histopathologisch negativen Lymphknotenstatus ($< pT2$, pN0) waren 73 % nach 5 Jahren noch rezidivfrei; die Gesamtüberlebensrate betrug 62%. Bei einem organüberschreitenden Tumor hingegen betrug die Rezidivfreiheitsrate und das Überleben nur 56 % bzw. 49 % ($n = 166$, $> pT2$, pN0).

Isolierte Lokalrezidive wurden bei 3 % der Patienten mit einem organbegrenzten und bei 11% mit organüberschreitenden Tumor und bei 13% mit einem histopathologisch positiven Lymphknotenstatus nachgewiesen. Bei einem positiven Lymphknotenstatus kam es bei 51% der Patienten zu Fernmetastasen. Demgegenüber kam es bei Patienten mit organbegrenzten Tumoren und histopathologisch negativen Lymphknoten nur in 25 % der Fälle zu Fernmetastasen.

Auch Gschwend *et al.* (2002) kamen zu dem Schluss, dass die Prognose für organbegrenzte Tumore deutlich günstiger ist.

Madersbacher *et al.* (2003) halten den Lymphknotenstatus – zusammen mit dem Tumorstadium – sogar für die einzig relevanten prognostischen Faktoren. Sie ermittelten für 124 Patienten mit positiven Lymphknotenstatus eine rezidivfreie 5-Jahresrate von 33 % und eine Überlebensrate von 26 %; für 246 Patienten mit positiven Lymphknoten von Stein *et al.* (2001) war die 5-Jahresrezidivfreiheitsrate mit 35 % sehr ähnlich. Von diesen 246 Personen hatte die Gruppe mit < 5 befallene Lymphknoten einen signifikanten Überlebensvorteil gegenüber der Gruppe mit > 5

positiven Lymphknoten, von denen darüber hinaus 52 % eine hämatogene Metastasierung entwickelten.

Wie Autenrieth *et al.* (2012) darlegten, lassen die bisherigen retrospektiven Studien zwar vermuten, dass eine ausgedehnte Lymphadenektomie mit Entfernung sehr vieler Lymphknoten einen positiven Einfluss auf das Gesamtüberleben nach Zystektomie hat, jedoch fehlt es noch an Ergebnissen von prospektiv-randomisierten Studien. Eine dieser Studien ist die sogenannte LEA-Studie, eine prospektiv randomisierte Studie der Arbeitsgemeinschaft urologische Onkologie zum Vergleich einer ausgedehnten mit einer eingeschränkten pelvinen Lymphadenektomie bei der operativen Therapie des Harnblasenkarzinoms (Deutsche Krebsgesellschaft 2002, www.auo-online.de/pdf/P_1105.pdf). Sie ist die erste Studie im deutschsprachigen Raum, die die Wertigkeit der eingeschränkten und ausgedehnten Lymphadenektomie im Hinblick auf die progressionsfreie Überlebensrate untersucht. Im Hinblick auf die Zielsetzung wurde die Lymphadenektomie bestimmten topografisch-anatomischen Leveln zugeordnet, um die Vergleichbarkeit der Daten zu gewährleisten.

Weil die Lymphknotendichte (prozentuales Verhältnis der befallenen zu den entnommenen Lymphknoten) als prognostisches Kriterium gilt (Stein *et al.* 2003, Stöckle *et al.* 2005) sind hochempfindliche Methoden, die auch Mikrometastasen frühzeitig erfassen können, von zunehmendem Interesse. Unter der Voraussetzung, dass es einen für den jeweiligen Krebs spezifischen Marker gibt, sind PCR-Nachweise aufgrund ihrer potenziell sehr hohen Empfindlichkeit die bevorzugte Methode. Ein möglicher Tumormarker für das Harnblasenkarzinom ist das Cytokeratingen 20 (CK-20). Auf die Funktion dieses Gens und seine Verwendung als Marker wird im nachfolgenden Kapitel näher eingegangen.

1.7 Cytokeratine

Cytokeratine sind Polypeptide und Bestandteile des Zytoskeletts epithelialer Zellen (Moll *et al.* 1992). Sie stabilisieren die Epithelzellen und geben ihnen ihre Form.

Beim Menschen wurden bisher zwanzig verschiedene Cytokeratine identifiziert, die mit CK-1 bis CK-20 bezeichnet werden (Moll *et al.* 1982, 1992; Sun *et al.* 1984) und in zwei Gruppen eingeteilt werden. Der Typ I umfasst die sauren Keratine CK-9 bis CK-20, der Typ II die basischen CK-1 bis CK-8.

Cytokeratin-Gene werden in den Epithelien des Gastrointestinaltrakts, im Karzinomgewebe vom kolorektalen Typ, in den Merkelzellen der Haut und in den Transitionalzellen des Urogenitaltraktes exprimiert. Die Expression ist gewebespezifisch: nicht alle der zwanzig Gene werden in allen der genannten Gewebe gleichermaßen exprimiert. Diese Tatsache ist für die Eignung dieser Proteingruppe als diagnostisches Werkzeug von besonderer Bedeutung. Erstens ist die Zusammensetzung der Cytokeratinfilamente nicht in allen Epithelien identisch, sondern hängt vom Epitheltyp und dessen Differenzierung ab. Zweitens bleibt das Expressionsmuster der Cytokeratine beim Übergang von normalen zum malignen Wachstum der Epithelzellen unverändert. Auf dieser spezifischen Expression in epithelialen Geweben, auch nach maligner Zelltransformation begründet sich die Wichtigkeit dieser Proteingruppe für die molekularbiologische Forschung und die Krebsforschung (Moll *et al.* 1992, Nagle 1989).

Cytokeratin-20

Cytokeratin-20 (CK-20) unterscheidet sich von den Cytokeratinen 18 und 19 durch seine spezifische Expression in nur wenigen Gewebetypen (Krüger *et al.* 1996, Wang *et al.* 1995). Es wird in normalen Urothelgewebe sowie im Urothelkarzinom konstant exprimiert ebenso wie in Epithelien des Gastrointestinaltraktes und im Karzinomgewebe des kolorektalen Typs. Nicht exprimiert wird es in mesenchymalen Geweben wie Lymphknoten, Muskelzellen und im Bindegewebe (Moll *et al.* 1990, 1992, 1993, Soeth *et al.* 1996, Retz *et al.* 2001). Wu *et al.* (2005) wiesen nach, dass CK-20 sich als Tumorepithelmarker zur Detektion von Lymphknotenmetastasen beim Harnblasenkarzinom eignet. Die CK-20-RT-PCR detektierte signifikant ($p = 0,0373$) mehr Lymphknotenmikrometastasen als die herkömmliche Histopathologie. Jiang *et al.* (2001) untersuchte Karzinome der Harnblase und die pelvinen Lymphknoten von 26 Patienten parallel mit den Tumormarkern CK-7 und CK-20. Der PCR-Nachweis von CK-20 gelang in knapp 50 % der Fälle (12 von 26), während CK-7 in allen 26 Proben nachgewiesen werden konnte.

Ein routinemäßiger Einsatz des CK-20-Gens als Marker würde es ermöglichen, Mikrometastasen in Lymphknoten früher zu erfassen als mit der immunohistochemischen Nachweismethode. Dies könnte ein Beitrag zur Senkung der Rezidivrate von Patienten mit histopathologisch tumorfreien Lymphknoten sein, weil rechtzeitig

mit geeigneten Therapien begonnen werden könnte (Osborne *et al.* 1994, Oruzio *et al.* 1997).

1.8 Zielsetzung und Fragestellung

Beim muskelinvasiven Harnblasenkarzinom kommt es nach radikaler Zystektomie in ca. 30 % der Fälle innerhalb der ersten fünf Jahre auch dann zu Tumorrezidiven, wenn nach einer R₀-Resektion die Lymphknoten als metastasenfrei diagnostiziert wurden (Lehmann *et al.* 2002, Dhar *et al.* 2006, Suttman *et al.* 2007). Dies ist ein Indiz dafür, dass trotz negativen histopathologischen Befundes bereits eine lymphogene Mikrometastasierung stattgefunden hat.

Das Ziel dieser Arbeit war es daher, einen Beitrag zur Entdeckung dieser Risikopatienten zu leisten. Es sollte eine hochempfindliche Nachweismethode etabliert und getestet werden, die auch einzelne disseminierte Tumorzellen und kleine Metastasen erfasst und somit zur Verbesserung der Genauigkeit des Tumorstaging beitragen kann. Als Marker wurde das Gen CK-20 ausgewählt, weil es in Urothelzellen und Harnblasenkarzinomzellen exprimiert wird (Retz *et al.* 2001, Ribal *et al.* 2006) und als Nachweismethode die PCR, weil damit – unter der Voraussetzung geeigneter Reaktions- und Amplifikationsbedingungen – auch sehr geringe RNA/DNA-Mengen erfasst werden können. Zur Etablierung des PCR-Assays und der Überprüfung seiner Empfindlichkeit und Eignung als Tumormarker für den klinischen Alltag wurden im Einzelnen folgende Experimente durchgeführt:

1. Etablierung der CK-20-PCR und Bestimmung der Sensitivität und Spezifität des Assays anhand von Blasenkarzinomzelllinien.
2. Anwendung des PCR-Assays zur Untersuchung des Lymphknotengewebes von 41 Patienten mit Harnblasenkarzinom, die einer eingeschränkten (20 Patienten) bzw. ausgedehnten (21 Patienten) Lymphknotenadenektomie unterzogen worden waren.
3. Auswertung und Vergleich der PCR-Ergebnisse mit denen der parallel durchgeführten histopathologischen Untersuchung.

Im Einzelnen sollten folgende Fragen beantwortet werden:

- a) Ist CK-20 ein geeigneter Epithelmarker zum Nachweis von Lymphknotenmikrometastasen?
- b) Gibt es eine Korrelation der Mikrometastasendetektion mit dem konventionellen histopathologischen Lymphknotenstatus?
- c) Korreliert die Mikrometastasenanzahl mit dem TNM-Stadium?

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Rechtliche Rahmenbedingungen

Sämtliche Gewebeproben stammten von Patienten aus der Klinik für Urologie der Technischen Universität München, Rechts der Isar. Sie wurden nach Aufklärung und schriftlicher Einwilligung der Patienten und Patientinnen gemäß den Richtlinien und Zustimmung der Ethikkommission entnommen.

2.2 Organismen, Zelllinien und Gewebeproben

Für die Untersuchungen wurden folgende biologischen Materialien verwendet:

- Urothelkarzinom-Zelllinie RT 4 (Biomedizinisches Zentrum Homburg)
- Urothelkarzinom-Zelllinie RT 112 (Quelle: Cellline service, Heidelberg)
- Hamsterovar-Zelllinie CHO (Quelle: Cellline service, Heidelberg)
- Lymphknoten (entnommen von Patienten aus der Urologie des Klinikums Rechts der Isar, Technische Universität München).

Die beiden Urothelkarzinom-Zelllinien hatten die Dysplasiegrade 1 (RT 4) und 2 (RT 112). Die Linien RT 4 und RT 112 wurden als Positivkontrolle und die Linie CHO als Negativkontrolle für die PCR-Versuche eingesetzt.

2.3 Chemikalien, Reagenzien und Geräte

Im Folgenden sind die verwendeten Nährmedien und ihre Supplemente, sowie Chemikalien, Feinchemikalien, Enzyme, Kits und Lösungen aufgeführt. Bei allen anderen benutzten, aber hier nicht genannten Substanzen handelte es sich um Standardlaborchemikalien, die in den Laboratorien des Institutes vorgehalten wurden.

Chemikalien, Medien und Supplemente

Alle aufgeführten Substanzen wurden von Biochrom AG (Deutschland) bezogen.

Phosphatpuffer (PBS)
 Non essential amino acids (NEAS)
 Penicillin-Streptomycingemisch
 Hitzeinaktiviertes fötales Kälberserum
 RPMI 1640 Medium mit Phenolrot
 Trypsin-EDTA ohne Calcium und Magnesium

Chemikalien und Reagenzien für RNA-Isolierung und Gelelektrophorese

Agarose	Invitrogen (Deutschland)
Diethyl Pyrocarbonate (DEPC)	Sigma (Deutschland)
DNA ladder 100 bp Bench Top	Invitrogen (Deutschland)
Ethidiumbromid (10 mg/ml)	Invitrogen (Deutschland)
Trizol LS Reagenz	Invitrogen (Deutschland)
6X Loading Dye & SDS solution	Fermentas Life Science (Deutschland)

Kits zur Durchführung der cDNA und PCR

Für die Synthese von cDNA aus der Gesamt-RNA der Lymphknoten wurde der SuperScript™ First-Strand Synthesis System for RT-PCR der Firma Invitrogen (Deutschland) verwendet, der alle notwendigen Reagenzien enthält. Die im Kit bereitgestellte reverse Transkriptase reduziert die Aktivität der RNase H wodurch Menge und Länge der synthetisierten cDNA erhöht werden können.

Für die PCRs wurde der GoTaq Green Master Mix (Promega, Deutschland) benutzt, der alle notwendigen PCR-Komponenten (Polymerase, dNTPs, Buffer, MgCl₂ und nukleasenfreies Wasser) enthielt.

Geräte

Zur Vermahlung und Gewebehomogenisierung der zuvor manuell nur grob zerkleinerten tiefgefrorenen Lymphknoten wurde eine Laborschwingmühle mit entsprechenden Mahlkugeln eingesetzt (Mikro-Dismembrator U; B. Braun Biotech, International). Die Mühle ermöglicht die Vermahlung der Proben unter flüssigem Stickstoff.

Alle PCRs wurden im Thermocycler MJ-Research PTC 200 (Biozym, Oldendorf) durchgeführt.

2.4 Patientenkollektiv und Präparation des Lymphknotengewebes

2.4.1 Charakteristika des Patientenkollektivs

Die Gruppe bestand aus 33 Männern (80,5 %) und acht Frauen (19,5 %). Zum Operationszeitpunkt der radikalen Zystektomie betrug das Durchschnittsalter 67,2 Jahre. Diese 41 Patienten waren auf der Grundlage der prospektiven, randomisierten LEA-Studie der Arbeitsgemeinschaft urologische Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft e. V. 2002. Studiennr. AB 25/02, www.auo-online.de/pdf/P_1105.pdf), ausgewählt worden. Diese Studie untersucht erstmalig die Wertigkeit der eingeschränkten und ausgedehnten Lymphadenektomie im Hinblick auf die progressionsfreie Überlebensrate. Die Ein- und Ausschlusskriterien der Studie waren folgende:

Einschlusskriterien:

- Alter > 18 Jahre
- muskelinvasives Harnblasenkarzinoms, Stadium pT2-4.

Ausschlusskriterien:

- Histologisch oder durch bildgebende Diagnostik gesicherte Organmetastasen
- Radiologischer Nachweis von vergrößerten Lymphknoten (> 1 cm) oberhalb der Aortenbifurkation in Verbindung mit pelvinen Lymphknotenmetastasen
- Radiologischer oder sonstiger Nachweis eines T4b-Tumors (Infiltration der Beckenwand oder anderer Organsysteme)
- Zustand nach neoadjuvanter Polychemotherapie des Blasenkarzinoms, früherer pelviner Lymphadenektomie, Radiotherapie des Beckens
- Internistische oder anästhesiologische Risikofaktoren, die eine kurze Operationszeit erforderlich machen
- Palliative Zystektomie
- Nachweis eines weiteren Tumors, der die Lebenserwartung des Patienten führend einschränkt.

Von den 41 ausgewählten Patienten wurden zwanzig einer eingeschränkten und 21 einer ausgedehnten Lymphadenektomie unterzogen. Die topografisch-anatomische Zuordnung der entnommenen Lymphknoten erfolgte anhand des Klassifizierungsschema der LEA-Studie. Die genaue anatomische Beschreibung der Entnahmeorte für die eingeschränkte Lymphadenektomie (Level 5, 7, 9, 11, 13, 14) und für die aus-

gedehnte (zusätzliche Level 1, 2, 3, 4, 6, 8, 10 und 12) sind in der Abbildung 2 dargestellt.

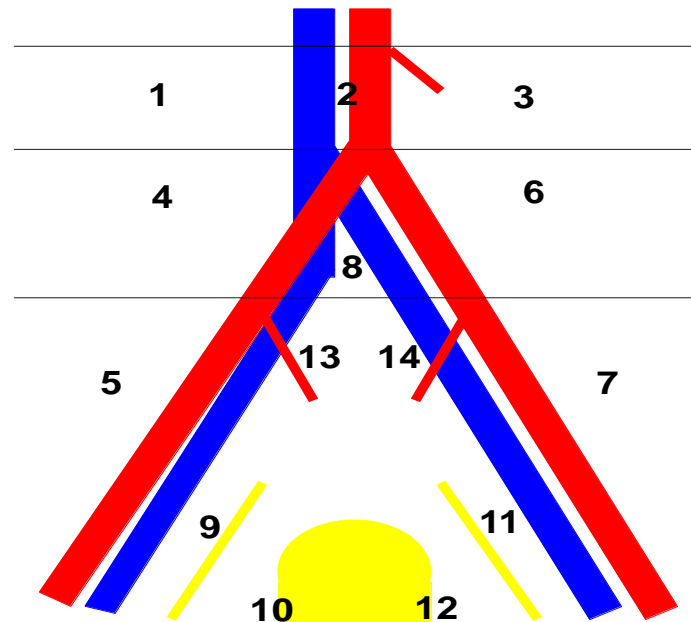


Abbildung 2: Topographisch-anatomische Zuordnung der Lymphknotenfelder bei eingeschränkter und ausgedehnter Lymphadenektomie wie sie im Rahmen der LEA-Studie vorgenommen wurde.

