

Differentielle Genexpression von Urothel und Harnblasenkarzinomen

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften

vorgelegt beim Fachbereich
Biochemie, Pharmazie und Lebensmittelchemie
der Johann Wolfgang Goethe - Universität

in Frankfurt am Main

von

Sven Bade
aus Mannheim

Frankfurt 1999

1. Einleitung	5
1.1 Urothelkarzinome	6
1.1.1 Epidemiologie	6
1.1.2 Karzinogenese	7
1.1.3 Klassifikation der Urothelkarzinome	10
1.1.4 Diagnostik der Urothelkarzinome	12
1.2 Uroplakine: Gewebsspezifische und differenzierungsabhängige Proteine des Urothels	13
1.3 Tumormarker für Urothelkarzinome	15
1.3.1 Tumormarker	15
1.3.2 Marker für Urothelkarzinome	17
1.4 Signaltransduktion durch Tyrosinkinasen	25
1.5 Differential Display Reverse Transkription-Polymerase Kettenreaktion (ddRT-PCR)	26
1.6 Homologiedomänen-Konsenssequenz RT-PCR (Hodoko RT-PCR)	27
1.7 Zielsetzung der Arbeit	28
2. Material und Methoden	30
2.1 Materialien	30
2.1.1 Gewebeproben	30
2.1.2 PCR-Primer-Oligonukleotide	31
2.1.3 Zelllinien	32
2.1.4 Nährmedien, Chemikalien und andere Materialien für die Zellkultur	33
2.1.5 Chemikalien für die RT-PCR und Sequenzierung	34
2.1.6 Geräte	36
2.2 Methoden	37
2.2.1 Gewebe und primäre Zellkulturen	37
2.2.2 Gewinnung von Urothelzellen aus Nierenbecken, Harnleitern und –blasen ...	37
2.2.3 Zellkulturbedingungen	39
2.2.4 RNA Isolierung	39
2.2.5 Komplementäre DNA Synthese (Reverse Transkription)	40
2.2.6 Polymerase Kettenreaktion (PCR)	40

3.	Ergebnisse	51
3.1	<i>Uroplakin</i> RT-PCR von humaner Urothel-mRNA unter Verwendung der bovinen Sequenzen für die uroplakin-spezifischen Primer-Oligo-Nukleotide.....	51
3.2	Die Nukleinsäuresequenzen für die humanen Uroplakin Ia, Ib, II und III PCR-Fragmente.....	53
3.3	<i>Uroplakin</i> Ib mRNA in primären Harnblasenkarzinomen.....	55
3.4	<i>Uroplakin</i> RT-PCR von humaner Urothel-mRNA mit den human-Uroplakin-spezifischen Primer-Oligonukleotiden.....	55
3.5	Multiplexe Uroplakin RT-PCR von humaner Urothel- und Harnblasenkarzinom-mRNA mit den human-Uroplakin-spezifischen Primer-Oligonukleotiden	56
3.6	Uroplakin Ib RT-PCR von Zellverdünnungsreihen in peripheren Blut.....	58
3.7	<i>Differential Display</i> Reverse Transkription Polymerase Kettenreaktion (ddRT-PCR) einer Reihe von Urothelkarzinomen verschiedener Malignitätsgrade (G1 bis G4) und von zwei normalen Urothelien zum Vergleich – Nukleinsäuresequenzen der differentiellen PCR-Produkte.....	59
3.8	<i>Differential Display</i> RT-PCR mit den AP1 und 2 Primern.....	60
3.8.1	Ferritin H (Schwere Kette).....	60
3.8.2	Mitochondriale 12 S ribosomale RNA.....	61
3.9	<i>Differential Display RT-PCR</i> mit AP1+ / T ₁₂ -NotI Primern	62
3.9.1	Metastase-assoziiertes , kalziumbindendes S100A4/MTS1 Protein.....	62
3.10	<i>Homologiedomänen Konsenssequenz</i> RT-PCR mit dem SH2-Bindungsregion EEY-Primer und dT ₁₂ -NotI.....	63
3.10.1	High mobility group Protein HMG-1.....	64
3.10.2	L19 ribosomales Protein.....	65
3.10.3	Humanes Neutrophilen-Cytochrom b, leichte Kette.....	65
3.10.4	Homo sapiens keratin-verwandtes Protein, Zytokeratin 17	66
3.11	Unbekannte Sequenzen	66
3.12	Verifikation bzw. Falsifikation der differentiellen Expression der sequenzierten ddRT-PCR Proben durch konventionelle PCR	69

3.13	Differentielle Expression einiger ausgesuchter Gene, die bei der Entstehung und Ausbreitung von Urothelkarzinomen oder anderen Krebsarten von nachgewiesener oder potentieller Bedeutung sind und/oder als Tumormarker dienen könnten.....	74
4.	Diskussion.....	79
4.1	Uroplakin-PCR.....	79
4.2	Differential Display RT-PCR.....	84
4.3	Direktsequenzierung mit den kurzen 10-mer <i>Differential Display</i> -Primer-Oligonukleotiden.....	90
4.4	Durch die ddRT-PCR differentiell dargestellte Transkripte.....	91
4.4.1	Ferritin, schwere Kette.....	91
4.4.2	Mitochondriale 12S ribosomale RNA.....	92
4.4.3	High mobility group Protein HMG-1.....	93
4.4.4	CAPL/S-100-related Calcium-binding Protein, p9Ka, mts1 Gen.....	96
4.4.5	Weitere differentielle Transkripte.....	97
4.5	Untersuchung der differentiellen Expression verschiedener bekannter Gene mittels semiquantitativer RT-PCR.....	98
4.6	Ausblick.....	101
5.	LITERATURVERZEICHNIS.....	106
	DANKSAGUNG.....	124

1. Einleitung

Urothelkarzinome sind bösartige Neubildungen (maligne Neoplasien), die aus dem Epithel (Urothel) des Harnhohlsystems (Nierenkelche und -becken, Harnleiter und -blase, sowie Harnröhre) entstehen. Sie stellen 94% der Harnblasenkarzinome und etwa 3% aller bösartigen Tumoren in den Industrieländern (Kurth und Rübber 1993). Die Harnblase ist aufgrund ihrer großen Urotheloberfläche der häufigste Ort der Urothelkarzinome. Diagnose und Klassifizierung der Urothelkarzinome werden initial nach zytopathologischen Kriterien und bildgebenden Untersuchungen (Endoskopie und Sonographie) erstellt. Molekulare Marker haben in der klinischen Routine und bei der pathologischen Begutachtung, trotz intensiver Forschungsanstrengungen und einer Vielzahl untersuchter Moleküle, noch keine Verbreitung gefunden. Der Grund hierfür liegt an der zu geringen Spezifität oder Sensitivität, und am fehlenden zusätzlichen Informationswert im Vergleich zu den gebräuchlichen diagnostischen Methoden.

Angesichts der Unsicherheit bei der urinzytologischen Diagnostik gut differenzierter Urothelkarzinome – die Zellen sind nach rein zytomorphologischen Kriterien kaum von normalen abgeschilferten Epithelzellen der Harnwege (Urothelzellen) zu unterscheiden - besteht ein dringliches Interesse an geeigneten molekularen Markern, die neben der frühen Diagnose eines Urothelkarzinoms, differenzierte Aussagen über dessen Malignitätsgrad und die Prognose für den Patienten ermöglichen, damit eine angemessene Therapie eingeleitet werden kann. Auch für die Verlaufsbeobachtung bei therapeutischen Maßnahmen und zur Nachsorgeuntersuchung wäre ein Marker, der ein Rezidiv frühzeitig anzeigen würde, noch bevor ein Tumor sich zystoskopisch darstellte, von großer Wichtigkeit (vgl. auch Sidransky 1997). Denn die Progressionsrate zu bösartigeren Tumoren ist bei rezidivierenden Urothelkarzinomen hoch, und je früher eine Therapie begonnen wird, um so besser sind die Aussichten für den Patienten, seine Harnblase zu behalten und zu überleben.