Eingeschränkte Adenektomie: Level 5, 7, 9, 11, 13, 14

Ausgedehnte Adenektomie: 1 bis 14

Die Level 1, 2, 3 gehören zum oberen Quadranten des Abdomens; 4, 6, 8 gehören zum unteren Quadranten des Abdomens; die restlichen Level gehören zum pelvinen Bereich.

Exakte anatomische Zuordnung der Level:

1: Paracaval rechts

2: Inter-aortocaval

3: Paraaortal links

4: Gruppe lateral der *A. iliaca communis* rechts

5: Gruppe lateral der *A. iliaca externa* rechts

6: Gruppe lateral der *A. iliaca communis* links

7: Gruppe lateral der *A. iliaca externa* links

8: Präsacrale Lymphknoten

9: Obturatorische Gruppe rechts

10: Tiefe obturatorische Gruppe rechts

11: Obturatorische Gruppe links

12: Tiefe obturatorische Gruppe links

13: *A. iliaca interna* rechts

14: *A. iliaca interna* links

● Harnblase

Es wurden insgesamt 801 Lymphknoten entnommen und für die nachfolgenden histopathologischen und molekularbiologischen Untersuchungen aufbereitet.

2.4.2 Präparation des Lymphknotengewebes

1. Freipräparation der Lymphknotenproben sofort nach ihrer Entnahme
2. Teilung der Lymphknoten mithilfe eines Skalpells in drei unterschiedlich große Stücke. Bei den ersten zwei Patienten waren die Lymphknoten nur halbiert worden. Weil es jedoch nicht in allen Fällen möglich war, den Metastasenbefall makroskopisch eindeutig zu erkennen und andererseits aber gewährleistet werden sollte, dass die Histopathologie metastasenhaltiges Gewebe zur Verfügung stünde, wurde das Verfahren geändert: Aus den unregelmäßig geformten Lymphknoten wurde aus zwei möglichst weit auseinander liegenden Bereichen Gewebeteile für die Pathologie entnommen (siehe Abbildung 3). Der dritte Teil wurde für die PCR-Analyse verwendet.
3. Die beiden Gewebeteile für die Histopathologie wurden in Formalin überführt.
4. Gewebeteile für die RNA-Extraktion wurden in sterile Aluminiumfolie verpackt, in Flüssigstickstoff schockgefroren und in -80 °C zwischengelagert.

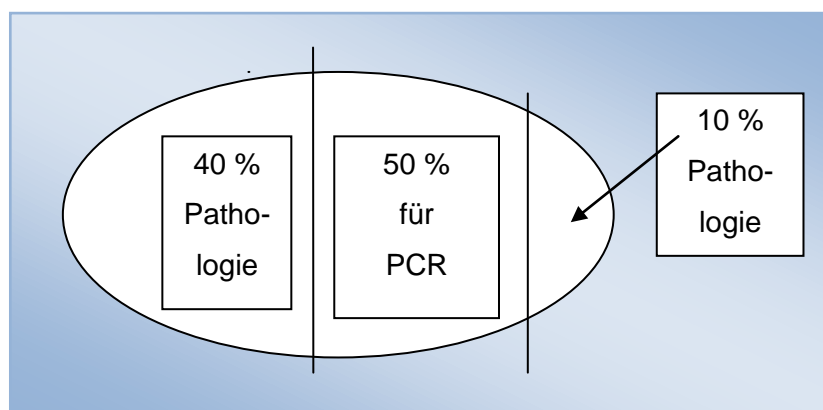


Abbildung 3: Schematische Darstellung der Teilung der Lymphknoten für die Untersuchungen. Detaillierte Erläuterung im Text.

2.5 Anzucht und Subkultivierung der Zelllinien

Die Zelllinien RT 4, RT 112 und CHO wurden im Medium RPMI 1640 mit Phenolrot angezogen, dem 10 %, hitzeinaktiviertes fötales Kälberserum, 1 % NEAS und 1 % Antibiotikagemisch (Penicillin und Streptomycin) zugegeben worden war. Die Kultivierung erfolgte bei 37 °C im Brutschrank unter einer wassergesättigten 5 %igen CO₂-Atmosphäre.

Subkultivierung (Passagieren) von Zellen

Das Erstellen neuer Zellpassagen wurde wie folgt durchgeführt:

1. Absaugen des RPMI-Mediums von einer 50 cm² Zellkultur mit einer 5 ml-Pipette.
2. Zellen einmal mit 10 ml PBS-Puffer waschen; Puffer wieder absaugen
3. Zugabe von 2 ml Trypsin-EDTA-Lösung (0,5 % Trypsin, 0,2 % EDTA)
4. Zur Ablösung der Zellen vom Flaschenboden Inkubation bei 37 °C für 5 min
5. Zugabe von 8 ml RPMI-Medium und Überführung in ein Zentrifugenröhrchen
6. Zentrifugation bei 28 °C mit 12.000 rpm für 5 min
7. Überstand absaugen
8. Bestimmung der Zellzahl im Überstand durch Auszählen unter dem Mikroskop (Zählkammer)
9. Überführung von 2×10^5 Zellen in eine 50 ml Zellkulturflasche
10. Kultivierung bei 37 °C in 5 %iger CO₂ und wassergesättigter Atmosphäre.

2.6 RNA-Extraktion aus Zelllinien

Die Gewinnung der Gesamt-RNA wurde modifiziert nach Chomczynski *et al.* (2006) durchgeführt. Die Methode beruht auf dem klassischen Prinzip der Aufreinigung mit Phenol und Guanidinisothiocyanat. Letzteres lysiert die Zellen und inhibiert gleichzeitig die RNasen und andere Enzyme, deren Aktivität die Qualität und Menge der extrahierten RNA negativ beeinflussen könnten.

1. Die RT 4-, RT 112- und CHO-Zellen wurden in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt und für 5 min bei 3,5 RCF und 4°C zentrifugiert.
2. Überstand abpipettieren und Pellet mit 1 ml Trizol-Phenolmischung vermischen
3. Inkubation für 10 min bei 37°C und unter Schütteln (300 rpm) in einem Thermomixer
3. Zugabe von 200 µl Chloroform pro 1 ml Zelllösung
4. 15 s kräftig schütteln; Inkubation für 3 min im Thermomixer bei 25 °C
5. Zentrifugation für 15 min, 12,0 RCF, 4 °C
6. Abpipettieren der klaren, oberen RNA-haltigen Phase ohne die Zwischenphase zu berühren, welche Proteine und DNA enthält.
7. Fällung der ca. 500 µl des Überstandes mit 500 µl 100 % Isopropanol; Inkubation für 10 min bei 25 °C und Pelletierung der RNA durch anschließende Zentrifugation für 10 min, 12,0 RCF bei 4 °C.
8. Abpipettieren des Überstandes und Waschen des RNA-Pellets mit 1 ml 75 %igem Ethanol; für 5 min, 7,6 RCF bei 4 °C zentrifugieren.
9. Überstand abpipettieren; RNA-Pellet für 6 min im Exsikkator trocknen und danach in 30 µl RNase+DNase freiem Wasser aufnehmen und lösen.
10. Aufbewahrung bis zur Weiterverarbeitung in -80 °C.

2.7 RNA-Extraktion aus Lymphgewebe

Die bei -80 °C in steriler Aluminiumfolie gelagerten Lymphknoten wurden mithilfe eines Hammers zunächst mechanisch zerkleinert und zur weiteren Feinvermahlung in die Schwingmühle überführt. Das Mahlen erfolgte für 1,1 min bei 1800 rpm unter stetiger Zugabe von flüssigem Stickstoff, um ein Auftauen der Proben zu verhindern.

Das Gewebepulver wurde in 50 ml Falconröhrchen überführt und je nach Größe des ursprünglichen Lymphknotens 1 ml Trizol-Phenolmischung (kleine Knoten, ca. 4 mm Durchmesser) oder bis zu 6 ml (sehr große Knoten, ca. 12 mm Durchmesser) zugegeben und gevortext, um eine gute Vermischung zu erreichen. Nach Überführung in 1.5 ml Reaktionsgefäße wurde die RNA-Extraktion so durchgeführt wie in Kapitel 2.6 für die Zelllinien beschrieben.

Menge und Konzentration der extrahierten RNA wurden photometrisch bei 260 nm auf Grundlage folgender Formel für ssRNA berechnet: $A_{260} = 1 \text{ OD} = 40 \text{ ng}/\mu\text{l}$.

2.8 cDNA-Synthese mittels Reverse-Transkriptase-PCR (RT-PCR)

Die extrahierte Gesamt-RNA aus den Zelllinien und dem Lymphknotengewebe wurde zunächst unter Verwendung des „SuperScript™ First-Strand Synthesis System for RT-PCR“ mit den Random Hexamer Primern und der reversen Transkriptase aus dem Moloney murine leukemia virus (MMLV) in cDNA umgeschrieben. Es wurden jeweils 2,5 µg Gesamt-RNA für die Reaktion eingesetzt, die ohne Modifikationen gemäß des Kit-Protokolls (Stand 2008) durchgeführt wurde. Die so hergestellte cDNA wurde bis zur Verwendung als Template für nachfolgenden PCRs bei -80 °C gelagert.

2.9 PCR-Nachweis von Cytokeratin 20

Die Etablierung der CK-20-PCR wurde mit den humanen Blasenkarzinomzelllinien RT 4 und RT 112 durchgeführt, um sicherzustellen, dass für die eigentlichen Versuche eine ausreichende Menge der wertvollen Gesamt-RNA aus dem Lymphknotengewebe der Patienten zur Verfügung stünde. Die beiden Zelllinien entsprachen dem Dysplasiegrad 1 (RT 4) bzw. 2 (RT 112). Für alle PCR-Experimente wurden folgende Kontrollen verwendet:

Negativkontrolle NK 1: Hamsterzelllinie CHO (ohne CK-20-Gen)

Negativkontrolle NK 2: PCR-Reaktionsmix ohne RNA

Positivkontrolle PK 1: β-Aktin-Gen aus der Harnblasenkarzinom-Zelllinie RT 112

Beide Negativkontrollen dienten zur Überprüfung der Reaktionskomponenten auf Kontamination mit Fremd-DNA. Mit der Amplifikation des sogenannten Haushaltsgens β-Aktin als Positivkontrolle wurde geprüft, ob die cDNA-Synthese – und somit auch die Menge und Qualität der extrahierten RNA – mittels der RT-PCR erfolgreich gewesen war.

Für die im Folgenden beschriebenen PCRs wurden die in Tabelle 1 aufgeführten Primer verwendet. Die Sequenzen vieler bereits veröffentlichter Primer für CK-20 überlappen sich teilweise und darüber hinaus tragen viele von ihnen sehr ähnliche Namen. Um Vertauschungen vorzubeugen, wurden für diese Arbeit daher eigene, eindeutige Namen vergeben.

Tabelle 1: Verwendete PCR-Primer

Name Primer	Sequenz	Zielsequenz AccNo. Genbank Referenz
CK-20 F	5'-CGG CGGGGACCTGTTTGT-3'	CK-20 Gen NM_019010.2 Soeth <i>et al.</i> 1996
CK-20 R	5'-CACAAGCATCTGGGCAACACTG-3'	
CK-20 7 F	5'-GGAGCAGTCCAACCTCCAAAC-3'	
CK-20 7 R	5'-GCTCTCCTCAAAAAGGAGCA-3'	
β-Aktin F	5'-ATCTGGCACCACACCTTCTACAATGAGCTGCG-3'	β-Aktin Gen NM_001101.3 Lion 1996
β-Aktin R	5'-CGTCATACTCCTGCTTGCTGATCCACATCTGC-3'	

Für den Nachweis des CK-20-Gens wurde eine sogenannte nested PCR durchgeführt. Dieser Begriff bezeichnet zwei hintereinandergeschaltete PCRs, bei denen das Amplifikat der ersten Reaktion als Template für die zweite Reaktion dient und in der zweiten PCR ein Primerpaar verwendet wird, welches innenliegend zu den Primern der ersten PCR ist. Diese Vorgehensweise erhöht die Sensitivität, so dass auch geringste Mengen von Ausgangsmaterial den Nachweis der Zielsequenz ermöglichen.

Es wurden jeweils 5 µl der aus 2,5 µg RNA synthetisierten cDNA für die erste PCR mit den Primern CK-20 F/R verwendet, welche ein 485 bp großes Produkt des CK-20-Gens amplifizieren. In der anschließenden zweiten PCR wurden die zu den CK-20 F/R Primern innenliegenden Primer CK-20 7 F/R eingesetzt, welche ein 351 bp großes Genfragment generierten.

In allen PCR-Versuchen wurde parallel als Positivkontrolle ein 838 bp langes Fragment des β-Aktin-Gens mit den Primern β-Aktin F/R amplifiziert. Als Negativkontrollen zur Überprüfung auf Kontamination der Reaktionskomponenten dienten die RNA der Zelllinie CHO, die kein CK-20-Gen besitzt sowie ein Reaktionsmix ohne cDNA-Template.

Um falsch-positive und falsch-negative PCR-Ergebnisse möglichst ausschließen zu können und zur Minimierung des Risikos für versuchstechnische Fehler (z. B. Pipettierfehler) wurde jede Lymphknotenprobe zweimal mit unabhängig voneinander angesetzten Reaktionsmischen amplifiziert. Im Falle von widersprüchlichen Ergebnissen wurde die PCR ein drittes Mal wiederholt und dasjenige Ergebnis gewertet, welches in zwei der drei PCR-Wiederholungen übereinstimmte. Im Folgenden sind die PCR-Reaktionsmische und Amplifikationsbedingungen für alle PCRs aufgeführt. Alle Reaktionen wurden in einem Endvolumen von 25 μ l und mit 1,5 mM MgCl₂ und einer Endkonzentration von 200 μ M für jedes dNTP durchgeführt.

Reaktionsmix für die PCR mit Primerpaar CK-20 F/R

5,0 μ l cDNA-Lösung
 12,5 μ l Reaktionslösung (Go Taq®Green Master Mix)
 2,5 μ l PCR-Water
 2,5 μ l Primer CK-20 F
 2,5 μ l Primer CK-20 R

Amplifikationsbedingungen für PCR mit Primerpaar CK-20 F/R

Zeit/Temperatur (s/°C)			Zyklenzahl
Denaturierung	Annealing	Extension	
60/94	60/70	20/71	1
20/94	60/70	pro Zyklus: -1 °C -5 s	9
20/94	20/61	20/71	30
20/94	20/61	300/72	1

Reaktionsmix für die PCR mit Primerpaar 7 F/R

1,0 μ l des Reaktionsmixes der PCR mit Primern CK-20 F/R
 12,5 μ l Reaktionslösung (Go Taq®Green Master Mix)
 6,5 μ l PCR-Water
 2,5 μ l CK-20 7F
 2,5 μ l CK-20 7R

Amplifikationsbedingungen für die PCR mit Primerpaar CK-20 F/R

Zeit/Temperatur (s/°C)			Zyklenzahl
Denaturierung	Annealing	Extension	
300/94	30/60	30/72	1
30/94	30/60	30/72	35
30/94	30/60	300/72	1

Reaktionsmix für die PCR mit Primerpaar β -Aktin F/R

- 1,0 μ l der synthetisierten cDNA
- 12,5 μ l Reaktionslösung (Go Taq®Green Master Mix)
- 6,5 μ l PCR-Water
- 2,5 μ l Primer β -Aktin F
- 2,5 μ l Primer β -Aktin R

Amplifikationsbedingungen für die PCR mit Primerpaar β -Aktin F/R

Zeit/Temperatur (s/°C)			Zyklenzahl
Denaturierung	Annealing	Extension	
20/95	60/60	60/60	30
20/95	60/60	60/72	1

2.10 Bestimmung der Sensitivität des CK-20-Nachweises mittels RT-PCR und Agarosegelelektrophorese

Sowohl die Identität und Menge der Amplifikate als auch die Nachweisempfindlichkeit der PCR wurden mittels Agarosegelelektrophorese überprüft. Agarosegele wurden gewählt, weil für Nachweisverfahren, die deutlich geringere DNA-Mengen detektieren können (z. B. Polyacrylamidgele, radioaktive Nachweise) nicht zur Verfügung standen.

Es wurden 1.5 %tige ethidiumbromidhaltige Gele mit in 1X TBE Puffer (90 mM TRIS, 90 mM Borsäure, 1 mM EDTA, pH 8.0) verwendet. Von den 25 μ l der PCR-Reaktionen wurde rund 2/3 (15 μ l) + 3 μ l Loading Dye aufgetragen und für ca. 70 min

bei ca. 5 bis 6 V/cm getrennt. Als Molekulargewichtsstandard diente eine 100 bp DNA-Leiter (Benchtop ladder, Promega).

Es wurden die geringste Menge Gesamt-RNA bestimmt, die eine auf den Agarosegelele noch sichtbare Menge Amplifikat erzeugte sowie die geringste Anzahl Zellen, aus denen ausreichend RNA für eine PCR gewonnen werden konnte.