Mit der vorliegenden Arbeit wird der Versuch unternommen, zu einer verbesserten molekularen Diagnostik der Urothelkarzinome beizutragen. Dabei wird folgender Doppelstrategie gefolgt:

Erstens werden Botenribonukleinsäuren (mRNAs) einiger bekannter Gene auf ihre Eignung als Tumormarker an einer Reihe von Urothelkarzinomen unterschiedlicher Malignitätsgrade (Grad G1 bis G4) untersucht. Dabei liegt der Schwerpunkt auf den einzigen urothelspezifischen Molekülen, die bislang beschrieben wurden: den *Uroplakinen*.

Zweitens wird durch Darstellung differentieller Genexpression von Urothelkarzinomen im Vergleich zu normalen Urothelien mittels *Differential Display* Reverse Transkription Polymerase Kettenreaktion (ddRT-PCR) nach Genprodukten gesucht, die an der Entstehung und/oder Progression von Urothelkarzinomen beteiligt sein, und als Tumormarker dienen könnten.

1.1 Urothelkarzinome

Begriffsklärung: Wenn von Harnblasenkarzinomen gesprochen wird, sind in der Regel Urothelkarzinome gemeint, die in der Harnblase lokalisiert sind. Diese stellen etwa 94% der Harnblasenkarzinome, und über 90% der Urothelkarzinome entstehen in der Harnblase. Dennoch sei hier darauf hingewiesen, daß die Begriffe Harnblasen- und Urothelkarzinom keine Synonyme sind. In Endemiegebieten der Blasenbilharziose z.B. machen Plattenepithelkarzinome den Hauptteil der Harnblasenkarzinome aus. Diese sind von ihrer Herkunft letztlich auch Urothelkarzinome, haben aber vor ihrer malignen Transformation (Entartung) eine Plattenepithelmetaplasie (als Auswirkung der chronischen Infektion und Entzündung) durchgemacht, sodaß sie histologisch keine Ähnlichkeit mehr mit Urothel haben. Außerdem gibt es, allerdings seltener, Adenokarzinome in der Harnblase. Manche statistische Daten beziehen sich auf die Lokalität Harnblase, und in einigen Artikeln wird der Begriff Blasenkarzinom verwendet – gemeint ist damit die Harnblase, und nicht etwa die Gallenblase -, ohne daß explizit die Art des Karzinoms genannt wird. Deshalb wird an entsprechenden zitierten Stellen der Begriff Harnblasenkarzinom übernommen.

1.1.1 Epidemiologie

Harnblasenkarzinome stellen den fünfthäufigsten Krebs unter US-Amerikanern. Es werden jährlich mehr als 50.000 neue Fälle von Blasenkrebs in den USA diagnostiziert und 11.000 Todesfälle durch eine fortgeschrittene Erkrankung, die häufig mit Metastasen einhergeht, registriert (einen kurzen und guten Überblick gibt die Amerikanische Krebsgesellschaft auf der Internet-Seite: http://www3.cancer.org/cancerinfo/res_home.asp?ct=44).

Die *Inzidenz*, das ist die Zahl der in einem Jahr Neuerkrankten pro 100.000 Einwohner, beträgt im Mittel 20, wobei Männer beinahe 3mal so häufig betroffen sind wie Frauen. Sie steigt altersabhängig von 0,2 bei den unter Zwanzigjährigen bis auf 200 bei den männlichen über Achzigjährigen. Rauchen stellt den höchsten einzelnen Risikofaktor außer dem Alter dar. Weitere wesentliche Risikofaktoren sind Zugehörigkeit zu einer Rasse und geographische Aspekte (weiße US-Amerikaner erkranken mit einer Inzidenz von etwa 21, Schwarze aber nur mit einer Inzidenz von 10). Die Mortalität, das ist die Zahl der Todesfälle je 100.000 Einwohner in einem Jahr, beträgt in Südafrika 8, in Japan jedoch nur 2,4 und in Mitteleuropa liegt sie bei 5,6 (Rübben und Otto 1997).

Die von der *Dachorganisation Krebs* geschätzte Zahl jährlich neu an Krebs Erkrankter beträgt für das Jahr 1995 in Deutschland 333.000. Der Anteil von Harnblasenkrebs liegt bei 5,29% und steht in Deutschland damit an siebter Stelle nach dem Krebs der Brustdrüse (12,94%), der Lunge (11,11%), des Dickdarms (9,97%), der Prostata (7,54%), des Magens (5,95%) und des Mastdarms (5,56%). Betrachtet man die Zahlen für Männer und Frauen getrennt, so findet man bei Männern einen Anteil Harnblasenkrebs an Gesamtkrebserkrankungen von 7,74% (12.500 von 161.000), das ist etwa zweieinhalbmal häufiger als bei Frauen: 2,98% (5.100 von 171.400) (Robert Koch-Institut 1998). Die Zahlen für die jährlich standardisierte Inzidenz und Mortalität, altersspezifische Erkrankungsrate, altersstandardisierte und kumulative Erkrankungs- und Sterberaten, Altersverteilung der Erkrankungsrate, mittleres Erkrankungs- und Sterbealter, relative Überlebensrate, regionale und internationale Vergleiche sind auf der Internet-Seite des Robert Koch-Instituts (<http://www.rki.de/GBE/KREBS/TRENDS/INDEX.HTM>) zu finden.

1.1.2 Karzinogenese

Ionisierende Strahlen und chemische Karzinogene führen direkt oder indirekt zu Schäden an der DNA, die, wenn sie nicht repariert werden, zu dauerhaften Veränderungen der genetischen Information (Mutationen) führen können. Strukturelle Veränderungen können Punktmutationen (Austausch einer Base gegen eine Andere, Deletion oder Insertion einer Base, was Leserasterverschiebungen verursacht), Chromosomenbrüche mit eventueller Translokation von Genen, sowie mehr oder weniger große Deletionen oder Insertionen sein. Auf die Einzelheiten

bei den primären karzinogenen Ereignissen und Mechanismen soll hier nicht eingegangen werden. Bekannte direkte oder indirekte Auswirkungen der genetischen Veränderungen sind:

1. Inaktivierung von Tumorsuppressorgen durch Deletion des *einen* Allels, gefolgt von einer Mutation des noch Verbliebenen. Tumorsuppressorgenprodukte sind an der Zellzykluskontrolle beteiligt.
2. Aktivierung von Proto-Onkogenen: durch Translokation vor einen aktiven Promotor; durch Mutationen, die zu konstitutiv aktiven, d.h. nicht mehr der Regulation unterworfenen, Molekülen und damit zu unkontrollierter Zellteilung führen; durch Mutationen in regulatorischen Sequenzen, wie Promotor- und Enhancersequenzen, oder Spleißstellen; durch Genamplifikation mit resultierender erhöhter Expression, wie auch durch Trisomie (oder höher) eines Chromosoms oder eines Bruchstückes desselben. Proto-Onkogene können Wachstumsfaktoren oder deren Rezeptoren, Moleküle der mitogenen Signaltransduktion, sowie Transkriptionsfaktoren sein.
3. Expression von Wachstumsfaktoren *und* deren Rezeptoren, die zu autokriner Autonomie führen kann.
4. Unter- oder übermäßige Bildung von Adhäsionsmolekülen, was für Invasion und Metastasierung von Bedeutung sein kann.
5. Synthese von angiogenetischen Faktoren, die Gefäßneubildungen induzieren und damit für das Wachstum eines größeren Tumors (> 2mm) Voraussetzung sein können. Dies gilt nicht für das Urothelkarzinom.
6. Sekretion von Enzymen, die an der Auflösung extrazellulärer Matrix beteiligt sind und somit Invasion ermöglichen.
7. Expression von immortalisierenden Molekülen, wie der *Telomerase*, einem Ribonukleoprotein, das die bei jeder Zellteilung verkürzten Telomere (Chromosomenenden) wieder verlängert, und so der Instabilität des Genoms bei Unterschreitung einer kritischen Telomerlänge und dem damit verbundenen Zelltod vorbeugt.