Dazu wurden die Gesamt-RNA der Zelllinien RT 4 und RT 112 mit sterilem Wasser 1:100 verdünnt und Mengen zwischen 50 bis 0,75 ng als Template für die cDNA-Synthese eingesetzt. Zur Bestimmung der geringsten notwendigen Anzahl Zellen wurden nach Auszählung unter dem Mikroskop zwischen 3 bis 100 Zellen für die RNA-Präparation eingesetzt und jeweils die gesamte RNA-Ausbeute für die cDNA-Synthese verwendet.

2.11 Statistische Auswertung

Nach fachlicher Beratung und in Absprache mit Dr. Angela Frotzler (Schweizer Paraplegikerzentrum Nottwil, Luzern/Schweiz) wurden die Ergebnisse der Lymphknotenuntersuchung aller 41 Patienten statistisch ausgewertet.

Die deskriptive Analyse und der Test auf Vorliegen von Signifikanz zwischen den positiven und negativen Ergebnissen der Histopathologie und der CK-20-PCR erfolgten mit Hilfe des Chi-Quadrat-Tests.

Mittels binärer logistischer Regression wurde geprüft, ob der Nachweis CK-20-positiver Lymphknoten vom Tumorstadium oder der Gesamtzahl untersuchter Lymphknoten oder dem Adenektomietyp (eingeschränkt vs. ausgedehnt) abhängig war.

Alle Berechnungen wurden mit dem Statistikprogramm Predictive Analytics Software (PASW Statistics, Version 18 von 2009) durchgeführt.

3 ERGEBNISSE

In dieser Arbeit wurde geprüft, ob und in welchem Umfang bereits disseminierte Tumorzellen in Lymphknoten von Patienten mit Harnblasenkarzinom mittels eines PCR-Nachweises des CK-20-Gens erfasst werden können. Die Ergebnisse wurden mit denen der konventionellen histopathologischen Untersuchung verglichen, um die Eignung des CK-20 Gens als Tumormarker beurteilen zu können. Weil die cDNA-Synthese und die anschließende nested PCR für die untersuchte Fragestellung essenziell war, sind im Folgenden zunächst die Versuche zur Methodenetablierung und Überprüfung der Sensitivität anhand von menschlichen Blasenkarzinomzelllinien dargestellt und danach die Ergebnisse der Untersuchung der humanen Lymphknoten (LK).

Wenn die Beschreibung und Interpretation der Ergebnisse eine Unterscheidung zwischen der ersten und zweiten PCR aus denen die nested PCR bestand, nicht zwingend notwendig macht, wird im Folgenden im Hinblick auf Lesefreundlichkeit und Verständlichkeit nur der Begriff CK-20-PCR verwendet.

3.1 Etablierung und Nachweisempfindlichkeit des PCR-Assays für das CK-20 Gen

Um festzustellen, welche Menge Gesamt-RNA bzw. wie viele Zellen für die RNA-Präparation ausreichend waren, um unter definierten Reaktions- und Amplifikationsbedingungen ein auf Agarosegelen noch sichtbares Produkt zu bekommen, wurde RNA der Zelllinie RT 4 und RT 112 in Mengen zwischen 50 ng bis 0,75 ng als Template für die CK-20-PCR und für die Amplifikation des β -Aktin-Genes verwendet. In einer weiteren Versuchsreihe wurde von beiden Zelllinien jeweils die gesamte, aus einer definierten Anzahl von Zellen (100, 75, 50, 25, 20, 10, 5, 3) extrahierte RNA für die cDNA-Synthese eingesetzt. Die Ergebnisse sind in den Abbildungen 3 bis 5 dargestellt. Die geringste RNA-Menge, die ein sichtbares CK-20 bzw. β -Aktin-Amplifikationsprodukt ergab war 1,5 ng (vgl. Abbildung 4 und 5, jeweils Spur 9). Die Bandenintensität war allerdings von 50 ng bis hinunter zu 1,5 ng nahezu identisch; mit 0,75 ng wurde keine sichtbare Produktmenge mehr generiert (vgl. Abbildungen 4 und 5, jeweils Spur 10). Somit lässt sich als Ergebnis festhalten, dass die Nach-

weissgrenze der CK-20-PCR und der β -Aktin-PCR zwischen 1,5 ng und 0,75 ng lag.

Die geringste Anzahl Zellen der Linie RT 4, aus der so viel RNA gewonnen werden konnte, das es ein positives CK-20 Signal gab, war 5; bei nur 3 Zellen gab es keine Amplifikate mehr bzw. zu wenig, um sie auf Agarosegelen sichtbar machen zu können (Abbildung 6).

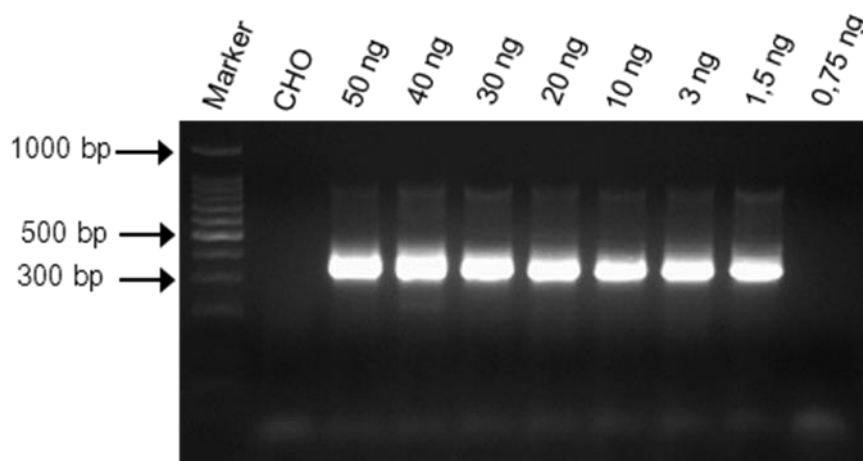


Abbildung 4: Agarosegelelektrophorese (1,5 %) der Amplifikationsprodukte der CK-20-PCR der humanen Blasenkarzinom-Zelllinie RT 112. Die jeweils als Template eingesetzte RNA-Menge ist oberhalb der Spuren 3 bis 10 angegeben.

Spur 1: DNA-Molekulargewichtsstandard 100 bp ladder (Benchtop, Promega),
Spur 2: Negativkontrolle Hamsterzelllinie CHO (besitzt kein CK-20-Gen).

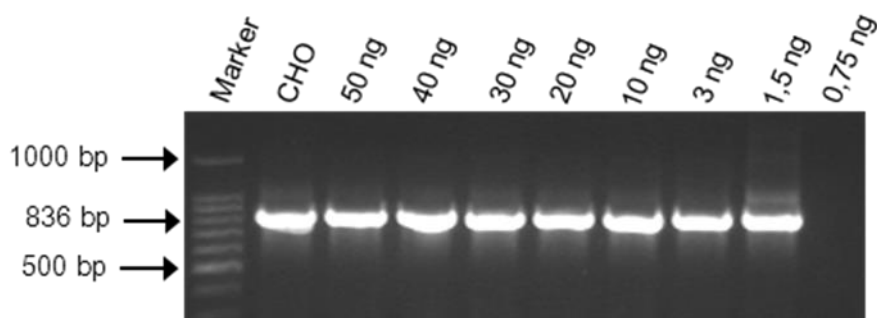


Abbildung 5: Agarosegelelektrophorese (1,5 %) des 836 bp großen β -Aktin-Genfragmentes der humanen Blasenkarzinom-Zelllinie RT 112. Die für die PCR (Primer β -Aktin F/R) jeweils verwendeten RNA-Mengen sind oberhalb der Spuren 3 bis 10 angegeben.

Spur 1: DNA-Molekulargewichtsstandard 100 bp ladder (Benchtop, Promega),
Spur 2: Positivkontrolle Hamsterzelllinie CHO

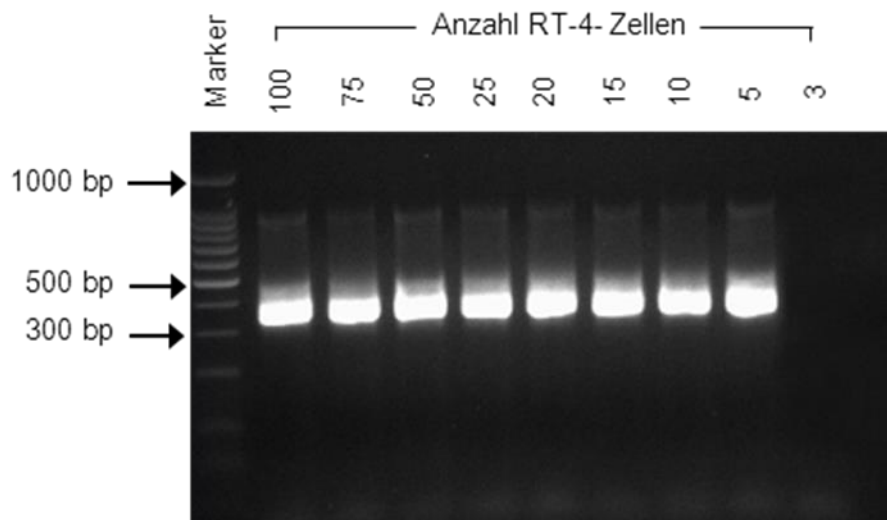


Abbildung 6: Agarosegelelektrophorese (1,5 %) der Amplifikationsprodukte des CK-20-Gens der humanen Blasenkarzinom-Zelllinie RT 4.
Die Anzahl der für die jeweilige RNA-Präparation verwendeten Zellen ist oberhalb der Spuren 2 bis 10 angegeben. Die gesamte extrahierte RNA-Menge wurde für die cDNA-Synthese (RT-PCR) eingesetzt.
Spur 1: DNA-Molekulargewichtsstandard 100 bp ladder (Benchtop, Promega).

Abbildung 7 zeigte exemplarisch einige Ergebnisse von CK-20-PCRs mit RNA von Lymphknotengewebe. Von den 7 gezeigten Proben waren zwei (5a, 5b1) histopathologisch negativ. Die Bandenintensitäten der PCR-Produkte waren bei der überwiegenden Mehrheit der Lymphknotenproben gleich stark wie bei denjenigen mit RNA aus Zelllinien.

Lediglich bei ca. 1/3 der Proben war sie geringer, aber immer noch deutlich sichtbar (vergleichbar der letzten Gelspur, Abbildung 7). Die geringere Intensität kann bei einer Methode wie der PCR, in der viele Parameter und Substanzen interagieren und sich gegenseitig beeinflussen, verschiedene Gründe haben. Doch lässt sich auf jeden Fall sagen, dass durch die gewählte Form der Gewebeaufbereitung und RNA-Extraktion offensichtlich keine die PCR inhibierenden Substanzen in relevanten Mengen eingetragen worden waren und die mit der nested PCR erzielte Empfindlichkeit ausreichend gross war.

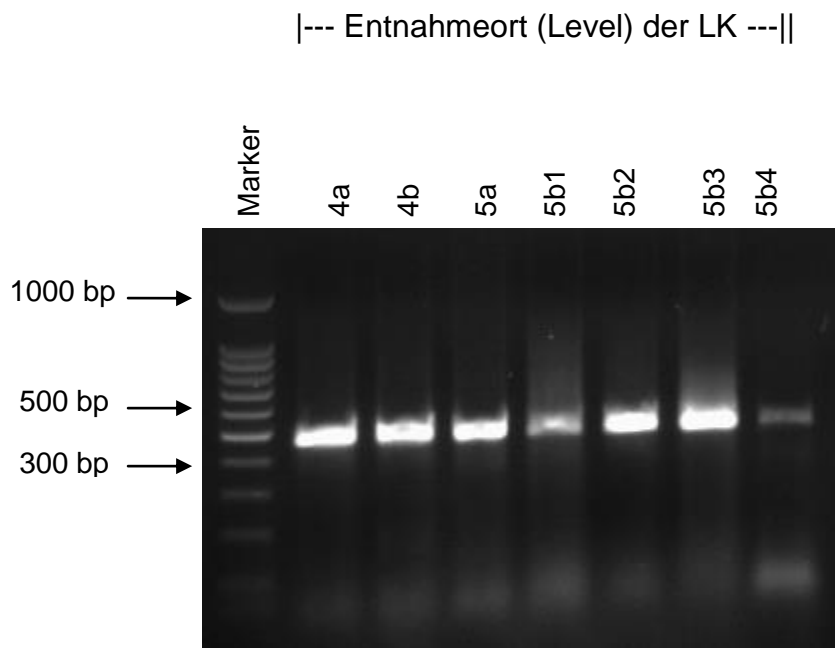


Abbildung 7: Agarosegelelektrophorese (1,5 %) der Amplifikationsprodukte des CK-20-Gens aus sieben Lymphknoten (LK) aus Level 4 und 5. Fünf Knoten waren histopathologisch positiv (4a, 4b, 5b2, 5b3, 5b4), zwei waren negativ (5a, 5b1).
Spur 1: DNA-Molekulargewichtsstandard 100 bp ladder (Benchtop, Promega).

Alle CK-20-PCRs mit RNA aus den Lymphknoten wurden mit den in Kapitel 2.9 detailliert beschriebenen Negativ- und Positivkontrollen durchgeführt, um sowohl Kontaminationen auszuschließen (CHO-Zelllinie ohne CK-20-Gen und Reaktionsmix ohne cDNA/RNA) als auch sicherzustellen, dass Menge und Qualität der RNA ausreichend waren (β -Aktin-Gen aus der Harnblasenkarzinom-Zelllinie RT 112).

Darüber hinaus wurden von jeder Patientenprobe parallel zwei CK-20-PCRs mit jeweils unabhängig voneinander angesetzten Reaktionsmischen durchgeführt. In 107 der 751 Proben gab es in einer der beiden PCRs kein Amplifikat. Die PCR mit diesen Proben wurden ein drittes Mal wiederholt. In die Auswertung ging dasjenige Ergebnis ein, welches in zwei der drei Wiederholungen identisch war.

3.2 Zusammensetzung des Patientenkollektives und Zusammenstellung des Probenmaterials

Insgesamt wurden 41 Patienten mit einem muskelinvasiven Harnblasenkarzinom in die vorliegende Untersuchung aufgenommen. Die Gruppe bestand aus 33 Männern (80,5 %) und acht Frauen (19,5 %). Zum Operationszeitpunkt betrug das Durchschnittsalter 67,2 Jahre. Die Altersverteilung reichte von 41 bis 84 Lebensjahren. Es waren zwei Häufigkeitsgipfel zu erkennen, der erste zwischen 51 – 60 Jahren und der zweite zwischen 71 – 80 (siehe Abbildung 8).

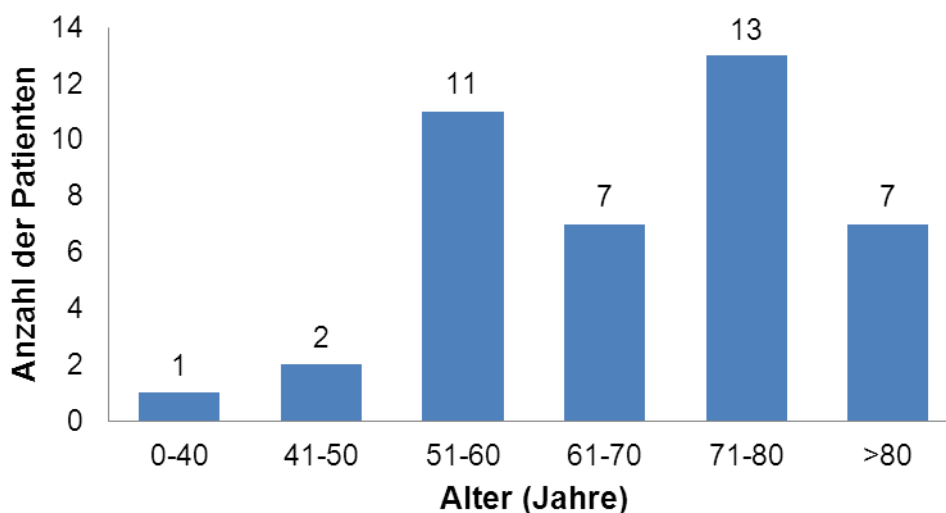


Abbildung 8: Häufigkeitsverteilung des Alters von 41 Patienten mit einem muskelinvasiven Harnblasenkarzinom zum Zeitpunkt der Operation.

Die Lymphknoten wurden den 41 Patienten im Universitätsklinik TU München Rechts der Isar im Rahmen der multizentrischen randomisierten LEA-Studie entnommen. Im Durchschnitt wurden pro Patient 19,5 Lymphknoten entnommen und anhand des LEA-Schemas (vgl. Abbildung 2) exakt kartographiert. In Abbildung 9 ist dargestellt, nach welchen Kriterien aus allen entnommenen Knoten das endgültige Probenet für die histopathologischen und molekularen Analysen zusammengestellt wurde. Insgesamt waren 801 Lymphknoten entnommen worden. Davon wurden 33 als reines Fettgewebe klassifiziert und verworfen. Von den restlichen 768 wurde die cDNA hergestellt und ihre Qualität und Menge mittels Amplifikation des β -Aktin Genes über-

prüft, was indirekt auch Aufschluss über die für PCR geeignete Qualität und Menge der extrahierten Gesamt-RNA gibt. 17 Proben lieferten kein Amplifikat, was auf eine zu geringe Ausgangsmenge cDNA hinweisen kann. Diese geringe Menge wäre für die Zahl aller weiteren Experimente nicht ausreichend gewesen und die Proben wurden deshalb verworfen. Somit konnten letztlich 751 Lymphknoten histopathologisch und mit der CK-20-PCR untersucht werden.

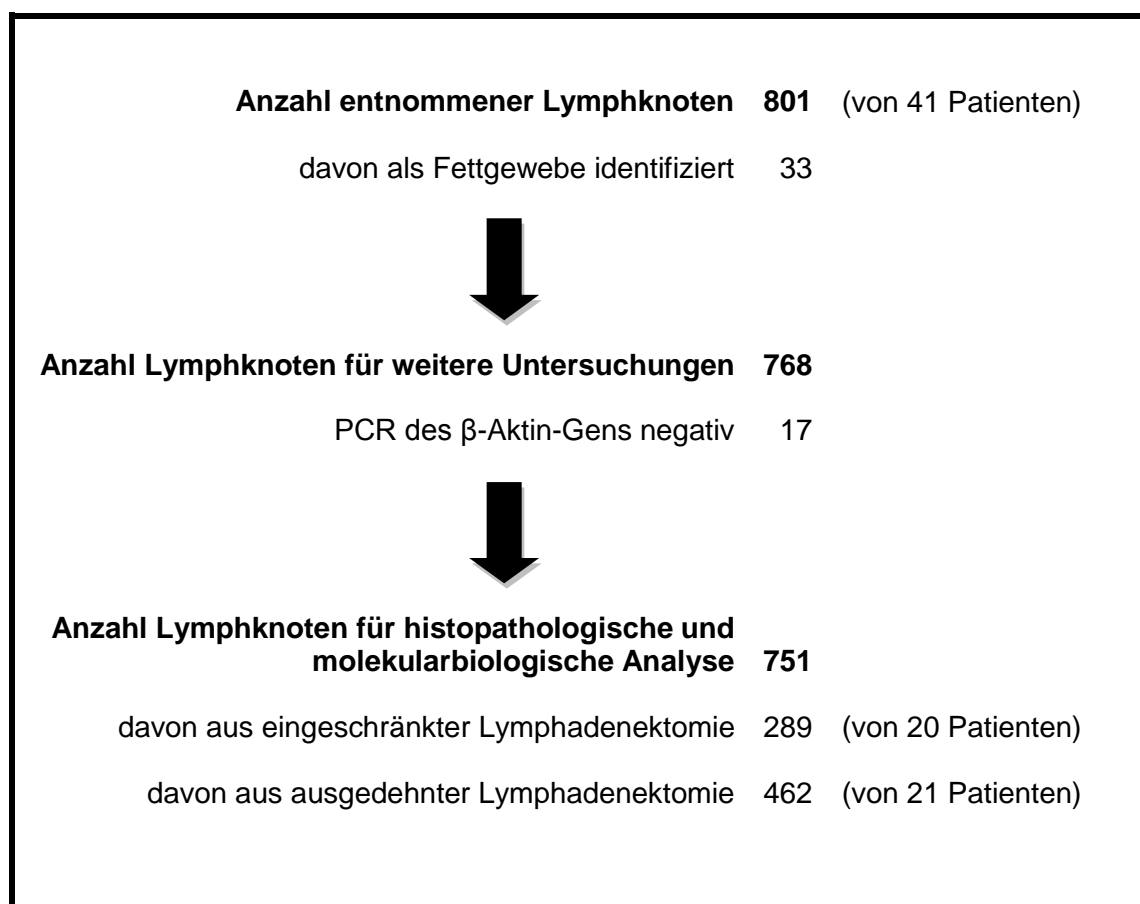


Abbildung 9: Schematische Übersicht über die Zusammenstellung des Probenmaterials.

In der Tabelle 2 sind die 751 letztlich untersuchten Lymphknoten in Abhängigkeit vom pT-Stadium und Lymphadenektomietyl aufgeschlüsselt.

Tabelle 2: Häufigkeitsverteilung der 751 untersuchten Lymphknoten in Abhängigkeit vom pT-Stadium und dem Lymphadenektomietyl (E-LA = eingeschränkte Lymphadenektomie; A-LA = ausgedehnte Lymphadenektomie).

pT-Stadium	E-LA		A-LA		Gesamt	
	Anzahl Pat.	Anzahl LK	Anzahl Pat.	Anzahl LK	Anzahl Pat.	Anzahl LK
pa, pTis, pT1	6	125	6	77	12	202
pT2 – pT4	14	231	15	318	29	549

3.3 Ergebnisse der Histopathologie und der CK-20-PCR

Die Ergebnisse der histopathologischen und molekularen Untersuchung sind in Tabelle 3 patientenbezogen und unter Berücksichtigung des pT-Stadiums und des Typs der Lymphknotenadenektomie zusammengefasst. Bei 20 von den 41 Personen (9 mit eingeschränkter, 11 mit ausgedehnter Adenektomie) mit insgesamt 356 Lymphknoten wurden weder histopathologisch noch mit der PCR Metastasen nachgewiesen (Tabelle 3, A). Die restlichen 21 Patienten (395 LK) waren histopathologisch und/oder für CK-20 positiv (Tabelle 3 B und C). Alle histopathologisch positiven Lymphknoten waren auch CK-20 positiv. Angesichts der hohen Empfindlichkeit der PCR-Methode generell und des hier etablierten empfindlichen CK-20-Assay (vgl. Kapitel 3.1) musste dies erwartet werden. Wäre es nicht der Fall, ließen sich keine validen Schlußfolgerungen aus den Daten ziehen, weil eine nicht ausreichende Empfindlichkeit des PCR-Assays z. B. aufgrund suboptimaler Reaktionsbedingungen oder anderer Versuchsfehler angenommen werden müsste und der Assay dann keinen zusätzlichen Informationsgewinn brächte.

Alle im Folgenden gemachten prozentualen Angaben beziehen sich auf die Gruppe der 21 Patienten mit eingeschränkter (11 Patienten) bzw. mit ausgedehnter (10 Patienten) Lymphadenektomie und einem positiven Befund. Mit Ausnahme von pT2b und pT4b waren unter diesen 21 Patienten alle Tumorstadien vertreten.

Für die Darstellung der Ergebnisse von Patienten mit positiven Befunden (Tabelle 3, B und C) wurde innerhalb der jeweiligen Lymphadenektomiegruppe (eingeschränkte Adenektomie, E-LA; ausgedehnte Adenektomie, A-LA) unterschieden zwischen Patienten, die histopathologisch und CK-20 positive Lymphknoten aufwiesen (pN1/pN2 = Gruppen E-LA 1 bzw. A-LA 1) und denjenigen, bei denen alle Lymphknoten histopathologisch negativ waren (pN0 = Gruppen E-LA 2 und A-LA 2) und deren Metastasen ausschließlich mit der CK-20-PCR nachgewiesen wurden.

Tabelle 3: Ergebnisse der histopathologischen Untersuchung und der CK-20-PCR von insgesamt 751 Lymphknoten (LK) von 41 Patienten. Bei 20 Patienten war eine eingeschränkte und bei 21 eine ausgedehnte Lymphadenektomie durchgeführt worden. Für Patienten mit nachweisbaren Metastasen (B und C) ist zusätzlich die Lymphknotendichte (Verhältnis befallener zu entnommenen LK) angegeben.

- A:** 20 Patienten ohne nachweisbare Metastasen (histopathologisch und für CK-20 negativ).
- B:** 11 Patienten mit eingeschränkter Lymphknotenadenektomie (E-LA).
 Patientengruppe E-LA 1: histopathologisch negative (pN0) und positive Lymphknoten (pN1/pN2).
 Patientengruppe E-LA 2: alle Lymphknoten histopathologisch negativ (pN0).
- C:** 10 Patienten mit ausgedehnter Lymphknotenadenektomie (A-LA).
 Patientengruppe A-LA 1: histopathologisch negative (pN0) und positive Lymphknoten (pN1/pN2).
 Patientengruppe A-LA 2: alle Lymphknoten histopathologisch negativ (pN0).

A Patienten ohne nachweisbare Lymphknotenmetastasen

E-LA	Patient Nr.	13	2	18	24	35	14	20	28	36
	pT-Stadium	4a	2a	3b	4a	1	2a	3b	3a	is
	Anzahl LK $\Sigma = 135$	6	10	10	13	14	15	18	24	25

A-LA	Patient Nr.	21	16	1	38	33	26	40	32	31	23	19
	pT-Stadium	3b	2a	3a	1	2a	1	2a	is	2a	is	2a
	Anzahl LK $\Sigma = 221$	8	10	13	15	18	19	19	21	27	31	40

Fortsetzung Tabelle 3:

B 11 Patienten mit eingeschränkter Lymphknotenadenektomie (E-LA) und insgesamt 154 entnommenen Lymphknoten (LK).

Pat.-gruppe	E-LA-1 pN1/pN2				E-LA-2 pN0						
	Pat. Nr.	15	37	34	41	6	8	4	5	30	22
pT-Stadium	3a	4a	1	3b	a/is	a/is	a/is	3a	2a	2a	3b
Anzahl LK	8	10	13	23	9	9	12	13	16	20	21
Histopath. positiv	2	2	4	1	-	-	-	-	-	-	-
PCR CK-20 positiv	2	8	7	10	3	8	4	9	4	2	4
Histopath. negativ	6	8	9	22	9	9	12	13	16	20	21
PCR CK-20 negativ	6	2	6	13	6	1	8	4	12	18	17
LK-Dichte (%)	25	80	53,8	43,5	33,3	88,9	33,3	69,2	25	10	19

C 10 Patienten mit ausgedehnter Lymphknotenadenektomie (A-LA) und insgesamt 241 entnommenen Lymphknoten (LK).

Pat.-gruppe	A-LA-1 pN1/pN2		A-LA-2 pN0							
	Pat. Nr.	3	29	12	17	9	39	10	7	11
pT-Stadium	3a	3b	3b	1	a/is	3b	4a	3b	2a	3b
Anzahl LK	16	42	16	16	18	19	20	21	35	38
Histopath. positiv	9	1	-	-	-	-	-	-	-	-
PCR CK-20 positiv	13	12	1	1	7	1	7	5	13	1
Histopath. negativ	7	41	16	16	18	19	20	21	35	38
PCR CK-20 negativ	3	30	15	15	11	18	13	16	22	37
LK-Dichte (%)	81,3	28,6	6,3	6,3	68,2	5,3	35	23,8	37,1	2,6

Bei 7 von 11 Patienten mit eingeschränkter und 8 von 10 mit ausgedehnter Lymphknotenadenektomie detektierte lediglich die CK-20-PCR Metastasen (Gruppen E-LA 2 und A-LA 2). Betrachtet man die Lymphknotendichte pro Patient, so stechen die Patienten 29 (Gruppe A-LA 1) und 41 (Gruppe E-LA 1) heraus: Ihre Lymphknoten-

dichte betrug 28,6 % bzw. 43,5 %, doch waren davon anteilmäßig nur 2,4 % (Pat. 29) bzw. 4,3 % (Pat. 41) auf die histopathologisch positiven Lymphknoten zurückzuführen. Die zirka zehnfach bis zwölffach höhere Dichte, die auf die parallele Verwendung der CK-20-PCR zurückzuführen war, zeigt nachdrücklich den Vorteil dieses Assays im Hinblick auf eine möglichst exakte Erfassung des Ausmaßes der Metastasierung. Bei 3 weiteren Patienten dieser beiden Gruppen war dieser Unterschied zwar nicht so extrem, doch immer noch markant (Pat.3: 1,4-fach, Pat. 34: 1,7-fach, Pat 37: 1,7-fach). Lediglich bei Patient 15 hatte die CK-20-PCR nicht mehr befallene Lymphknoten detektiert als die Histopathologie. Bei den Patienten, die keinerlei histopathologisch positive Lymphknoten aufwiesen, schwankte die Lymphknotendichte zwischen 2,6 % (Pat. 25, ausgedehnte Adenektomie, pT3b) und 88,9 % (Pat. 8, eingeschränkte Adenektomie, pTa/Tis).

In Tabelle 4 ist die prozentuale Auswertung der Ergebnisse zusammengefasst. Mit der PCR wurden in 30,9 % der Fälle (122 von 395 untersuchten Lymphknoten) Mikrometastasen nachgewiesen gegenüber nur 4,8 % (19 LK) mit der Histopathologie. Somit detektierte die CK-20-PCR im Durchschnitt in 26,1 % der histopathologisch negativ befundeten Lymphknoten Tumorzellen.

Unabhängig vom Typ der Lymphadenektomie unterschieden sich die Gruppen der Patienten mit histologisch positiven bzw. negativen Lymphknoten signifikant in der Häufigkeit der CK-20 positiven Befunde ($p = 0,021$, exakter Test nach Fisher).

Tabelle 4: Vergleichende prozentuale Auswertung der Ergebnisse der histopathologischen Untersuchung und der CK-20-PCR von insgesamt 395 Lymphknoten von 11 Patienten mit eingeschränkter Lymphadenektomie (E-LA) und 10 Patienten mit ausgedehnter Lymphadenektomie (A-LA).

Befund	Anzahl Lymphknoten (%)		
	E-LA n = 154	A-LA n = 241	E-LA und A-LA n = 395
Histo positiv und CK-20 positiv	9 (5,8)	10 (4,1)	19 (4,8)
Histo negativ und CK-20 positiv	52 (33,8)	51 (21,2)	103 (26,1)
Summe CK-20 positiv	61 (39,6)	61 (25,3)	122 (30,9)

In Tabelle 5 ist die Detektionsrate der CK-20-PCR in Abhängigkeit vom pT-Stadium und Anzahl der Patienten und Lymphknoten dargestellt. Der vollständige Datensatz jedes Patienten unter Berücksichtigung des Lymphadenektomietyps, des pT-Stadiums und der Anzahl der Lymphknoten pro Level ist im Anhang in den Tabellen 7, 8 und 9 einsehbar. Zusätzlich zu den Detektionsraten pro pT-Stadium ist in Tabelle 5 auch die Rate für die oberflächlichen und die muskelinvasiven Karzinome angegeben. Die Auswertung mittels binärer logistischer Regression zeigte, dass es für alle pT-Stadien keinen Zusammenhang zwischen dem Regressor TNM-Stadium ($p = 0,279$) und der Anzahl positiver CK-20-Befunde gab.

Tabelle 5: Prozentualer Anteil der histopathologisch negativen (pN0) und gleichzeitig CK-20-positiven Lymphknoten ($n = 283$) von 15 Patienten aufgeschlüsselt nach dem pT-Stadium.

pT-Stadium	Anzahl Patienten (n = 15)	Anzahl LK (n = 283)	LK Histopath. negativ CK-20 positiv	
			Anzahl	%
Ta,Tis	4	48	22	45,8
T1	1	16	1	6,3
T2a	3	71	19	26,8
T3a/b	6	128	21	16,4
T4a	1	20	7	35
Ta, Tis, T1	5	64	23	35,9
T2a, T3a/b, T4a	10	219	47	21,5

3.4 Unterschiede in der Tumordetektion zwischen den verschiedenen anatomischen Feldern

Der Unterschied in der Detektionsrate der CK-20-PCR war zwischen Patienten mit eingeschränkter bzw. ausgedehnter Adenektomie nicht signifikant ($p = 0,495$). Es sollte jedoch zusätzlich geprüft werden, ob es eventuell einen Zusammenhang zwischen der Detektionsrate und den anatomischen Feldern gab, aus denen die jeweiligen Lymphknoten entnommen worden waren. Dazu wurden die Ergebnisse für jeden Level getrennt ausgewertet (vgl. Tabelle 6) und grafisch als Säulendiagramm (Abbildung 10) dargestellt. Im Anhang (Tabellen 7, 8 und 9) sind die Daten der Tabelle 5

detaillierter patientenbezogen und unter Berücksichtigung des Tumorstadiums aufgeführt.

Unabhängig vom histopathologischen Befund waren bei der eingeschränkten Lymphadenektomie 33,9 % der Knoten positiv für CK-20. Im ausgedehnten Feld waren es 21,3 %. Die meisten CK-20-positiven Lymphknoten befanden sich in der rechten (Level 9) und linken (Level 11) Region des *N. obturatorius*, gefolgt vom Bereich lateral der rechten *A. iliaca externa* (Level 5). Auch die Mehrheit der 19 Lymphknoten von den sechs Patienten, die gleichzeitig histopathologisch positiv waren, befanden sich in Level 9 (5 Proben) und Level 5 (4 Proben).

Tabelle 6: Häufigkeit der positiven CK-20-Befunde für 395 kartografierte Lymphknoten (21 Patienten) in Abhängigkeit vom Entnahmeort.
(E-LA: eingeschränkte Lymphknotenadenektomie; zusätzliche Level: Level, die bei einer ausgedehnten Adenektomie hinzukommen).