Eine chemische Karzinogenese ist beim Urothelkarzinom wahrscheinlich und tierexperimentell gut belegt. Beim Menschen ist die Identifizierung eines Karzinogens schwierig, da die Latenzzeit von der Karzinogenexposition bis zum manifesten Tumor im Mittel 24 Jahre beträgt. In einer ausgeschalteten Harnblase entwickeln sich keine Karzinome, während eine verlängerte Verweildauer von Urin, z.B. durch Harnleiterobstruktion, zu erhöhter Karzinomhäufigkeit führt. Teilweise werden inaktive Prokarzinogene im Urin erst enzymatisch

aktiviert (z.B. in der Leber N-hydroxylierte und glukuronidierte Konjugate durch β -Glukuronidase im Urin) (Rübben und Otto 1997).

Eine erhöhte Häufigkeit an Urothelkarzinomen zu erkranken wurde nach Exposition mit aromatischen Aminen, besonders 2-Naphtylamin, beobachtet. Dies begründet möglicherweise auch die hohe Inzidenz urothelialer Krebserkrankungen unter Zigarettenrauchern und Arbeitern in Färbe- und Gummi-Industrien (Garnick und Brenner 1991).

Rauchen dürfte der größte einzelne Risikofaktor für Blasenkrebs sein. Im Vergleich zu Nichtrauchern, tragen Raucher nach Schätzungen das doppelte Risiko diese Erkrankung zu entwickeln (Cairns und Sidransky 1998).

Zu den gesicherten Blasenkarzinogenen gehören neben 2-Naphtylamin, 4-Aminobiphenyl (Diphenylamin) und Benzidin, die besondere Bedeutung bei der Exposition bestimmter Berufsgruppen haben, auch die Medikamente Phenacetin (heute kaum mehr verwendet) und Cyclophosphamid, ein alkylierendes Zytostatikum (Rübben und Otto 1997).

Chronische Harnwegsinfekte führen zu einer Häufung von Urothelkarzinomen. Ob dies auf die damit verbundene Nitrosaminbildung zurückzuführen ist, gilt als noch nicht gesichert. Auch Dauerkatheterisierung und Blasensteine erhöhen das Erkrankungsrisiko. Bei chronischen Infekten mit *Schistosoma haematobium*, dem Erreger der Blasenbilharziose, besonders in Endemiegebieten (weite Regionen Afrikas und in arabischen Ländern), kommt es zu einer fortschreitenden Entartung von Urothelzellen, ausgehend von einer Hyperplasie (übermäßige Zellproliferation, die aber, im Unterschied zur Dysplasie und zum Karzinom, nach Ausschaltung der verursachenden Noxe, reversibel ist), über eine Dysplasie und plattenepitheliale Metaplasie (Umdifferenzierung), bis hin zu Plattenepithelkarzinomen. In diesen Gegenden macht diese Tumorart die Mehrheit der Harnblasenkarzinome (bis zu 80%) aus, während in den Industrieländern das Urothel- oder Übergangsepithelkarzinom (Transitional Cell Carcinoma, TCC) überwiegt (über 90%). Mehr als 80% der Plattenepithelkarzinome sind mäßig bis schlecht differenziert, und wachsen schon zum Zeitpunkt der Erstdiagnose muskelinvasiv. Die 5-Jahres-Überlebensrate liegt bei 5-26%. Adenokarzinome der Harnblase sind mit 0,2 bis 2% seltener und haben eine beinahe ebenso schlechte Prognose (5-Jahres-Überlebensrate von 18-33%) (Rübben und Otto 1997).

Ein saprophytisch in gelagertem Getreide wachsender Pilz, der Nephrotoxine und karzinogene Mykotoxine bildet (z.B. Ochratoxin A), soll nach der *Mykotoxinhypothese* an der Entstehung der Urothelkarzinome bei der Balkannephropathie beteiligt sein (nach der alternativen *Pliozän-Lignit-Hypothese* soll die Erkrankung durch Langzeitexposition mit polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffen und anderen toxischen organischen

Verbindungen verursacht sein, die aus Kohlelagerstätten in Siedlungsnähe ins Trinkwasser sickern (Tatu et al. 1998).

Die durch ein Karzinogen ausgelösten Strukturveränderungen an der DNA führen durch defekte Proteine oder fehlgesteuerte Genexpression zur Tumorgenese. Die Untersuchung der Strukturveränderungen an der DNA durch Zytogenetik (eine gute Übersicht geben Sandberg und Berger 1994), Mutationsanalyse (siehe z.B. Hollstein et al. 1991 für das p53 Tumorsuppressorgen), Allelotypisierungen etc. sind nicht Gegenstand der vorliegenden Arbeit.

Diese bezieht sich allein auf veränderte Genexpression (Transkription), dargestellt durch *Reverse Transkription-Polymerase Kettenreaktion (RT-PCR)* Techniken. Gesucht werden Gene, deren Transkripte in veränderten Mengen in den Zellen vorliegen, wie beispielsweise bei Überexpression von *Onkogenen*; nach Verlust eines *Tumorsuppressorgen*allels mit resultierender Unterexpression des verbliebenen, häufig mutierten Allels; bei Hochregulierung von *Motilitätsfaktoren* (z.B. extrazelluläre Matrix- oder Basallaminaproteine abbauende Enzyme, Metalloproteinasen e.g.); sowie bei Über- oder Unterexpression von *Adhäsionsmolekülen*, *Wachstumsfaktoren* und deren *Rezeptoren*, *Signaltransduktionsmolekülen*, z.B. *Proteinkinasen* und *-phosphatasen*, sowie *Transkriptionsfaktoren* etc.

1.1.3 Klassifikation der Urothelkarzinome

Die Klassifikation der Tumoren nach lokaler Ausdehnung des Primärtumors *T*, Lymphknotenbefall *N*, Metastasierungsgrad *M* (*TNM*-Klassifikation) und Entdifferenzierungsgrad ("grading"; *G*) wird nach den Richtlinien der *Internationalen Union gegen den Krebs* (*Union Internationale Contre le Cancer* UICC; siehe *International Union Against Cancer* 1992) vorgenommen.

TNM-Klassifikation:

Tis	Carcinoma in situ (nicht infiltrativ, nicht exophytisch*)
Ta	exophytisch, nicht infiltrativ
T1	Invasion in die Lamina propria
T2	Invasion in die oberflächliche Muskulatur
T3a	Invasion in die tiefe Muskulatur
T3b	Invasion in das perivesikale Fettgewebe
T4	Invasion in Nachbarorgane

* Exophytisches Wachstum: über die Epitheloberfläche ins Lumen wachsend

Urothelkarzinome metastasieren vor allem in Lunge, Leber und Knochen.

Die histopathologische Gradeinteilung (*Grading*) erfolgt nach zytologischen Kriterien, wie Zell- und Kernpolymorphie, Hyperchromasie des Zellkerns, erhöhte Kern-zu-Plasma-Relation, und Mitoserate bezogen auf die Gesamtzellzahl:

G1	gut differenziert
G2	mäßig differenziert
G3	schlecht differenziert
G4	undifferenziert, anaplastisch

Zwischen Infiltrationstiefe und Differenzierungsgrad besteht eine enge Korrelation. Oberflächlich wachsende Karzinome sind in 60% der Fälle gut differenziert, dagegen tief muskelinvasiv und extravesikal (außerhalb der Harnblase) wachsende Karzinome meist mittelgradig bis schlecht differenziert (Rübben und Otto 1997).

Der Differenzierungsgrad korreliert mit dem Ploidiegrad. Aneuploidie liegt nur bei 9% der G1-Tumoren, aber bei 73% der G3-Tumoren vor. Eine Risikoabschätzung lymphogener Metastasierung und eine Progressionsbeurteilung des *Carcinoma in situ* ist möglich, wenn man die Aneuploidiebestimmung durch die Bestimmung des Anteils Zellen in der S-Phase des Zellzyklus ergänzt (Rübben und Otto 1997).

Urothelkarzinome sind in der Regel multifokal, haben aber wahrscheinlich einen monoklonalen Ursprung. Dies legt eine Studie nahe, die X-chromosomale Inaktivierungsmuster an 13 Harnblasentumoren von Frauen untersucht hat (Sidransky et al. 1992).

1.1.4 Diagnostik der Urothelkarzinome

Es gibt kein pathognomisches (für die Erkrankung typisches) Zeichen für Harnblasenkrebs. Die meisten Patienten zeigen eine mikroskopische Hämaturie. Gelegentlich können auch eine Makrohämaturie und Schmerz zur Einleitung der Diagnostik führen. Von der zytologischen Begutachtung von Urinsedimenten, über die endoskopische Untersuchung der Harnblase (Zystoskopie) mit Entnahme von Gewebeproben, die histopathologisch beschrieben werden, bis zur transurethralen Resektion von Harnblasentumoren besteht ein fließender Übergang von rein diagnostischen bis zu kombinierten diagnostisch-therapeutischen Maßnahmen. Bei fortgeschritten-invasiven Tumoren werden bildgebende radiologische Techniken mitverwendet. Die *exfoliative Urinzytologie* ist besonders bei den endoskopisch schwer erkennbaren *in situ* Karzinomen, die in der Regel einem entdifferenzierten Stadium angehören, erfolgreich. Bei gut differenzierten G0 bis G1 Tumoren, deren Zellen morphologisch kaum von normalen abgeschilfertem Urothelzellen zu unterscheiden sind, ist dagegen die falsch-negative Rate mit etwa 40% sehr hoch. Bewährt hat sich inzwischen die Technik der Fluoreszenzzystoskopie mit δ -Aminolävulinsäure zur Sichtbarmachung flacher, rasenförmiger Tumorareale in der Harnblase.

Die *Mikrosatellitenanalyse* an Urinzellen könnte eine zuverlässige Methode bei der Entdeckung von Blasenkrebs werden, die eventuell die invasive, kostspielige und für den Patienten unangenehme Zystoskopie, zum heutigen Zeitpunkt noch Methode der Wahl, ersetzen kann (Mao et al. 1996; Steiner et al. 1997; Linn et al. 1997). Im Genom gibt es eine hohe Zahl repetitiver Abschnitte, die Polymorphismen (Variationen) aufweisen, die für ein Individuum charakteristisch sind und somit eine Art „Fingerabdruck“ darstellen (Naidoo und Chetty 1998). Etwa 30% der DNA Wiederholungssequenzen sind als kurze Tandemwiederholungen angeordnet, die Mikrosatelliten genannt werden. Sie können aus 1, 2 oder 3 Nukleotiden bestehen und werden stabil vererbt. Da die Mikrosatelliten in allen Körperzellen eines Individuums gleich sind, können sie zur Identifizierung einer Person, für populationsgenetische Untersuchungen und zur Erstellung eines Evolutionsstammbaumes genutzt werden. Mikrosatelliten sind auch in verschiedenen für Krebs wichtigen Genorten

lokalisiert, sodaß sie zur Detektion von Deletionen und dem Verlust der Heterozygotität von Tumorsuppressorgenorten nützlich sind. Bei der Mikrosatellitenuntersuchung werden mit der Polymerase Kettenreaktion, unter Verwendung von Primer-Oligonukleotiden passend zu Mikrosatelliten-Wiederholungssequenzen, entsprechende Abschnitte aus der DNA von Tumorzellen und normalen Lymphozyten desselben Individuums amplifiziert und die Amplifikatmuster miteinander verglichen.

1.2 Uroplakine: Gewebsspezifische und differenzierungsabhängige Proteine des Urothels

Uroplakine (UP) wurden als die ersten gewebsspezifischen und differenzierungsabhängigen Marker für Urothel beschrieben. Sie wurden zuerst biochemisch aus den apikalen Plaques der luminalen Zellmembranen von urothelialen Deckzellen aus Rinderharnblasen isoliert (eine gute Übersicht geben Wu et al. 1994). Später wurden die zu den mRNAs der vier bekannten *Uroplakine* (Ia, Ib, II und III) komplementären DNA-Moleküle (cDNAs) kloniert und sequenziert (Yu et al. 1994; Lin et al. 1994; Wu und Sun 1993).

Die physiologische Funktion der *Uroplakine* ist unbekannt, es wird aber angenommen, daß sie eine Rolle bei der Stabilisierung der apikalen Zellmembran der Deckzellen während der Ausdehnung bei Füllung der Harnblase spielen (Wu et al. 1994). Uroplakin III besitzt eine zyttoplasmatische Domäne, die mit dem Netzwerk von Filamenten unter den apikalen Plaques, wie dies auf elektronenmikroskopischen Abbildungen zu sehen ist, zu interagieren scheint. Sie könnte so die apikalen Plaques mit dem Zellskelett verbinden (Wu et al. 1994).

Uroplakine I und III sind stark N-glykosyliert und könnten damit zur Muzinschicht über den Plaques beitragen, von der angenommen wird, daß sie bakterielle Besiedlung verhindert (Wu et al. 1994).

Im Widerspruch hierzu steht die *in vitro* Beobachtung, daß *Escherichia coli* mit Typ I Fimbrien an die *Uroplakine* Ia und Ib binden. Diese Interaktion könnte eine Rolle bei der Pathogenese aufsteigender Harnwegsinfektionen spielen (Wu et al. 1996). Uropathogene *Escherichia coli* Stämme tragen Typ I Fimbrien mit denen sie spezifisch an *Uroplakin* Ia und Ib binden. Eine elektronenmikroskopische Studie an transurethral mit einem *E.coli*-Zystitis-Isolat infizierten C57BL/6 Mäusen zeigt die Anheftung der Pili an *die* Stellen in den hexagonalen Komplexen von quasikristalliner Anordnung in der apikalen Zellmembran der Schirm- oder Deckzellen, die von UPIa und Ib gebildet werden (Mulvey et al. 1998). Die dadurch induzierte massive Abschilferung der Deckzellen wird als angeborener Abwehrmechanismus des

Wirtsorganismus interpretiert und scheint durch eine Art der Apoptosis ausgelöst zu werden, die durch den Caspase-Inhibitor Boc-Aspartyl(OMe)-Fluormethylketon (*BAF*) blockiert wird, wie dieselben Autoren mit einem *TUNEL*-Test (*terminal deoxynucleotidtransferase-mediated deoxyuridine triphosphate nick end labeling*) zeigen. Uropathogene *E. coli* können diesem Wirtsabwehrmechanismus durch Eindringen in tiefere Gewebsschichten entgehen, und chronisch rezidivierende Harnwegsinfektionen verursachen.

Moll et al. konnten 1995 durch immunhistochemische Untersuchungen zeigen, daß Lymphknotenmetastasen von humanen Urothelkarzinomen zu einem großen Teil *Uroplakine* exprimieren.

Uroplakine sind in der Säugerevolution hochkonservierte Proteine, wie dies die Ultrastruktur der kristallinen Anordnung dieser Plaqueproteine, ihre Molekülgrößen und die Immunreaktivität von Antikörpern gegen Rinder-*Uroplakine* mit *Uroplakinen* von acht anderen Arten, einschließlich des Menschen, zeigen. Wu et al. haben 1994 von einer 83%igen Übereinstimmung der Aminosäuresequenzen der *Uroplakine* II von Maus und Rind, die von der cDNA- und der genomischen Nukleinsäure-Sequenz respektive abgeleitet waren, berichtet.