	Level	Anzahl LK Histopath. positiv	Anzahl LK Histopath. negativ	Anzahl LK CK-20 positiv	Anzahl LK CK-20 negativ	Σ LK	Prozent CK-20 positiv	
E-LA-Level	5	4	63	17	50	67	25,4	33,9
	7	2	56	12	46	58	20,7	
	9	5	75	42	38	80	52,5	
	11	-	64	19	45	64	29,7	
	13	2	15	8	9	17	47,1	
	14	1	14	4	11	15	26,7	
Zusätzliche Level	1	-	8	1	7	8	12,5	21,3
	2	-	8	4	4	8	50,0	
	3	-	18	2	16	18	11,1	
	4	2	15	4	13	17	23,5	
	6	1	24	5	20	25	20,0	
	8	2	6	3	5	8	37,5	
	10	-	2	-	2	2	-	
	12	-	8	1	7	8	12,5	

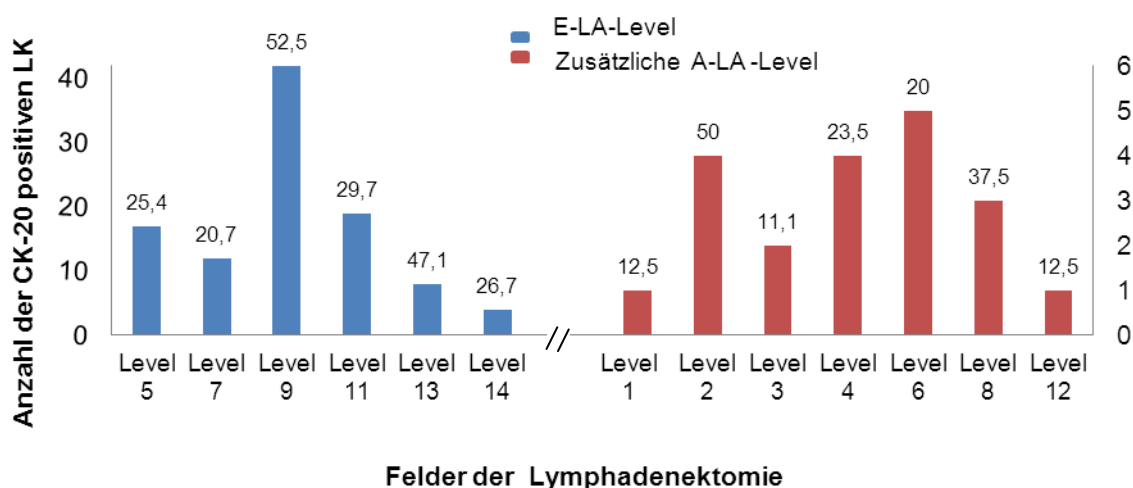


Abbildung 10: Häufigkeit der CK-20-positiven Lymphknoten (LK, n = 395) in Abhängigkeit ihrer Zuordnung zu Feldern der eingeschränkten und ausgedehnten Lymphadenektomie (E-LA, A-LA). Die ebenfalls zur ausgedehnten Adenektomie zählenden Level 10 fehlt in der Grafik, weil es keinen positiven Befund gab. Zahlenangabe oberhalb der Säulen: Prozent CK-20-positive LK/Level.

In der Fachliteratur werden auch Zusammenhänge zwischen dem Auftreten befallener Lymphknoten und dem Ort ihrer Lokalisation diskutiert. Um die Lokalisation der hier untersuchten Lymphknoten daher im Hinblick auf die Ergebnisdiskussion möglichst anschaulich darzustellen (ohne Rückgriff auf viele einzelne anatomische Beschreibungen), wurden sie auf der dieser Arbeit zugrundeliegenden topografisch-anatomischen Karte der LEA-Studie abgebildet. Dafür wurden die Ergebnisse zum einen für die Patienten mit bzw. ohne histopathologisch positive Befunde (Abbildungen 11 und 12) zusammengestellt und zum anderen unter Bezug auf den Typ der Lymphknotenadenektomie (Abbildung 13 und 14).

Die Abbildung 11 zeigt die Ergebnisse für die 15 Patienten mit negativem histopathologischen Befund. In den rechtsseitigen Leveln der eingeschränkten Lymphknotenadenektomie fanden sich insgesamt 27 für CK-20 positive Knoten und linksseitig 30. In den zusätzlichen Leveln der ausgedehnten Adenektomie wurden insgesamt 13 befallene Lymphknoten identifiziert; davon lagen 3 rechts, 5 links und 5 in den in der Körpermitte liegenden Leveln 2 und 8.

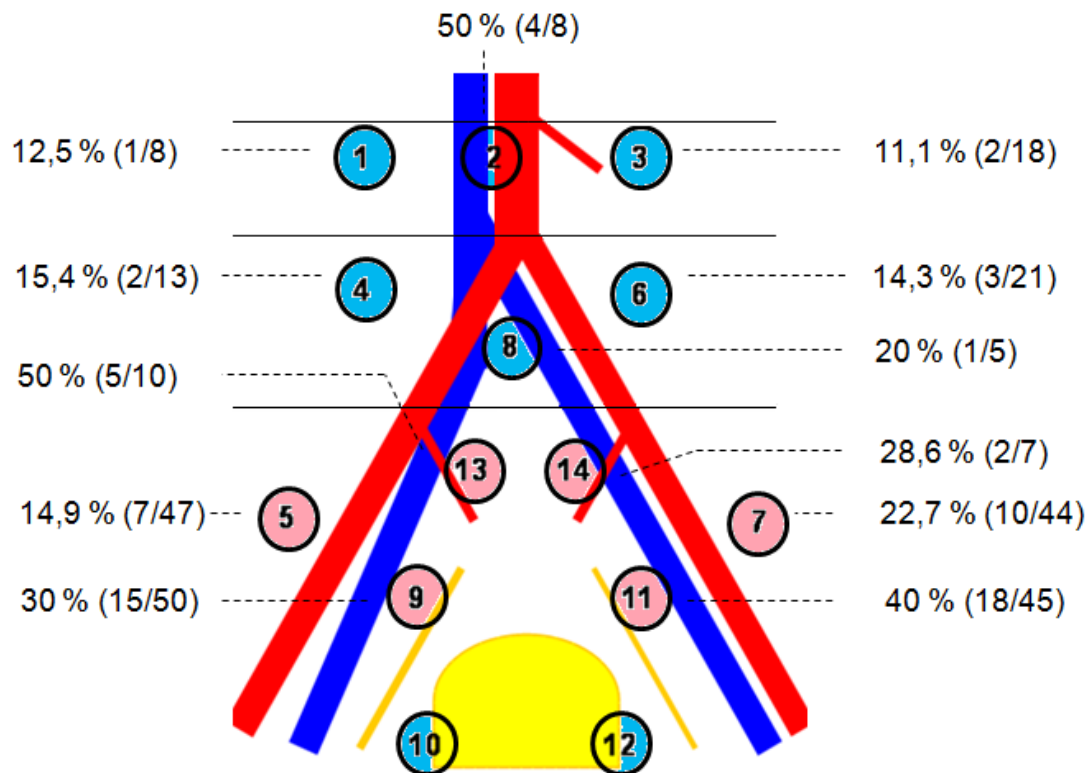


Abbildung 11: Häufigkeit und topografisch-anatomische Zuordnung der CK-20-positiven Lymphknoten (LK) der 15 Patienten mit einem negativen histopathologischen Befund.

Angaben/Level: Prozent LK CK-20-positiv (Anzahl CK-20-positiv/LK gesamt)

- Felder der eingeschränkte Lymphadenektomie
- Zusätzliche Felder bei ausgedehnter Lymphadenektomie
- Harnblase

Nur bei 6 der 41 Patienten waren insgesamt 19 Lymphknoten histopathologisch positiv. In den 102 negativen Proben wies die CK-20-PCR jedoch ebenfalls Mikrometastasen nach. Der überwiegende Teil von ihnen (86 %) fand sich in den Feldern der eingeschränkten Adenektomie; insgesamt stammten 51 aus der linken und 61 aus der rechten Körperhälfte (Abbildung 12). Die der Abbildung zugrunde liegenden Daten sind im Anhang in Tabelle 9 detailliert aufgelistet.

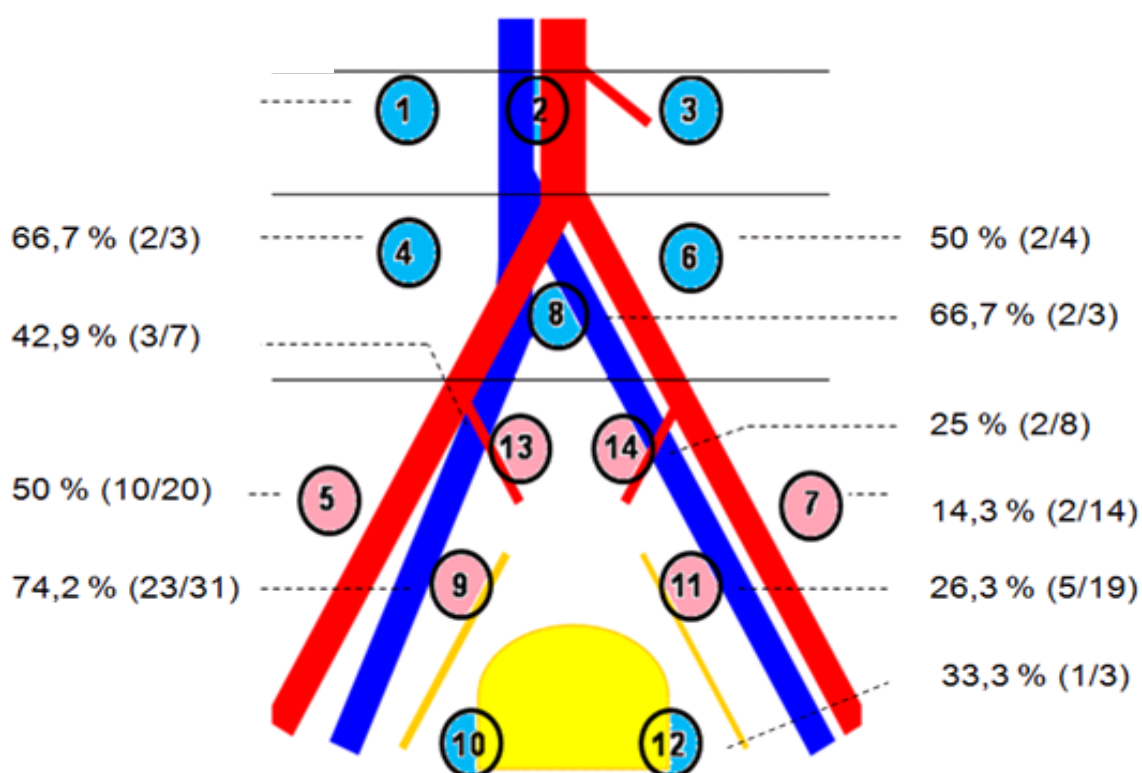


Abbildung 12: Häufigkeit und topografisch-anatomische Zuordnung der CK-20-positiven Lymphknoten (LK) von 6 Patienten mit einem positiven histopathologischen Befund.

Angaben/Level: Prozent LK CK-20-positiv (Anzahl CK-20-positiv/LK gesamt)

- Felder der eingeschränkte Lymphadenektomie
- Zusätzliche Felder bei ausgedehnter Lymphadenektomie
- Harnblase

Abbildung 13 zeigt die anatomische Verteilung der CK-20-positiven Lymphknoten bei 11 Patienten mit eingeschränkter Lymphknotenadenektomie. Auf der linken Körperseite lagen 68 und auf der rechten 86 für CK-20 positive Lymphknoten.

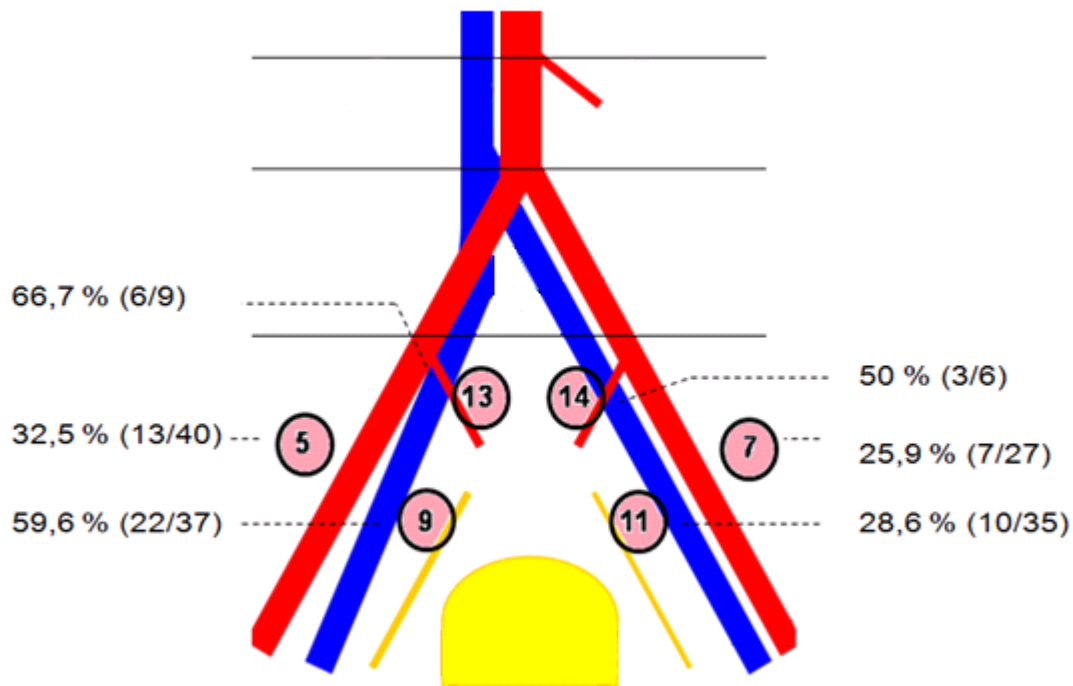


Abbildung 13: Häufigkeit und topografisch-anatomische Zuordnung der CK-20-positiven Lymphknoten (LK) von 11 Patienten mit eingeschränkter Lymphknotenadenektomie.
Angaben/Level: Prozent LK CK-20-positiv (Anzahl CK-20-positiv/LK gesamt)

- Felder der eingeschränkte Lymphadenektomie
- Harnblase

Bei den 10 Patienten mit ausgedehnter Lymphknotenadenektomie (Abbildung 14) war die Verteilung auf die Körperseiten ähnlich: Rechts waren 31 von 105 Lymphknoten (29,5 %) positiv, links 26 von 128 (20,3 %).

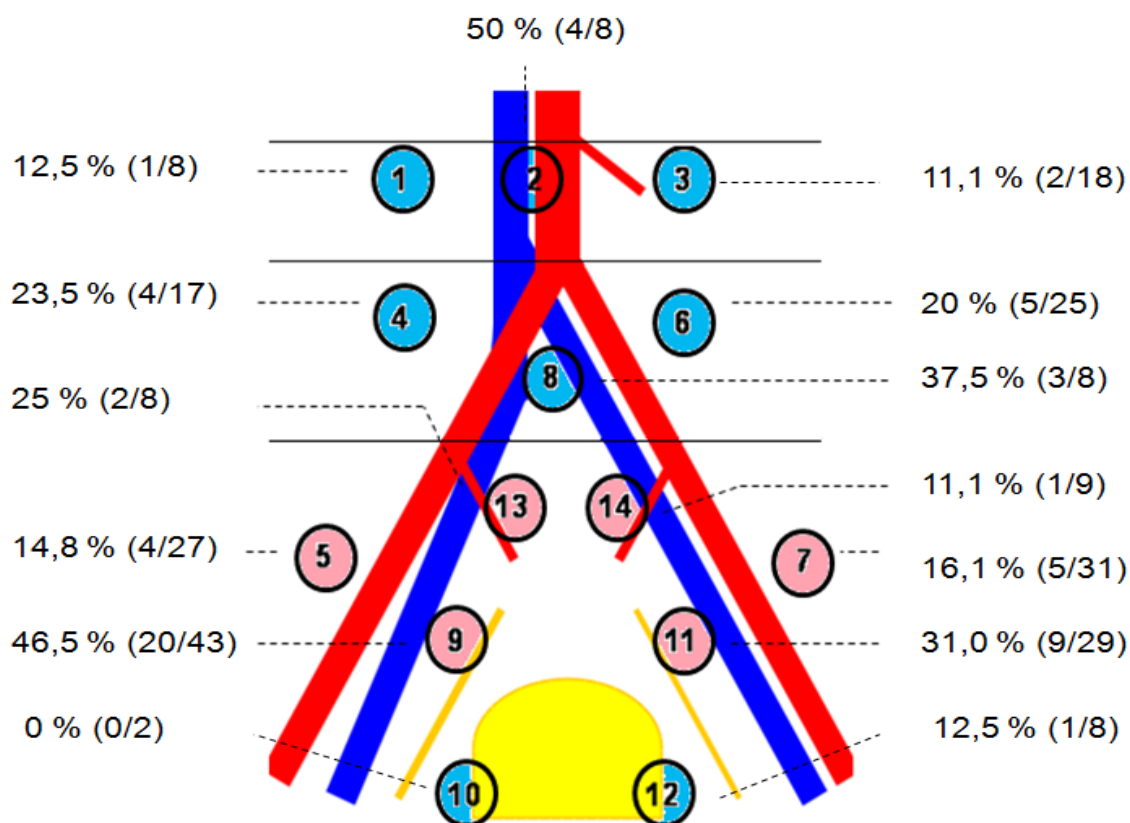


Abbildung 14: Häufigkeit der CK-20 positiven Lymphknoten der 10 Patienten mit ausgedehnter Lymphadenektomie.
Angaben/Level: Prozent LK CK-20-positiv (Anzahl CK-20-positiv/LK gesamt)

- Felder der eingeschränkte Lymphadenektomie
- Zusätzliche Felder bei ausgedehnter Lymphadenektomie
- Harnblase

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass es keine auffällig großen Unterschiede in der Häufigkeit von Mikrometastasen auf der rechten bzw. linken Körperseite gab.