Diese Befunde lassen vermuten, daß ein ähnlicher Grad der Übereinstimmung mit den humanen *Uroplakinen* existiert, sodaß Primer-Oligo-Nukleotide, die für eine uroplakin-spezifische Polymerase Kettenreaktion von den Nukleinsäuresequenzen der Rinder-*Uroplakine* ausgewählt werden, auch mit großer Wahrscheinlichkeit die entsprechenden Abschnitte humaner cDNAs spezifisch amplifizieren würden.

Die einzigen derzeit bekannten gewebspezifischen Differenzierungsmarker für Urothel sind, wie bereits vorgestellt, die *Uroplakine*. In Analogie zum *Prostata Spezifischen Antigen* (PSA) als biochemischem Marker für Prostataerkrankungen, könnte deshalb ein Bluttest auf *Uroplakine* geeignet sein, das Vorhandensein eines invasiven und eventuell metastasierenden Urothelkarzinoms zu erkennen. Die erste Frage ist folglich, in welchem Ausmaß Urothelkarzinome verschiedener pathologischer Grade und Stadien die *Uroplakine* transkribieren. Zum Zweck dieser Untersuchung muß zuerst eine geeignete Methode gewählt werden. Die derzeit empfindlichste Methode ist die Polymerase-Kettenreaktion (PCR). Sie erlaubt die Darstellung eines spezifischen Transkripts einer einzelnen Fremdzelle aus der gesamten RNA von weißen Blutzellen nach Lysis der Erythrocyten. Aus diesen Gründen sollte hier ein *Uroplakin* RT-PCR Test entwickelt werden. Dazu dienten die Nukleinsäuresequenzen des Hausrinds (*Bos taurus*), da die humanen Sequenzen für die *Uroplakine* zu diesem Zeitpunkt noch nicht bekannt waren. Aufgrund der hohen interartlichen Homologie wurde der Versuch unternommen, aus den Rinderuroplakinsequenzen selektierte Primer-Oligonukleotide für die

PCR-Amplifikation der entsprechenden *Uroplakin*-Abschnitte aus humaner urothelialer cDNA zu nutzen. Anschließend wurde die Methode verwendet, um die Uroplakinexpression primärer Harnblasentumoren zu testen. Desweiteren sollte die Methode so verfeinert werden, daß eine einzelne Urothelkarzinomzelle im Blut nachgewiesen werden kann.

Ein weiterer Differenzierungsmarker ist das Protein *Mal-1*, das aber nicht für Urothel spezifisch ist. Es wurde in Urothelzellkulturen, in denen Differenzierung – Bildung von Tight Junctions, Desmosomen und E-Cadherin an Zell-Zell-Verbindungen, und Stratifikation - induziert wurde, mit der *Differential Display* RT-PCR gefunden (Liebert et al. 1997). Ursprünglich ist *mal-1* bei der humanen T-Zelldifferenzierung entdeckt worden. Seine Expression in urothelialen Primärkulturen und Tumoren soll mittels RT-PCR untersucht werden.

1.3 Tumormarker für Urothelkarzinome

Es wird hier kurz darauf eingegangen, was unter Tumormarker verstanden wird und welche Moleküle bis heute als Marker für Urothelkarzinome untersucht wurden, da einerseits einige davon als Referenzmoleküle zur Charakterisierung der untersuchten Urothelkarzinome in die vorliegende Arbeit einbezogen werden, und um andererseits einen Überblick zu geben, Transkripte welcher Proteinfamilien bei der Darstellung der differentiellen Genexpression mittels *Differential Display RT-PCR* zu erwarten sind.

1.3.1 Tumormarker

Tumormarker stellen idealtypisch qualitative oder quantitative Veränderungen dar, die genutzt werden, eine bestimmte Krebsart zu erkennen (Diagnose), den Therapieerfolg zu überwachen, Rezidive zu entdecken und Hochrisikogruppen (z.B. bei beruflicher Karzinogenexposition) auf Anwesenheit eines Tumors zu untersuchen. Sie sollen also pathognomisch sein. Die geforderte Tumorspezifität ist in der Realität allerdings selten gegeben, da es sich meist um Moleküle handelt, die auch normalerweise im Körper vorkommen, wenn auch an anderem Ort oder zu anderer Zeit.

Bei den **onko-fötalen Antigenen** handelt es sich um Proteine, die während bestimmter Phasen der Embryonal- oder Fötalentwicklung exprimiert werden, im adulten Organismus aber nicht, oder nur in geringen Mengen vorhanden sind. Als Beispiel sei das *Carcino-Embryonale*

Antigen (CEA) genannt, welchem besondere Bedeutung bei gastrointestinalen Neoplasien zukommt. *CEA* wird von einigen Blasenkarzinomen gebildet, kommt aber auch bei Blasenentzündung vor. Dies zeigt die geringe Tumorspezifität, weshalb *CEA* auch nicht zur Krebsüberwachung einer Bevölkerung taugt, sondern bestenfalls über die Tumorausdehnung oder ein Rezidiv Auskunft geben kann. Es muß außerdem noch einschränkend festgestellt werden, daß auch nicht-*CEA*-bildende Subpopulationen von Krebszellen Rezidive erzeugen können. Ein Anstieg des *CEA* Spiegels kann daher ein Tumorwachstum anzeigen, umgekehrt aber läßt das Ausbleiben einer *CEA*-Erhöhung nicht auf Tumorfreiheit schließen. *CEA* ist außerdem erhöht bei Rauchern, chronischen Lungenerkrankungen, alkoholischer Zirrhose, Hepatitis und entzündlichen Darmerkrankungen.

Tumormarker können auch **Hormone** sein, wie z.B. *humanes Choriongonadotropin (hCG)*, das normalerweise nur vom trophoblastischen Epithel der Plazenta produziert wird, und in seinem Serumspiegel während der Schwangerschaft ansteigt. Das Hormon kann auch von trophoblastischen Neoplasien, sowie von Keimzelltumoren der Hoden und Ovarien ins Blut abgegeben werden. Andere Malignome können *hCG* ektop bilden. Hierzu gehören auch einige Urothelkarzinome (Dirnhofer et al. 1998; Oyasu et al. 1994; Smith et al. 1994).

Als **zytogenetisch** auffälliger Tumormarker sei das *Philadelphia-Chromosom* bei der chronischen myeloischen Leukämie genannt. Es wird durch eine Translokation zwischen Chromosom 9 und 22 gebildet. Diese führt zu einem Fusionsprotein aus Teilen der Genprodukte der *bcr* (breakpoint cluster region) und des Protoonkogens *c-abl* mit Tyrosinkinaseaktivität und onkogener Wirkung.

Genamplifikation. Expressionsprodukte amplifizierter Gene können als Tumormarker dienen, wenn sie, wie z.B. *N-myc* in Neuroblastomen und *erbB* in Brustkrebs, verstärkt gebildet werden. Auch das amplifizierte Gen selbst kann als Marker verwendet werden, indem die Genamplifikation beispielsweise mit einer DNA-Sonde in einer *Southern Hybridisierung* oder *in situ* quantifiziert wird.

Der **Verlust der Heterozygotität** an einem Tumorsuppressorgenort kann u.a. durch *Fluoreszenz-in situ-Hybridisierung* (FISH) oder mittels *Mikrosatelliten-PCR* erkannt werden.

Außerdem können **gewebstypische Enzyme** als Tumormarker im weiteren Sinn genutzt werden, wenn sie, wie z.B. *saure Phosphatase* bei Prostatakarzinomen (eine Prostatamassage hat allerdings den gleichen Effekt) ins Blut gelangen und im Serum gemessen werden können.

1.3.2 Marker für Urothelkarzinome

Im Folgenden werden einige Moleküle, die bei Urothelkarzinomen auf ihre Eignung als diagnostische und/oder prognostische Marker untersucht wurden, kurz vorgestellt. Es handelt sich um Tumormarker im weiteren Sinn, denn für Urothelkarzinome sind bislang noch keine spezifischen Marker entdeckt worden. Keiner dieser Marker hat bisher den durchschlagenden Erfolg bei der Diagnose und Prognose der Urothelkarzinome gebracht und allgemeine Verbreitung in pathologischen Labors erfahren. Einen aktuellen Literaturüberblick, der prognostische Marker bei Blasenkrebs umfaßt, geben Stein et al. 1998.

1.3.2.1 Onkogene

Onkogene können die maligne Transformation normaler Zellen induzieren. Eine einzelne funktionsfähige Kopie eines dominanten Onkogens vermag Zellen einige Aspekte des malignen Phänotyps zu verleihen.

Ras ist ein Guaninnukleotid-bindendes Protein mit GTPase-Aktivität, und vermittelt die Signalübertragung von Wachstumsfaktoren, die an ihren Rezeptor gebunden haben. Die konstitutive Aktivierung des *ras*-Proto-Onkogens kann durch *eine* vertauschte Aminosäure im Protein, die Substitution eines Valin durch ein Glycin an Position 12 der Sequenz, geschehen (Darnell et al. 1990).

In einem Doxozyklin-induzierbaren *H-ras*^{V12G} Mausmodell beispielsweise, das nullzygot für das Tumorsuppressormolekül *INK4a* ist, hängt die Melanomentstehung von der Expression von *H-ras*^{V12G} ab (Chin et al. 1999). Aktivierte *ras*-Expression ist zur Erhaltung des kutanen Melanomwachstums unabdingbar. Der Entzug von Doxozyklin und damit verringerte *ras*-Expression führte zu klinischer und histologischer Regression von primären und explantierten Tumoren infolge starker Apoptosis der Tumorzellen und der vom Empfängertier stammenden Endothelzellen.

Es treten zwar in 7 bis 16% der Urothelkarzinome *H-ras* Mutationen auf, und könnten in diesen Fällen zur Tumorgenese beitragen, diese korrelieren aber nicht mit Tumorgrad und Stadium (Knowels und Williamson 1993). *H-ras*, das erstentdeckte dominante Onkogen, wurde in einer Zelllinie (*T24*) identifiziert, die von einem humanen Harnblasenkarzinom stammt (Reddy et al. 1982; Alper u. Lodish 1991).

Das Proto-Onkogen *c-erbB 2* weist teilweise Homologie zum Rezeptor des epidermalen Wachstumsfaktors (*EGF-R*) auf. Seine Überexpression korreliert mit einer schlechten Prognose beim Mammakarzinom. Die Rolle beim Urothelkarzinom ist noch unklar.

Das *c-myc* Protein ist an der Regulation der Zellproliferation und Differenzierung beteiligt. In einer Vielzahl von Tumoren ist die *c-myc*-Expression verändert. Eine immunhistochemische Studie zeigt *c-myc* Überexpression in 18% der *in situ* Karzinome (7/39), in 58% der papillären urothelialen Tumoren (38/65), in 56% der T1 und 59% der muskelinfiltrierenden Tumoren der Harnblase. Es besteht aber keine Korrelation von *c-myc* Überexpression und Tumorgrad und -stadium (Schmitz-Drager 1997).

Das *bcl-2* Proto-Onkogen ist in wenig differenzierten Urothelkarzinomen geringfügig aber signifikant höher exprimiert als in gut bis mäßig differenzierten Tumoren oder in normalen Urothelien (King et al. 1996). *Bcl-2* unterdrückt Apoptosis – den programmierten Zelltod – und kooperiert mit anderen Onkogenprodukten bei der malignen Transformation.

Obwohl viele Protoonkogene in Humantumoren identifiziert wurden, wurden nur wenige gefunden, die in Harnblasenkrebs konsistent verändert sind (Cairns u. Sidransky 1998). Sie sind als allgemeine Marker für Urotheltumoren wenig geeignet.

1.3.2.2 Tumorsuppressorgene

Das *p53* Tumorsuppressorgen auf Chromosom 17p erfährt in vielen Tumoren einen Allelverlust und Punktmutationen, seltener andere Mutationsarten, des verbliebenen Allels (Hollstein et al. 1991). Dies führt zum Funktionsausfall des an der Regulation von Zellzyklusarrest und Apoptosis nach DNA-Schädigung beteiligten *P53* Proteins. In manchen Fällen führt die Mutation sogar zu einem Protein mit onkogenen Eigenschaften, die zur Transformation der Zelle beitragen können. Auch bei Urothelkarzinomen werden Mutationen im *p53* Gen beschrieben und die veränderte Expression mit ungünstiger Prognose in Verbindung gebracht (Sidransky et al. 1991, Fujimoto et al. 1992). In seiner Zellzykluskontrolle wirkt *p53* über die Regulation der Expression von *p21^{WAF1/CIP1}*. Veränderungen von *p53* führen häufig zum Ausfall der *p21* Expression, was die Zellteilungsrate erhöht. Es existiert aber auch eine *p53* -unabhängige *p21* Expression. Der Verlust der *p21* Expression ist stark mit erhöhter Rezidiv-Wahrscheinlichkeit verbunden (Serrano et al. 1993).

Von einer signifikanten Assoziation zwischen *mdm2* und *p53* Überexpression berichten Lianes et al. 1994. Diese beiden Moleküle könnten wichtige diagnostische und prognostische Marker für Harnblasenkarzinome werden. MDM2 bindet P53 und verhindert so die transkriptionelle Aktivität von P53 (McDonnell 1999).

Eine veränderte Expression des *Retinoblastom* Tumorsuppressorgens (*rb*), das auf Chromosom 13q liegt, wird in allen pathologischen Graden und Stadien von Harnblasenkrebs gefunden, ist aber stärker mit invasiven Tumoren verbunden. Das Kernprotein ist zellzyklusabhängig phosphoryliert und wirkt in seiner physiologisch aktiven, hypophosphorylierten Form als Inhibitor der Zellzyklusprogression am G1-S Kontrollpunkt (Stein et al. 1998). Nach einer Studie von Presti et al. von 1991 korrelieren nur die veränderte *rb* Expression und Deletionen auf den Chromosomen 3p und 17p (auf letzterem liegt das *p53* Tumorsuppressorgen) mit pathologischen Kriterien.

Das Gen von P16, einem Inhibitor der *zyklinabhängigen Kinase 4 (CDK4)*, war in 5 von 15 Blasentumorzelllinien homozygot deletiert (Kamb et al. 1994). Auch ein weiteres Zellzykluskontrollgen, das *p15*, kann betroffen sein (Orntoft und Wolf 1998).

Einen guten Überblick zum Thema Zellzykluskontrolle und Krebs geben Hartwell und Kastan (1994).

1.3.2.3 Wachstumsfaktoren und ihre Rezeptoren

Angiogenese eine Rolle. Verstärkte Blutkapillarneubildungen sind an vielen Tumoren beobachtet worden, nicht aber beim Urothelkarzinom, wo es keinen Unterschied in der Kapillardichte von Urothelkarzinomen und normalem Harnblasenwandgewebe zu erkennen gibt (Rübben und Otto 1997, S.107).

Der epidermale Wachstumsfaktor *EGF* ist im Urin in hohen Konzentrationen enthalten und bindet an *EGF*-Rezeptoren, die im normalen Urothel auf die Zellen der Basalschicht begrenzt sind, während Urothelkarzinome und deren prämaligen Vorläuferzellen durchgängig *EGF*-Rezeptoren auf ihrer Oberfläche tragen (Nakopoulou 1995). Die Rezeptordichte korreliert mit Grad und Stadium des Tumors. Urothelkarzinome mit *EGF*-Rezeptoren führen mit größerer Wahrscheinlichkeit zu Rezidiv, Progression und Tod (Stein et al. 1998).