4 DISKUSSION

Mit dieser Arbeit sollte ein Beitrag zur Erfassung von Mikrometastasen in Lymphknoten von Harnblasenpatienten geleistet werden, um Risikopatienten möglichst frühzeitig zu erkennen. Zu diesem Zweck wurden Proben von 41 Patienten nach radikaler Zystektomie sowohl histopathologisch als auch mit einer empfindlichen PCR-Methode untersucht. Die jeweiligen Detektionsraten wurden verglichen und im Hinblick auf eventuelle Korrelationen mit dem Tumorstadium und dem Adenektomietyp (eingeschränkt bzw. ausgedehnt) statistisch ausgewertet. Für die exakte topografisch-anatomische Zuordnung der entnommenen Knoten wurde das für die LEA-Studie entwickelte Schema zugrunde gelegt (Arbeitsgemeinschaft urologische Onkologie 2002, http://www.auo-online.de/pdf/P_1105.pdf).

Es wurde das Gen Cytokeratin 20 (CK-20) verwendet, welches bereits seit langem als epithelialer Marker für einige Karzinome gilt (Moll 1992). Das Gen wird auch in Tumorzellen des Harnblasenkarzinoms exprimiert (Retz *et al.* 2001, Ribal *et al.* 2006) und seine eventuelle Eignung als prognostischer und diagnostischer Marker für den klinischen Alltag wird seit geraumer Zeit vergleichend mit verschiedenen Nachweisverfahren (u. a. Zytogenetik, Immunohistochemie, *In-situ*-Hybridisierung, PCR) untersucht. Allerdings wurden in der Mehrheit der veröffentlichten Studien Urin-, Knochenmark- oder Blutproben verwendet (Blut/PCR: Funaki *et al.* 1998; Blut/PCR: Retz 2001; Knochenmark und Blut/PCR: Mumme 2005; Knochenmark/PCR: Rotering 2006; Knochenmark und Blut: Dieler 2008). Der Vorteil dieser Proben liegt in ihrer einfachen und geringgradig invasiven Entnahme. Andererseits gibt es Hinweise darauf, dass die Expression des Gens nicht auf Epithelien beschränkt ist. Es wurde mittels RT-PCR auch in Granulozyten aus peripherem Blut und Knochenmark gesunder Personen nachgewiesen; nur in den Monozyten, deren Präparation jedoch aufwendiger ist, wurde es nicht exprimiert (Jung *et al.* 1999). Dieses Ergebnis zeigt beispielhaft, wie wichtig die Auswahl der Probenmatrix und der jeweiligen Aufarbeitungsmethoden für die Planung von Studien ist, um valide und klinisch relevante Ergebnisse zu erhalten.

Andere Studien verwendeten Lymphknotengewebe, doch handelte es sich dabei oft um ausschliesslich immunohistochemische Nachweise (Jiang *et al.* 2001, Jensen *et al.* 2010, Rullier *et al.* 2000). Bisher gibt es nur wenige Untersuchungen über die Ex-

pression des CK-20-Genes in Lymphknotengewebe von Harnblasenpatienten (Wu *et al.* 2005, Autenrieth *et al.* 2008). Die Lymphknoten waren im Rahmen notwendiger radikaler Zystektomien entnommen worden. Die nachträgliche Untersuchung mit einer hochempfindlichen Methode wie der PCR kann Aufschluss über das Vorhandensein von Mikrometastasen geben und somit Rückschlüsse auf das individuelle Rezidiv-Risiko ermöglichen.

Bewertung der Methodik

Bei den PCR-Assays der oben genannten Studien handelte es sich – wie auch in dieser Arbeit - um eine Reverse-Transkriptase-PCR (RT-PCR) mit anschließender nested PCR. Die nested PCR erhöht die Empfindlichkeit des Nachweises, weil auch aus geringen Mengen Ausgangsmaterial eine große und somit mit einfachen Methoden (wie z. B. Gelelektrophorese) nachweisbare Produktmenge gewonnen werden kann. Aufgrund der großen Empfindlichkeit ist die Kontaminationsgefahr und somit das Auftreten falsch-positiver Ergebnisse bei nested PCRs besonders hoch. Um Kontaminationen mit Sicherheit erkennen zu können, waren routinemäßig in allen PCR-Läufen ausser der Positivkontrolle (β -Aktin) auch zwei Negativkontrollen (Zelllinie ohne CK-20-Gen und Wasserkontrolle ohne RNA/cDNA) mitgeführt worden. Darüber hinaus wurde jede Probe zweimal mit unabhängig voneinander angesetzten Reaktionsmischen untersucht. Die Ergebnisse können als korrekt und gesichert gelten, weil alle Kontrollen immer einwandfrei waren.

Um darüber hinaus auch die Zahl falsch-negativer histopathologischer Befunde so gering wie möglich zu halten, wurden die Lymphknoten nicht halbiert, sondern die Histopathologen erhielten ihren 50%tigen Anteil in Form von zwei Gewebeanteilen aus verschiedenen Bereichen des Knotens. Dies sollte die Wahrscheinlichkeit erhöhen, Tumorzellen auch in einem nur teilweise befallenen Lymphknoten entdecken zu können. Ein Teil der mit diesen Methoden generierten Daten wurde bereits veröffentlicht (Autenrieth *et al.* 2008).

Im Folgenden wird zunächst auf die Nachweisgrenze der für diese Arbeit etablierten CK-20-PCR eingegangen. Anschliessend werden die Detektionsraten der immunohistochemischen und des PCR-Nachweises verglichen und auf eine mögliche Korrelation mit den Tumorstadien und der anatomischen Lokalisation der Lymphknoten eingegangen.

4.1 Nachweisgrenze der CK-20-PCR

Die Möglichkeit, dass es auch falsch-positive PCR Ergebnisse gegeben hat, kann mit an Sicherheit grenzender Wahrscheinlichkeit ausgeschlossen werden, weil die bei allen PCR-Experimenten mitgeführten Negativkontrollen immer sauber waren und somit keine Kontaminationen vorlagen.

Die für diese Arbeit etablierte RT-PCR konnte das CK-20-Gen nachweisen, wenn mindestens 1,5 ng Gesamt-RNA bzw. die aus mindestens 5 Zellen extrahierte RNA-Menge verwendet worden waren. Die Versuche wurden mit zwei Harnblasenkarzinomzelllinien verschiedener Dysplasiegrade (Grad 1 und 2) durchgeführt. Die für PCR theoretisch mögliche Nachweisgrenze von einer Zelle bzw. einer Genkopie wird in der Praxis aufgrund verschiedenster Einflussfaktoren und Fehlerquellen (Primer-spezifität, Inhibitoren, Effizienz der Polymerasen, etc.) normalerweise nicht erreicht. Die Unterschiede in diesen Faktoren erschweren auch den hundertprozentig korrekten Vergleich von Nachweisgrenzen aus verschiedenen Studien. Bei Retz *et al.* (2001) lag die Nachweisgrenze bei 2 Krebszellen/ml Blut; es waren jedoch andere Primer verwendet worden. Mumme (2005) wies in Knochenmarksproben eine Krebszelle unter 10 Millionen gesunden nach, Fuji *et al.* (1999) eine Zelle in einer Million Monozyten aus peripherem Blut. Die beste Empfindlichkeit, die Shen *et al.* (2008) erreichten, lag bei 2 Zellen/5 ml Blut, jedoch handelte es sich um eine quantitative PCR.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Empfindlichkeit der im Rahmen dieser Arbeit etablierten CK-20-PCR zum Nachweis der Mikrometastasen in Lymphknotengewebe sehr gut und vergleichbar mit denen anderer Studien war.

4.2 Vergleich der Detektionsraten der histopathologischen mit der PCR-Methode

Von 751 untersuchten Lymphknoten (von 41 Patienten) erwiesen sich mit beiden Methoden 629 als tumorfrei. Von den restlichen 122 Lymphknoten (von 15 Patienten) waren lediglich 19 Knoten (6 Patienten) histopathologisch positiv, während das CK-20-Gen in allen 122 Proben nachgewiesen wurde. Bei ausschließlich histopathologi-

scher Untersuchung wären somit bei knapp $\frac{3}{4}$ der Patienten (71,4 %, 15 von 21) die Mikrometastasen nicht entdeckt worden. Die Ergebnisse von Ribal *et al.* (2006) mit einer nested CK-20-PCR lagen in ähnlicher Größenordnung: Bei 74 % von 54 untersuchten Patienten wies die PCR Metastasen in Lymphknoten nach, die Histopathologie jedoch nur bei 44,4 %. Unter den 99 entnommenen Lymphknoten entdeckte die CK-20-PCR 29,3 % mehr Metastasen als die Histopathologie.

Dass sich eine höhere Empfindlichkeit einer Nachweismethode nicht zwangsläufig in einer besseren Detektionsrate niederschlagen muss, wird an der Publikation von Wu *et al.* (2005) deutlich. Die Autoren entdeckten mit einer regulären PCR für das Uroplakin-II-Gen in 16 histopathologisch positiven Lymphknoten des Harnblasenkarzinoms deutlich mehr Metastasen als mit einer nested CK-20-PCR (93,8 % vs. 56,6 %). In 6 von 66 histopathologisch befundfreien Knoten fand sich ein Nachweis für Uroplakin-II, jedoch kein einziger für CK-20. Auch in 19 Gewebeproben aus dem Primärtumor war die CK-20-PCR nur in 68,4 % der Fälle (13) positiv, im Gegensatz zu 100 % mit der Uroplakin-PCR. Dieser geringe Prozentsatz für das CK-20-Gen ist umso erstaunlicher, als es sich um Primärtumorgewebe handelte und nicht um anderes Gewebe mit Mikrometastasen oder eine selbst für PCR eventuell zu geringe Anzahl Tumorzellen. Weil die CK-20-Detektionsraten in vielen Studien sehr hoch sind, erscheint es unwahrscheinlich, dass eine unterschiedliche Spezifität der Marker die alleinige Ursache für dieses Ergebnis ist. Eine weitere Erklärung für den Unterschied ließ sich anhand der publizierten Daten nicht finden. Theoretisch könnten unter anderem die Eignung der hier verwendeten CK-20-Primer und/oder die Zusammensetzung des Reaktionsmixes und/oder die Amplifikationsbedingungen eine Rolle spielen. Für die Vermutung, dass eine Ursache auch auf Seite der PCR lag, spricht folgendes: Wu *et al.* (2005) gaben keine Accessionnummer für die Sequenz an, die für das Primerdesign verwendet worden war, sondern übernahmen die Primersequenzen von Funaki *et al.* (1997) und dieser verweist auf die ursprünglich von Moll *et al.* (1993) hinterlegte Sequenz X73501.1 (zugehörige mRNA: NM_019010.2). Drei der vier von Wu *et al.* (2005) angegebenen Primer liegen in dem auch für diese Arbeit amplifizierten Genabschnitt; der innere Primer „step2-sense“ überlappt sich mit dem äusseren Primer CK-20 F aus dieser Disseration. Der innere Primer „step 2-antisense“ ließ sich in der Sequenz jedoch nicht wiederfinden. Legt man die von den Autoren für das innere Produkt angegebene Größe von 349 bp zugrunde, würde der

Primer „step 2-antisense“ sogar ausserhalb des äusseren Primers „step 1 antisense“ liegen. Darüber hinaus fehlten dem Primer „step 1-sense“ vor den beiden letzten Basen am 3'-Ende zwei Basen (AT), die jedoch in der von Funaki *et al.* (1997) angegebenen Sequenz enthalten sind. Ob es sich bei Wu *et al.* (2005) lediglich um einen editorischen Fehler handelt oder ob dieser Primer tatsächlich ohne die Basen AT synthetisiert worden war, lässt sich nicht mehr feststellen. Im letzteren Fall könnte dies allerdings tatsächlich der Grund für die im Vergleich zu anderen CK-20-Studien und Uroplakin II schlechten Detektionsrate sein, weil die Primerbindung und Amplifikation besonders dann negativ beeinflusst wird, wenn Primersequenz und Zielsequenz am 3'-Ende nicht komplementär sind.

Auch in anderen Matrices als Lymphknotengewebe war die Nachweisrate mit CK-20 recht hoch. So fanden Fujii *et al.* (1999) mit einer nested PCR unter 40 Blutproben 9 mit Tumorzellen (22,5 %). Retz *et al.* (2001) wiesen in 35 % (7 von 20) präoperativ gesammelter Knochenmarksproben aus allen pTNM-Stadien ebenfalls das CK-20-Gen nach.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass in der vorgelegten Arbeit bei mehr als einem Drittel aller Patienten (15 von 41) ausschließlich die RT-PCR für das CK-20-Gen Metastasen nachwies und insgesamt gut ein Viertel mehr (26,1 %) Mikrometastasen detektiert als die klassische histopathologische Untersuchung. Die Größenordnung der Frührezidivrate von circa 30 %, die Hautmann *et al.* (2006) angaben, entspricht annähernd dem Prozentsatz an Mikrometastasen, den die CK-20-PCR mehr entdeckte. Die Lymphknotendichte, die von Stein *et al.* (2003) als Prognosekriterium eingeführt wurde, lag bei 20 der 21 positiv befundeten Patienten unter Einbeziehung der CK-20-PCR deutlich höher (1,4-fach bis zu 12-fach) als bei ausschließlich histopathologischer Diagnose. Diese Ergebnisse sind ein klares Indiz dafür, dass Cytokeratin 20 ein vielversprechender, sensitiver und spezifischer Marker ist, der Mikrometastasen frühzeitig entdecken kann, so dass bei Risikopatienten schnellstmöglich mit einer adäquaten Chemotherapie begonnen werden kann.

4.3 Einfluss des Tumorstadiums und der anatomischen Lokalisation der Lymphknotenmetastasen auf die Detektionsrate

Unabhängig von der verwendeten Diagnosemethode war und ist eine eventuelle Korrelation der Detektionsrate von Metastasen mit dem Tumorstadium oder mit dem anatomischen Ort der Lymphknoten Gegenstand vieler Untersuchungen und kontroverser Diskussionen.

In der hier durchgeführten Studie gab es lediglich zwischen den Detektionsraten beider Methoden einen signifikanten Unterschied ($p = 0,021$). Dies ist nicht besonders erstaunlich, weil die PCR *per se* eine sehr viel empfindlichere Methode als der histopathologische Nachweis ist, vorausgesetzt sie wird mit optimal bindenden Primern und unter Ausschluss möglicher Störfaktoren durchgeführt. Wäre es anders, hätte die Methode keinen Vorteil gegenüber anderen und letztlich auch nicht für die Patienten.

Tumorstadium

Zwischen der Detektionsrate der CK-20 und den pTNM-Stadien lag keine signifikante Korrelation vor ($p = 0,279$).

In der berücksichtigten Literatur berichteten nur Ribal *et al.* (2006) über eine Korrelation, jedoch betrug sie lediglich $p = 0,043$. Ob tatsächlich eine Signifikanz vorliegt, müsste mit weiteren Studien und größerem Probenumfang untersucht werden. Für die Blut- und Knochenmarksproben derselben Patienten fanden sie keine Korrelation, ebenso wenig wie Retz *et al.* (2001) für ihre Blut- und Knochenmarksproben.

Weitere Veröffentlichungen, welche den Zusammenhang zwischen Tumorstadium und CK-20-Nachweis speziell in Lymphknoten untersuchten, waren zum Zeitpunkt der Fertigstellung dieser Arbeit nicht bekannt.

Tumorlokalisation

Trotz der andauernden Diskussionen über einen eventuellen Zusammenhang zwischen Anzahl positiver Befunde und ihrer Lokalisation können die dazu publizierten Angaben nur bedingt verglichen werden, weil für die exakte topografische-anatomische Zuordnung der Lymphknoten keine einheitlichen Schemata verwendet wurden. Lediglich Leissner (2005) und Jensen *et al.* (2010) benutzten eine Zuordnung, die mit dem hier verwendeten Schema der LEA-Studie ansatzweise vergleich-

bar ist. Bei Leissner fehlten die Level 13 und 14, bei Jensen *et al.* war die Zuordnung innerhalb des Obturatoriusbereich eine andere.