Das *c-erbB-1* Proto-Onkogen auf Chromosom 7 kodiert das *EGF*-Rezeptor Gen. Trisomie 7 ist eine häufige zytogenetische Beobachtung in Harnblasentumoren und könnte zu einer erhöhten

EGF-Rezeptor Expression auf Tumorzellen führen (Cairns u. Sidransky 1998; Sandberg 1986 u. 1990).

Das dem *EGF-Rezeptor* ähnliche Onkoprotein *c-erbB-2 (HER-2/neu)* wird häufig in Krebszellen überexprimiert. Eine erhöhte Immunreaktivität mit einem Antikörper (p185) gegen die extrazelluläre Domäne zeigte keine Beziehung zu DNA-Gehalt, Tumorstadium oder klinischer Darstellung der untersuchten Harnblasenkarzinome (Swanson 1992).

1.3.2.4 Zellskelettproteine: Zytokeratine

Zytokeratine (CK) sind wesentliche Bestandteile der Intermediärfilamente von Epithelzellen. Sie bilden eine Genfamilie von 20 verwandten Proteinen (*CK 1-20*) und werden in unterschiedlichen Kombinationen, abhängig von Epitheltyp und Differenzierungsgrad exprimiert. *Zytokeratine* zeigen im normalen Urothel eine charakteristische Verteilung (Moll 1993). Die zylinderepitheltypischen *Zytokeratine 7, 8, 18, und 19* werden in allen Schichten exprimiert. *CK 13* wird nur in Basal- und Intermediärschichten gefunden. Die Basalzellen exprimieren außerdem noch *CK 5 und 17*. Eine starke, aber heterogene Expression von *CK 20* ist auf die Deckzellen beschränkt. Interessanterweise ist dieses deckzelltypische *Zytokeratin* noch in den meisten Urothelkarzinomen, auch in Metastasen, nachweisbar. Zwischen Primärtumoren und Metastasen besteht kein Unterschied im *Zytokeratinmuster*. *CK 20* ist auf gastrointestinale Epithelien, Urothel und Merkelzellen begrenzt (Miettinen 1995). Die differentielle Expression bestimmter *Zytokeratine* in verschiedenen Karzinomtypen, macht sie zu nützlichen Markern für die histopathologische Subtypisierung der Karzinome, die wichtige Informationen bezüglich Differenzierung und Herkunft von Karzinomen verleiht, besonders wenn sich Tumoren zuerst als Metastasen darstellen. Die für die differentielle Diagnostik verwendbaren *Zytokeratine* schließen das *CK20* ein, da es hauptsächlich in Karzinomen *CK20*-positiver Epithelien exprimiert wird; es kommt aber auch in Gallentrakts-, pankreatischen und mukinösen ovarialen Adenokarzinomen vor. In bestimmten Karzinomtypen kann der Wechsel im Expressionsmuster individueller *Zytokeratine* während der Tumorprogression von prognostischer Bedeutung sein (Moll 1994).

1.3.2.5 Zelladhäsionsmoleküle: *Cadherine*, *Catenine* und *CD44*

E-Cadherin ist ein kalzium-abhängiges Adhäsionsmolekül, das für die epitheliale Zell-Zell-Verbindung wichtig ist. Bei einer Untersuchung verschiedener Urothelkarzinomzelllinien zeigte sich, daß nicht-invasive Zelllinien (RT4 e.g.) eine starke *E-Cadherin*-Expression im Bereich der Interzellularkontakte aufweisen, während bei invasiven Zelllinien (J82) kein *E-Cadherin* nachweisbar war. Durch Transfektion mit *E-Cadherin* cDNA konnte diese invasive und metastatische Zelllinie in eine nicht-invasive Zelllinie transformiert werden (Frixen et al. 1991).

Die Unterdrückung der Invasivität von Krebszellen durch Transfektion mit *E-* oder *P-Cadherin* ist von Zell-Zell-Kontakten abhängig (Kontaktinhibition), wie in einem *in vitro* Matrigel-Filter-Invasions-Test mit mehr oder weniger dicht ausgesäten Transfektanten gezeigt wurde (Steinberg und Foty 1997).

In Magenkarzinomzelllinien konnten Oda et al. (1994) Mutationen im *E-Cadherin*-Gen nachweisen.

Eine verringerte *E-Cadherin*-Expression bei Harnblasenkarzinomen korreliert mit Tumorinvasivität und Rezidivhäufigkeit (Lipponen und Eskelinen 1995).

Catenine verankern das *E-Cadherin* Membranprotein im Zellskelett, und transduzieren Signale nach homophiler Bindung von *E-Cadherin* (Nagafuchi et al. 1993 geben eine gute Übersicht).

Eine erniedrigte *a-Catenin* Expression wurde bei humanen Karzinomen vom diffusen Typ in Verbindung mit invasiven Eigenschaften gefunden (Nakanishi et al. 1997; Hirohachi 1998).

Die Lungenkarzinomzelllinie *PC9* exprimiert *E-Cadherin* und *b-Catenin*, nicht aber *a-Catenin*. *PC9* zeigt nur geringe *E-Cadherin*-abhängige Adhäsion. Nach Transfektion mit *a-N-Catenin* cDNA entstehen gut organisierte epitheliale Strukturen mit einiger Polarität und starker Zell-Zell-Adhäsion.

In einer locker adhärenen Krebszelllinie, die keine Mutationen in den *E-Cadherin*, *a-* und *b-Catenin* Genen aufwies, und diese normal exprimierte, wurde eine starke Tyrosinphosphorylierung von *b-Catenin*, eine Schwache dagegen bei *E-Cadherin* entdeckt. Das *c-erbB-2* Onkogenprodukt kopräzipitierte mit dem *E-Cadherin-Catenin*-Komplex. *EGF*-Rezeptor, der mit dem *c-erbB-2* homolog ist, interagiert mit *b-Catenin* und induziert die Tyrosinphosphorylierung der *Catenine*, sowie die Ausbreitung (scattering) von Krebszelllinien (Hirohachi 1998 gibt eine gute Übersicht).

CD44 ist ein Zelloberflächen-Rezeptor für Hyaluronsäure, der seine Signale via Tyrosinkinase transduziert (Taher et al. 1996). Verschiedene Isoformen, die durch alternatives Spleißen entstehen, sind in einer Anzahl von Krebsarten mit Tumorprogression korreliert (Borland et al. 1998). Die *CD44c6* Isoform, die bei der Ratte mit einem metastatischen Phänotyp verbunden ist, wird beim Menschen von normalem Urothel gebildet, während wenig differenzierte Harnblasenkarzinom-Tumoren und Zelllinien nur noch die *CD44* Standardform aufweisen (Hong et al. 1995). Auf der mRNA Ebene war die Expression der *CD44* Variante *V2* in urotheliale Krebs, nicht aber in normalem Urothel zu finden. Im Gegensatz dazu zeigte eine immunhistochemische Untersuchung mit Antikörpern gegen Standard *CD44* und die Variante 2 keine Spezifität für das Urothelkarzinom, da auch normales Urothel mit den Antikörpern reagierte. Es zeigte sich auch kein Unterschied zwischen invasiven und nicht-invasiven Karzinomen. Der in einem *ELISA* (Enzyme-Linked Immunosorbant Assay) gestestete Gehalt an *CD44V2* und *CD44S* in Lysaten von Urinsedimenten korrelierte nicht mit der Diagnose. Daher ist *CD44V2* kein nützlicher diagnostischer Marker zur Detektion von Urothelkarzinomen (Muller 1997).

Iczkowski et al. (1998) fanden, daß der Verlust der *CD44 Variante 6* kleinzellige Karzinome der Harnblase von Urothelkarzinomen differenziert.