Für die hier untersuchten Patienten gab es keine signifikanten Korrelationen zwischen der Detektionsrate für CK-20 und der Ausdehnung der Lymphadenektomien ($p = 0,495$). Die Häufigkeitsverteilung zeigte, dass von den 395 Knoten mit nachgewiesenen Tumoren die allermeisten positiven Proben aus dem eingeschränkten Feld stammten (Level 9: 52,5 %, Level 11: 29,7 %, Level 5: 25,4 %, Level 7: 20,7 %). Histopathologisch fanden sich die meisten Metastasen ebenfalls in Level 9 (1,3 %) und Level 5 (1 %). Auch Leissner (2005) fand die meisten pathologisch positiven Knoten im Bereich der beiden Obturatoriusfeldern, die den LEA-Leveln 9 (14,1 %) und 11 (11 %) entsprechen.

Jensen *et al.* (2010) berichteten von einem signifikant höheren Risiko für Lymphknotenmetastasen in höheren Tumorstadien, fanden jedoch keinen Zusammenhang zum Entnahmeort.

Seiler *et al.* (2010) fanden ebenfalls keinen signifikanten Zusammenhang zwischen der Zahl positiver histopathologischer Befunde und dem Entnahmeort. Die meisten Metastasen befanden sich auch hier in den drei Regionen des pelvinen Raumes (*A. iliaca externa*, Level 5 und 7: 33 %; *A. iliaca interna*, Level 13 und 14: 29 %; Obturatoriusbereich, Level 9, 10, 11 und 12: 38 %). Von diesen Feldern zählen nur die Level 10 und 12 zur ausgedehnten Lymphadenektomie; die Metastasen-häufigkeiten für die einzelnen Level waren nicht angegeben.

Eine mit experimentellen Belegen untermauerte Erklärung für die Tatsache, dass sich die Mehrheit der Metastasen meistens in Bereichen fanden, die zur eingeschränkten Adenektomie zählen, gibt es bisher nicht.

Die Verteilung der für diese Arbeit detektierten Mikrometastasen auf die rechte bzw. linke Körperseite war unauffällig; es gab diesbezüglich keine außergewöhnlich großen Unterschiede. Leissner (2005) hatte die Rechts-Links-Verteilung in seiner Studiengruppe statistisch überprüft. Die einzige Korrelation, die er fand, war die mit der Person des Operateurs. Dies heisst, solange es keine experimentell überprüfbare Hypothese über mögliche biologische Ursachen einer ungleichen Rechts-Links-Verteilung von Mikrometastasen gibt, kann davon ausgegangen werden, dass es sich wahrscheinlich um ein Artefakt handelt, welches auf den Faktor Mensch und die Art und Weise des jeweiligen operativen Vorgehens zurückzuführen ist.

4.4 Ausblick

In vielen Studien im Verlauf des letzten Jahrzehntes erwies sich Cytokeratin 20 als spezifischer Tumormarker mit hoher Sensitivität. Mittels Reverser-Transkriptase-PCR und anschließender nested PCR werden hohe Nachweisraten für Mikrometastasen erreicht. Die vorgelegte Arbeit untersuchte ein Zehntel von insgesamt 400 Patienten, die an der prognostischen, randomisierten und multizentrischen LEA-Studie teilnahmen. Die Zielsetzung dieser Arbeit beinhaltete keine Nachuntersuchungen. Es wäre wünschenswert, diese im Rahmen zukünftiger Arbeiten zu berücksichtigen. Wenn es einen signifikanten Unterschied bezüglich des rezidivfreien Gesamtüberlebens zwischen CK-20-positiven und CK-20-negativen Patienten gäbe, ließe sich besser entscheiden, ob es sinnvoll wäre, den PCR-Nachweis dieses Gens zukünftig als Marker im klinischen Alltag einzusetzen. Im Hinblick auf diese Entscheidung sollte vor allem die in der LEA-Studie ermittelte Rezidiv- und 5-Jahres-Überlebensrate in den verschiedenen Patientengruppen unter folgenden Gesichtspunkten analysiert werden:

- Entwickeln auch Patienten, die laut beiden Diagnosemethoden metastasenfrei waren, Rezidive?
- Haben Patienten mit einer ausgedehnten Adenektomie ein besseres Outcome?
- Hat das Verhältnis zwischen der Anzahl histopathologisch negativer und CK-20-positiver Lymphknoten und der Metastasenlokalisierung einen Einfluss auf die Entwicklung von Frührezidiven und/oder den Zeitpunkt der Manifestation?

5 ZUSAMMENFASSUNG

Beim muskelinvasiven Harnblasenkarzinom kommt es nach radikaler Zystektomie trotz histopathologisch negativer Lymphknoten innerhalb der ersten 5 Jahre in 1/3 der Fälle zu Tumorrezidiven. Ziel dieser Doktorarbeit war es, Mikrometastasen zu detektieren, um diese Risikopatienten so früh wie möglich erkennen zu können. Dazu wurde die histopathologische Methode mit dem PCR-Nachweis des spezifischen Tumormarkers Cytokeratin 20 (CK-20) verglichen. Es wurden 751 Lymphknoten von 41 Patienten untersucht, die Teilnehmer der prospektiven, randomisierten und multi-zentrischen LEA-Studie der Arbeitsgemeinschaft urologische Onkologie (Deutschland) waren.

Für die Histopathologie wurde nicht nur eine Probe sondern es wurden zwei Gewebeteile aus verschiedenen Bereichen des Lymphknotens verwendet, um die Wahrscheinlichkeit für falsch-negative Befunde bei nur teilweise befallenen Knoten zu verringern. Zum Nachweis des Gens wurde eine Reverse-Transkriptase-PCR mit anschließender nested PCR etabliert.

Die Nachweisgrenze wurde anhand von Verdünnungsreihen und für zwei Blasenkarzinomzelllinien mit verschiedenen Dysplasiegraden (RT 4/Grad 1, RT 112/Grad 2) bestimmt. Sie betrug 1,5 ng RNA bzw. diejenige RNA-Menge, die aus 5 Zellen extrahiert werden konnte.

Beide Methoden identifizierten unter den 751 Lymphknoten 356 befundfreie. Unter den restlichen 395 Proben wies die Histopathologie nur 19 Metastasen nach (4,8 %), die CK-20-PCR jedoch zusätzlich 103 (26,1 %). Dieser Unterschied war signifikant ($p = 0,021$) und liegt in der Größenordnung der Frührezidivrate von 30 %. Die statistische Analyse mittels binärer logistischer Regression fand keinen signifikanten Zusammenhang zwischen der CK-20-Detektionsrate und dem pTNM-Stadium sowie der Anzahl der entnommenen Lymphknoten ($p = 0,279$ bzw. $p = 0,481$). Auch ein Korrelation mit der anatomischen Lokalisation der Lymphknoten (eingeschränkte vs. ausgedehnte Adenektomie) lag nicht vor ($p = 0,495$).

Zusammenfassend lässt sich sagen, das CK-20 ein spezifischer Tumormarker für das Harnblasenkarzinom ist, mit den Mikrometastasen in Lymphknoten mit hoher

Sensitivität nachgewiesen werden können. Im Rahmen der Verlaufskontrolle innerhalb der zum jetzigen Zeitpunkt noch nicht abgeschlossenen LEA-Studie werden für alle 400 Patienten die Rezidiv- und 5-Jahresüberlebensrate ermittelt. Auf Grundlage dieser Daten wird sich besser einschätzen lassen, ob es vorteilhaft wäre, den PCR Nachweis für Cytokeratin 20 im klinischen Alltag zu etablieren.

6 LITERATURVERZEICHNIS

American Cancer Society (2007): Cancer facts and figures 2007. American Cancer, Atlanta.

Autenrieth M, Gschwend JE, Nawroth R, Retz M (2012): Stellenwert der erweiterten Lymphadenektomie beim muskelinvasiven Harnblasenkarzinom. *Der Onkologe* 18, 985-993.

Autenrieth M, Nawroth R, Semmlack S, Gschwend JE, Retz M (2008): Muscle-invasive urothelial carcinoma of the bladder. Detection and topography of micrometastes in lymph nodes. *Urologe A* 47, 1157-61.

Bertz J, Giersiepen K, Haberland J, Hentschel S, Kaatsch P, Katalinic A, Stabenow R, Stegmaier C, Ziegler H: Krebs in Deutschland. Häufigkeiten und Trends. 5. überarbeitete, aktualisierte Ausgabe, S. 52 – 54. Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. und das RKI. Saarbrücken (2006)

Böcker W, Denk H, Heitz Ph (2004): Pathologie. 3. Auflage. Urban & Fischer Verlag, München, Jena.

Brennan P, Bogillot O, Cordier S, Greiser E, Schill W, Vineis P, Lopez-Abente G, Tzonou A, Chang-Claude J, Bolm-Audorff U, Jöckel KH, Donato F, Serra C, Wahrendorf J, Hours M, T'Mannetje A, Kogevinas M, Boffetta P (2000): Cigarette smoking and bladder cancer in men: a pooled analysis of 11 case-control studies. *Int J Cancer* 86, 289-294.

Brennan P, Bogillot O, Greiser E, Chang-Claude J, Wahrendorf J, Cordier S, Jöckel KH, Lopez-Abente G, Tzonou A, Vineis P, Donato F, Hours M, Serra C, Bolm-Audorff U, Schill W, Kogevinas M, Boffetta P (2001): The contribution of cigarette smoking to bladder cancer in women (pooled European data). *Cancer Causes Control* 14, 411-417.

Chomczynski P, Sacchi N (2006): The single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction: twenty-something years on. *Nat Protoc* 1, 581-85.

Coleman M, Rachet B, Woods LM, Mityr E, Riga M, Cooper N, Quinn MJ, Brenner H, Estève J (2004): Trends and socioeconomic inequalities in cancer survival in England and Wales up to 2001. *Br J Cancer* 90, 1367-73.

Coppin CM, Gospodarowicz MK, James K, Tannock IF, Zee B, Carson J, Pater J, Sullivan LD (1996): Improved local control of invasive bladder cancer by concurrent cisplatin and preoperative or definitive radiation. The National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group. *J Clin Oncol*, 14, 2901-7.

- Deutsche Krebsgesellschaft (2002): Prospektiv randomisierte Studie zum Vergleich einer ausgedehnten mit einer eingeschränkten pelvinen Lymphadenektomie bei der operativen Therapie des Harnblasenkarzinoms. von www.auro-online.de/pdf/P_1105.pdf. abgerufen
- Dhar NB, Campbell SC, Zippe CD, Derweesh IH, Reuther AM, Fergany A, Klein EA (2006): Outcomes in patients with urothelial of the bladder with limited pelvic lymph node dissection. *BJU Int.* 98, 1171-5.
- Dieler M (2008): Prognostische Wertigkeit der CK 20-Detektion mittels RT-PCR als Nachweismethode für disseminierte Tumorzellen im Blut und Knochenmark beim Pankreaskarzinom: eine prospektive Studie. Universitätsklinikum Münster.
- Eichenauer R (2003): Harnblasentumoren. In: *Klinikleitfaden Urologie*. 3. Auflage: Elsevier, Urban & Fischer, 345-358.
- Fang AC, Ahmad AE, Whitson JM, Ferrell LD, Carroll PR, Konety BR (2010): Effect of a minimum lymph node policy in radical cystectomy and pelvic lymphadenectomy on lymph node yields, lymph node positivity rates, lymph node density, and survivorship in patients with bladder cancer. *Cancer* 116:1901–1908.
- Fleischmann A, Thalmann GN, Markwalder R, Studer UE (2005): Extracapsular extension of pelvis lymph node metastases from urothelial carcinoma of the bladder is an independent prognostic factor. *J Clin Oncol* 23, 2358-65.
- Fujii Y, Kageyama Y, Kawakami S, Kihara K, Oshima H (1999): Detection of disseminated urothelial cancer cells in peripheral venous blood by a cytokeratin 20-specific nested reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *Jpn J Cancer Res* 90, 753-757.
- Funaki NO, Tanaka J, Itami A, Kasamatsu T, Ohshio G, Onodera H, Moden K, Okino T, Imamura M (1997): Detection colorectal carcinoma cells in circulating peripheral blood by reverse transcription-polymerase chain reaction targeting cytokeratin-20 mRNA *Life Sci* 60, 643-52.
- Funaki NO, Tanaka J, Ohshio G, Onodera H, Maetani S, Imamura M (1998): Cytokeratin 20 mRNA in peripheral venous blood of colorectal carcinoma patients. *Br J Cancer* 77, 1327-32.
- Ganten D, Hahn S, Schmiegel W, Ganten D, Ruckpaul K (2002): *Molekularmedizinische Grundlagen von nicht-hereditären Tumorerkrankungen*. Springer-Verlag.
- Gloeckler Ries LA, Reichman ME, Lewis DR, Hankey BF, Edwards BK (2003): Cancer survival and incidence from the Surveillance, Epidemiology, and End Results (SEER) program. *Oncologist* 8, 541-52.

- Gschwend JE, Dahm P, Fair WR (2002): Disease specific survival as endpoint of outcome for bladder cancer patients following radical cystectomy. *Eur Urol* 41: 440-448
- Haag P, Hanhart N, Müller M (2008): Harnblasenkarzinom. In: *Gynäkologie und Urologie für Studium und Praxis*. Breisach am Rhein: Medizinische Verlags- und Informationsdienste 331-335.
- Hautmann RE, Gschwend JE, de Petriconi RC, Kron M, Volkmer BG (2006): Cystectomy for transitional cell carcinoma of the bladder: results of a surgery only series in the neobladder era. *J Urol* 176, 486-92.
- Hermanek P., Hutter R.V., Sobin L.H., Wittekind C. (1999): International Union Against Cancer. Classification of isolated tumor cells and micrometastasis. *Cancer* 86 (12), 2668-73.
- Jensen JB, Uihøi BP, Jensen KM (2010): Lymph node mapping in patients with bladder cancer undergoing radical cystectomy and lymph node dissection to the level of the inferior mesenteric artery. *BJU Int* 106, 199-205.
- Jiang MD, Ulbright TM, Younger C, Sanchez K, Bostwick DG, Koch MO, Eble JN, Cheng L (2001): Cytokeratin 7 and Cytokeratin 20 in primary urinary bladder carcinoma and matched lymph nodes metastasis. *Arch Pathol Lab Med* 125, 921-3.
- Jocham D (2003): Maligne Tumoren der Harnblase. In: Jocham D, Miller K (Hrsg.), *Praxis der Urologie*. Band II, Kapitel 47: 105-166, 2. Auflage, Georg Thieme Verlag Stuttgart New York 2003.
- Jones SJ, Cambell-Walsh (2008): Non-muscle-invasive bladder cancer (Ta, T1 and Tcis). Elsevier 2477-267.
- Jung R, Petersen K, Krüger W, Wolf M, Wagener C, Zander A, Neumaier M (1999): Detection of micrometastasis by cytokeratin 20 RT-PCR is limited due to stable background transkription in granulocytes. *BR J Cancer* 81, 870-873.
- Kausch I, Jocham D, Miller K (2007): Maligne Tumoren der Harnblase. *Praxis der Urologie*. Stuttgart-New York : Georg-Thieme Verlag, 63-120.
- Kienzle-Pfeilsticker (2001): Blasenkrebs und Alkohol - erhöhtes Risiko für Männer. *Akt Urol* 6: 326.
- Kirkali Z, Chan T, Maoharan M, Algaba F, Busch C, Cheng L, Kiemeney L, Kriegmair M, Montironi R, Murphy WM, Sesterhenn IA, Tachibana M, Wieder J (2005): Bladder cancer: epidemiology, staging and grading, and diagnosis. *Urology* 66, 4-34.
- Krüger W, Krzizanowski C, Holweg C, Stockschläder M, Kröger N, Jung R, Mross K, Jonat W, Zander AR (1996): Reverse transcriptase/polymerase chain reaction detection of

- cytokeratin-19 mRNA in bone marrow and blood of breast cancer patients. *J Cancer Res Clin Oncol* 122, 679-86.
- Lehmann J, Retz M, Stöckle M (2002): Chemotherapie in the post-MVAC era: the case for adjuvant chemotherapy. *World J Urol* 20, 144-150.
- Leissner J, Hohenfellner R, Thüroff JW, Wolf HK (2000): Lymphadenectomy in patients with transitional cell carcinoma of the urinary bladder: significance for the staging and prognostic. *BJU INT* 85, 817-23.
- Leissner J (2005): Lymphadenectomy for bladder cancer. Diagnostic and prognostic significance as well as therapeutic benefit. *Urologe A* 44, 638-44.
- Lion T (1996): Control genes in reverse transcriptase-polymerase chain reaction assays. *Leukemia* 10, 1527-8.
- Lopez-Beltran A, Montironi R (2004): Non-invasive urothelial neoplasms: according to the most recent WHO classification. *Eur Urol* 46, 170-6.
- Nagle RB (1989): Intermediate filaments. Efficacy in surgical pathologic diagnosis. *Am J Clin Pathol* 91, 14-8.
- Maase von der H, Hansen SW, Roberts JT, Dogliotti L, Oliver T, Moore MJ, Bodrogi I, Albers P, Knuth A, Lippert CM, Kerbrat P, Sanchez Rovira P, Wersall P, Cleall SP, Roychowdhury DF, Tomlin I, Visseren-Grul CM, Conte PF (2000): Gemcitabine and cisplatin versus methotrexate, vinblastine, doxorubicin, and cisplatin in advanced or metastatic bladder cancer: results of a large, randomized, multinational, multicenter, phase III study. *J Clin Oncol* 18, 3068-77.
- Madersbacher S, Hochreiter W, Burkhard F, Thalmann GN, Danuser H, Markwalder R, Studer UE (2003): Radical cystectomy for bladder cancer today - a homogeneous series without neoadjuvant therapy. *J Clin Oncol* 21: 690-696.
- Moll R, Franke WW, Schiller DL, Geiger B (1982): Catalogue of human cytokeratins. Pattern of expression in normal epithelia, tumours and cultured cells. *Cell* 31, 11-24.
- Moll R, Schiller DL, Franke WW (1990): Identification of protein IT of the intestinal cytoskeleton as a novel type I cytokeratin with unusual properties and expression patterns. *J Cell Biol* 111, 567-80.
- Moll R, Löwe A, Laufer J, Franke WW (1992): Cytokeratin 20 in human carcinomas. A new histodiagnostic marker detected by monoclonal antibodies. *Am J Pathol* 140, 427-47.
- Moll R, Zimbelmann R, Goldschmidt MD, Keith M, Laufer J, Kasper M, Koch PJ, Franke WW (1993): The human gene encoding cytokeratin 20 and its expression during fetal development and in gastrointestinal carcinomas. *Differentiation* 53, 75-93.

- Mumme S (2005): Zytokeratin-20-Reverse-Transkriptase-Polymerasekettenreaktion zum Nachweis disseminierter Tumorzellen beim Mammakarzinom: Ziele und Grenzen. Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf.
- Oruzio D, Hempel D, Schlimok G (1997): Knochenmikrometastasen epithelialer Tumoren, Nachweis und klinische Bedeutung. *Onkologie* 3, 66-72.
- Osborne MP, Rosen PP (1994): Detection and management of bone marrow micrometastases in breast cancer. *Oncology* 8, 25-31.
- Pashos CL, Botteman MF, Laskin BL, Redaelli A (2002): Bladder cancer; epidemiology, diagnosis and management. *Cancer Pract.* 10, 311-22.
- Pellucchi F, Freschi M, Ibrahim B, Rocchini L, Maccagnano C, Briganti A, Rigatti P, Montorsi F, Colombo R (2011): Clinical reliability of the 2004 WHO histological classification system compared with the 1973 WHO system for Ta primary bladder tumors. *J Urol* 186: 2194-9.
- Retz M, Lehmann J, Röder C, Weichert-Jacobsen K, Loch T, Rohman E, Lühl C, Kalthoff H, Stöckle M (2001): Cytokeratin-20 reverse-transcriptase polymerase chain reaction as a new tool for the detection of circulating tumor cells in peripheral blood and bone marrow of bladder cancer patients. *Eur Urol* 39, 507-17.
- Ribal MJ, Mengual L, Marín M, Algaba F, Ars E, Fernández PL, Oliva R, Villavicencio H, Alcaraz A (2006): Molecular staging of bladder cancer with RT-PCR assay for CK-20 in peripheral blood, bone marrow and lymph nodes: comparison with standard histological staging. *Anticancer Res.* 26, 411-9.
- Robert-Koch-Institut (2010). Verbreitungen von Krebserkrankungen in Deutschland. Entwicklung der Prävalenzen zwischen 1990 und 2010. Beiträge zur Gesundheitsberichterstattung des Bundes. RKI, Berlin
- Rosin MP, Cairns P, Epstein JI, Schoenberg MP, Sidransky D (1995) Partial allelotype of carcinoma in situ of the human bladder. *Cancer Res* 55: 5213–5216
- Rotering J (2006): Nachweis von disseminierten Tumorzellen anhand einer Genexpression von CK-20 und MUC7 im Knochenmark bei Patienten mit lokal fortgeschrittenem Urothelkarzinom der Harnblase als neue prognostische Tumormarker. Dissertation, Universitätsklinikums des Saarlandes, Homburg/Saar.
- Rullier A, le Bail BL, Fawaz R, Blanc JF, Saric J, Bicouloc-Sage P (2000): Cytokeratin 7 and 20 expression in cholangio carcinomas varies along the biliary tract but still differs from that in colorectal carcinomas metastasis. *Am J Surg Pathol* 24, 870-6.

- Sadetzki S, Bensal D, Blumstein T, Novikov I, Modan B (2000): Selected risk factors for transitional cell bladder cancer. *Med Oncol* 17, 179-82.
- Schatte E, Grunenfelder J, Fradet Y, Miles BJ (2000): Epidemiology of bladder cancer. In: *Comprehensive Textbook of Genitourinary Oncology*, 2nd edition. Vogelzang NJ, Scardino PT, Shipley WU, Coffey DS, editors. Philadelphia: lippincott, Williams and Wilkins, 283.
- Schmelz HU, Sparwasser C, Weidner W (2006): Differenzierte Diagnostik und Therapie. *Facharztwissen Urologie*. Springer-Verlag, Berlin 175-203.
- Scosyrev E, Golijanin D, Wu G, Messing E (2012): The burden of bladder cancer in men and women: analysis of the years of life lost. *BJU Int* 109: 57-62.
- Shen C, Hu L, Xia L, Li Y (2008): Quantitative real-time RT-PCR detection for survivin, CK20 and CEA in peripheral blood of colorectal cancer patients. *Jpn J Clin Oncol* 38, 770-6.
- Seiler R, von Gunten M, Thalmann GN, Fleischmann A (2010): Pelvic lymph nodes: distribution and nodal tumour burden of urothelial bladder cancer. *J Clin Pathol* 63, 504-7.
- Seitz M, Zaak D, Knüchel-Clarke R, Stief C (2005): Urinary bladder tumours. The new 2004 WHO classification. *Urologe A* 44, 1073-1086.
- Silverman DT, Hartge P, Morrison AS, Devesa SS (1992): Epidemiology of bladder cancer. *Hematol Oncol Clin North Am* 6, 1-30.
- Soeth E, Röder C, Juhl H, Krüger U, Kremer B, Kalthoff H (1996): The detection of disseminated tumor cells in bone marrow from colorectal-cancer patients by cytokeratin-20-specific nested reverse-transkriptase-polymerase-chain reaktion is related to the stage of disease. *Int J Cancer* 69, 278-82.
- Stein JP, Cai J, Groshen S, Skinner DG, (2003): Risk factors for patients with pelvic lymph node metastases following radical cystectomy with en bloc pelvic lymphadenectomy: concept of lymph node density. *J Urol* 170, 35-41.
- Stein JP, Lieskovsky G, Cote R, Groshen S, Feng AC, Boyd S, Skinner E, Bochner B, Thangathurai D, Mikhail M, Raghavan D, Skinner DG (2001): Radical cystectomy in the treatment of invasive bladder cancer: long-term results in 1.054 patients. *J Clin Oncol* 19, 666-75.
- Stöckle M, Lehmann J (2005): Therapie und Prognose des lymphogen metastasierten Urothelkarzinoms - Stellenwert der Lymphknoten Chirurgie und der perioperativen Chemotherapie. In: Lehmann J, Retz M, Stöckle M (Hrsgb.): *Blasenkarzinom - Neue Perspektiven in Diagnostik und Behandlung - Kapitel 10*. Springer Medizin Verlag Heidelberg.

- Sun TT, Bonitz P, Burns WH (1984): Cell culture of mammalian thymic epithelial cells: growth, structural and antigenic properties. *Cell Immunol* 83, 1-13.
- Suttman H, Kamradt J, Lehmann J, Stöckle M (2007): Improving the prognosis of patients after radical cystectomy, Part I: the role of lymph node dissection. *BJU Int* 100, 1221-4.
- Sylvester RJ, van der Meijden A, Witjes JA, Jakse G, Nonomura N, Cheng C, Torres A, Watson R, Kurth KH (2005): High-grade Ta urotheliale carcinoma and carcinoma in situ of the bladder. *Urology* 66, 90-107.
- Tumorzentrum München an den Medizinischen Fakultäten der Ludwig-Maximilians-Universität und der Technischen Universität (2008): Urogenitale Tumoren, Empfehlung zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge. Zuckschwerdt-Verlag, 4. Auflage 83-153.
- Vieweg J, Gschwend JE, Herr HW, Fair WR (1999): Pelvic lymph node dissection can be curative in patients with node positive bladder cancer. *J Urol* 161, 449-54.
- Vögeli TA, Ackermann R (2001): Prognostische Faktoren beim Urothelkarzinom. *Urologe A* 40, 442-446.
- Wang NP, Zee S, Zarbo RJ, Bacchi CE, Gown AM (1995): Coordinate expression of cytokeratin 7 and 20 defines unique subsets of carcinomas. *Immunohistochemistry* 3, 99-107.
- Webster LR, McKenzie GH, Moriarty HT (2002): Organophosphate based pesticides and genetic damage implicated in bladder cancer. *Cancer Genet. Cytogenet.* 133, 112-7.
- Weitz J, Kienle P, Magener A, Koch M, Schrödel A, Willeke F, Autschbach F, Lacroix J, Lehnert T, Herfath C, Von Kneben Doeberitz M (1999): Detection of disseminated colorectal cancer cells in lymph nodes, blood and bone marrow. *Clin Cancer Res* 5, 1830-6.
- Wu X, Kakehi Y, Zeng Y, Taoka R, Tsunemori H, Inui M (2005): Uroplakin II as a promising marker for molecular diagnosis of nodal metastases from bladder cancer: comparison with cytokeratin 20. *J Urol* 174, 2138-42.
- Wu X, Lin J, Grossman HB, Huang M, Gu J, Etzel CJ, Amos CI, Dinney CP, Spitz MR (2007): Projecting individualized probabilities of developing bladder cancer in white individuals. *J Clin Oncol* 25, 4974-81.
- Zeegers MP, Kellen E, Buntinx F, van den Brandt PA (2004): The association between smoking, beverage consumption, diet and bladder cancer: a systematic literature review. *World J Urol* 21, 392-401.

7 ANHANG

Tabelle 7: Ergebnisse der eingeschränkten Lymphadenektomie aller histopathologisch negativen und CK-20-PCR positiven Lymphknoten aufgeschlüsselt nach aufsteigender Zahl entnommener Lymphknoten/Patient.

Patienten-Nr./pT-Stadium	6/Ta, Tis					8/Ta, Tis						4/Tis		5/T3a			
Anzahl entnommener LK/Patient	9					9						12		13			
Level	5	7	9	11	14	5	7	9	11	13	14	9	11	5	7	9	11
Anzahl LK	2	1	2	3	1	1	2	1	1	3	1	5	7	4	4	2	3
Anzahl LK Histopath. negativ und CK-20 positiv	0	0	1	2	0	1	1	1	1	3	1	4	0	2	3	2	2
LK Histopath. negativ und CK-20 positiv (%)	0	0	50	66	0	100	50	100	100	100	100	80	0	50	75	100	66

Patienten-Nr.	30/pT2a							22/pT2a				27/pT3b				
Anzahl entnommener LK/Patient	16							20				21				
Level	4*	5	7	9	11	13	14	5	7	9	11	5	7	9	11	13
Anzahl LK/Level	1	5	1	3	4	2	1	9	3	4	4	4	7	5	4	1
Anzahl LK Histopath. negativ und CK-20 positiv	0	2	0	1	0	0	1	0	0	1	1	0	1	1	2	0
LK Histopath. negativ und CK-20 positiv (%)	0	40	0	33	0	0	100	0	0	20	25	0	14	20	50	0

* Bei Pat.-Nr. 30 wurde aus Versehen ein Lymphknoten aus dem zur ausgedehnten Lymphadenektomie zählenden Level 4 entnommen. Dieser Knoten war sowohl histopathologisch als auch für CK-20 negativ.

Tabelle 8: Ergebnisse der ausgedehnten Lymphadenektomie aller histopathologisch negativen und CK-20-PCR positiven Lymphknoten, aufgeschlüsselt nach aufsteigender Zahl entnommener Lymphknoten/Patient.

Patienten-Nr./pT-Stadium	12/T3b						17/T1									9/Ta, Tis									
Anzahl LK/Pat.	16						16									18									
Level	3	4	5	7	9	11	2	3	4	5	6	7	9	10	12	14	1	3	4	5	6	7	9	11	13
Anzahl LK	2	2	2	5	3	2	1	2	1	2	2	1	1	1	3	2	1	1	2	2	2	3	3	3	1
Anzahl LK Histopath. negativ und CK-20 positiv	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	2	2	1
LK Histopath. negativ und CK-20 positiv (%)	50	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100	0	0	0	100	0	0	0	0	33	67	67	100

Patienten-Nr./pT-Stadium	39/T3b										10/T4a									7/T3b							
Anzahl LK/Pat.	19										20									21							
Level	3	4	5	6	7	9	11	12	13	14	1	2	3	4	5	6	7	9	11	13	2	3	5	6	7	8	9
Anzahl LK	2	1	3	2	3	1	1	2	1	1	1	1	4	2	2	1	5	2	1	1	1	1	6	7	3	2	1
Anzahl LK Histopath. negativ und CK-20 positiv	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	1	1	1	0	1	0	0	1	2	1	0	1
LK Histopath. negativ und CK-20 positiv (%)	0	0	0	0	33	0	0	0	0	0	0	100	25	50	0	100	20	50	0	100	0	0	17	29	33	0	100

Fortsetzung Tabelle 8

Patienten-Nr./pT-Stadium	11/T2a											25/T3b									
Anzahl LK/Pat.	35											38									
Level	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	1	3	4	5	6	7	9	11	13	14
Anzahl LK	1	5	3	1	4	3	3	3	5	1	6	3	3	5	1	4	3	11	6	1	1
Anzahl LK Histopath. negativ und CK-20 positiv	0	3	0	1	1	0	1	1	3	0	3	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
Histopath. negativ und CK-20 positiv/Level (%)	0	60	0	100	25	0	33	33	60	0	50	0	0	0	0	0	0	0	17	0	0

Tabelle 9: Ergebnisse aller histopathologisch positiver Patienten aufgeschlüsselt nach eingeschränkter und ausgedehnter Lymphadenektomie.

Patienten-Nr./pT-Stadium	15/T3a					34/T1					37/T4a				
Anzahl entnommener LK/Patient	8					13					10				
Level	5	7	9	11	13	5	7	9	11	13	5	7	9	11	14
Anzahl LK	3	1	1	2	1	6	1	3	2	1	1	2	5	1	1
Anzahl LK Histopath. negativ und CK-20 positiv	0	0	0	0	0	3	0	0	0	0	0	0	4	1	1
LK Histopath. negativ und CK-20 positiv (%)	0	0	0	0	0	50	0	0	0	0	0	0	80	100	100
Anzahl LK Histopath. positiv und CK-20 positiv	1	0	0	0	1	2	1	0	0	1	0	1	1	0	0
LK Histopath. positiv und CK-20 positiv (%)	33	0	0	0	100	33	100	0	0	100	0	100	20	0	0

Patienten-Nr.	41/pT3b					
Anzahl entnommener LK/Patient	23					
Level	5	7	9	11	13	14
Anzahl LK/Level	5	5	6	4	1	2
Anzahl LK Histopath. negativ und CK-20 positiv	20	0	5	1	1	0
LK Histopath. negativ und CK-20 positiv (%)	40	0	83	25	100	0
Anzahl LK Histopath. positiv und CK-20 positiv	0	0	1	0	0	0
LK Histopath. positiv und CK-20 positiv (%)	0	0	17	0	0	0

Fortsetzung Tabelle 9

Patienten-Nr./pT-Stadium	3/T3a								29/3b									
Anzahl entnommener LK/Patient	16								42									
Level	4	5	6	8	9	11	12	14	4	5	6	7	8	9	11	12	13	14
Anzahl LK	2	2	2	2	4	2	1	1	1	3	2	5	1	12	8	2	4	4
Anzahl LK Histopath. negativ und CK-20 positiv	0	0	1	0	1	1	1	0	0	1	0	0	0	8	2	0	0	0
LK Histopath. negativ und CK-20 positiv (%)	0	0	50	0	25	50	100	0	0	33	0	0	0	67	25	0	0	0
Anzahl LK Histopath. positiv und CK-20 positiv	2	1	1	2	2	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
LK Histopath. positiv und CK-20 positiv (%)	100	50	50	100	50	0	0	100	0	0	0	0	0	8	0	0	0	0

DANKSAGUNG

Danken möchte ich Herrn Prof. Dr. med. Gschwend für die Möglichkeit, die Dissertation in der Urologischen Klinik der TU München durchzuführen.

Bei Frau PD Dr. med M. Retz bedanke ich mich für die Überlassung des Themas der Doktorarbeit und für die gute und zuverlässige Betreuung und den vielen hilfreichen Anmerkungen.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. med. M. Autenrieth, der mir während der ganzen Zeit mit vielfältigen Anregungen und Diskussionen zur Seite gestanden hat.

Bei Herrn Dr. rer. nat. Nawroth bedanke ich mich ganz herzlich für die Hilfe bei der Einarbeitung in die Methoden und in die technischen Details und für die jederzeit gute Betreuung bei der Durchführung der experimentellen Versuche und die geduldige Beantwortung der vielen Fragen.

Ich danke Frau Moissel für die hervorragende labortechnische Unterstützung.

Und nicht zuletzt danke ich meinen Kollegen Henrik Große Wiesmann und Herrn Christoph Oehler, die viel dazu beigetragen haben, dass die gemeinsam während der Dissertation verbrachte Zeit unvergesslich bleiben wird.