1.3.2.6 Desmosomale Proteine

Verringerte Desmosomendichten wurden bei invasiven Urothelkarzinomen gefunden. In einer elektronenmikroskopischen Untersuchung zeigte sich eine erhöhte Desmosomenzahl in nicht-invasiven Urothelkarzinomen im Vergleich zu normalem Urothel (Alroy et al. 1981). Eine immunhistochemische Untersuchung kommt zu dem Ergebnis, daß der monoklonale Antikörper 32-2B, der das desmosomale Glykoprotein 1 spezifisch bindet, als epithelialer Marker bei Neoplasien von Wert sein könnte, daß aber die desmosomale Färbung nicht mit klinischen Kriterien, wie Rezidiv- und Progressionsraten korreliert (Conn et al. 1990).

1.3.2.7 Nexus (gap junction) Proteine

Die *Connexine* (Cx) wurden in Monolayerkulturen von Urothelkarzinomzelllinien mit unterschiedlicher urothelialer Differenzierung (*HCV-29*, *RT4* und *J82*) immunhistochemisch und im Western Blot untersucht. Die Connexin-Expression war während der gesamten Dauer der

Zellkultur positiv, nur in J82 Zellen fehlte Cx26 und in HCV-29 Zellen das Cx32. In HCV-29 Zellen stieg die Cx26-Reaktivität mit der Dauer der Zellkultur an. Die Übertragung des Farbstoffes *Lucifer Yellow* zeigte eine Steigerung der Kopplung (Nexus-Funktion) bei der normalen urothelialen Zelllinie HCV-29, dagegen eine Abnahme bei den Tumorzelllinien. In normalem Urothel sind alle drei Connexine vorhanden, während in hochdifferenzierten Tumoren Cx26 verloren geht. Knuechel et al. folgern daraus, daß Cx26 eine Rolle bei der negativen Wachstumskontrolle und der Urotheldifferenzierung spielen (Knuechel 1996).

1.3.2.8 Motilitätsfaktoren: Scatter Factor/HGF

Der Hepatozyten Wachstumsfaktor (*HGF*; *hepatocyte growth factor*) ist mit dem *Scatter Factor* (*SF*) identisch. Er wird von mesenchymalen Zellen sezerniert und übt eine parakrine Wirkung auf Epithelzellen aus, die den *HGF*-Rezeptor tragen. Er induziert deren Ausstreuen (*scattering*) durch Reorganisation des Zellskeletts, Verlust interzellulärer Verbindungen und Zelldissoziation, sowie durch aktive Migration und Invasion der extrazellulären Matrix. *HGF* spielt eine Hauptrolle bei Differenzierung und Morphogenese. Der *HGF*-Rezeptor wurde zuerst als ein konstitutiv aktiviertes Onkogen *c-met* in einer Osteosarkomzelllinie, die mit einem chemischen Karzinogen behandelt war, entdeckt (es lag als *Tpr-Met* Fusionsprotein vor). Durch eine Andockstelle für das Adapterprotein *GRB-2* besteht eine Verbindung zum *Ras*-Signaltransduktionsweg. Durch eine einzelne Punktmutation im Rezeptor konnten die Eigenschaften der neoplastischen Transformation und der Metastasierung voneinander getrennt werden. Die Stimulation von Zielzellen resultiert in der Autophosphorylierung des *p190^{MET}* Rezeptors. Durch *Proteinkinase C* (*PK-C*) wird der *HGF* Rezeptor negativ reguliert. Die *src*-Homologie (*SH2*) Domänen von *Phosphatidylinosit-3-OH* (*PI 3*) *Kinase*, *Phospholipase Cg*, *Shc* und *pp60c-src* binden mit hoher Assoziations- und Dissoziationsrate an bestimmte Phosphotyrosinreste der spezifischen Andockstellen. In einer großen Zahl von Krebsarten ist eine erhöhte *MET* Expression beobachtet worden, eine Amplifikation des Gens wurde aber vorwiegend in Metastasen gefunden. Der Transkriptionsfaktor *ETS-1*, der auch an invasivem Wachstum beteiligt ist, bindet an die Promotorregion von *c-met* und aktiviert die *MET* Expression. Der aktivierte *HGF* Rezeptor induziert im Gegenzug die Transkription des *ets-1* Gens. *HGF/SF* wird von Stromazellen nach Stimulierung durch ein hochmolekulares Protein sezerniert, das in Urothelkarzinomextrakten, Urin von Harnblasenkarzinompatienten und *in vivo* detektiert wurde (Rosen et al. 1997). Dieses *SF*-induzierende Protein, oder der Scatter Factor

selbst könnte als Marker für urotheliale Malignität geeignet sein (Ansamma et al. 1995). Einen guten Überblick zum Thema vermitteln Maggiora et al. 1997.

1.3.2.9 Hypomethylierung und die Rolle von DNA-Methyltransferasen

Häufig wird in Tumorzellen eine generelle Hypomethylierung der genomischen DNA gefunden (Laird und Jaenisch 1996). Eine fehlerhafte DNA-Methylierung könnte zur Instabilität des Genoms einiger kolorektaler Tumorzelllinien beitragen (Lengauer et al. 1997). Dies unterstützt die Hypothese von Fearon und Vogelstein (1990), die genomische Demethylierung als wichtigen Schritt der Karzinogenese postuliert. Chen et al. berichten 1998 von einer erhöhten Mutationsrate am endogenen Hypoxanthin-Phosphoribosyltransferase (*Hprt*) Gen und an einem integrierten viralen Thymidinkinase (*tk*)-Transgen in embryonalen Stammzellen der Maus, die nullzygot für die DNA Methyltransferase (*Dnmt1*) sind. Gendeletionen waren der vorherrschende Mutationstyp.

1.3.2.10 Telomerase

Mit jeder Zellteilung verkürzen sich die Chromosomenenden, die Telomeren, um 50 bis 200 Nukleotide der Telomerasequenz aufgrund von Eigenschaften der DNA Polymerase bei der Synthese (Kim et al. 1994). Dies führt zu einer endlichen Zahl möglicher Mitosen („mitotische Uhr“), denn die Unterschreitung einer bestimmten Telomerlänge führt zu einer Instabilität des Genoms, die Zelle reagiert darauf mit Teilungsstopp und Seneszenz. Telomerase ist ein Ribonukleoproteinenzym, das normalerweise in den Keimzellen exprimiert wird. Es verlängert die Telomere und trägt somit zu einer Immortalisierung dieser Zellen bei. Telomeraseaktivität wurde in vielen Arten maligner Tumoren, auch in Harnblasenkarzinomen gefunden (Kamata et al. 1996) und läßt sich zur nicht-invasiven Detektion abgeschilfter Urothelkarzinomzellen im Urin verwenden (Yoshida et al. 1997).

1.3.2.11 Fas/Fas-Ligand

Fas-Antigen-Ligandbindung spielt eine wichtige Rolle bei der zytotoxischen zellulären Immunreaktion (zytotoxische T-Lymphozyten und "Natural Killer" Zellen) gegen virusinfizierte

oder transformierte Zellen, wobei sie in Zielzellen Apoptosis induziert. Tumorzellen in verschiedenen neoplastischen Erkrankungen nutzen diesen Mechanismus, um z.B. durch Sekretion von *Fas* der Immunabwehr zu entgehen. Erhöhte Werte für lösliches *Fas* im Serum könnte mit einer schlechten Prognose für Harnblasenkarzinompatienten einhergehen (Mizutani et al. 1998).

1.3.2.12 Kernmatrixproteine

Ein Urintest auf *NMP* (nuclear matrix protein) 22 konnte in einigen Studien neu diagnostizierte oder rezidivierende Blasen Tumoren entdecken (Soloway et al. 1996; Stein et al. 1998).

1.3.2.13 Blutgruppenantigene und andere Glykoproteine der Zelloberfläche

Verstärkte Expression von *Lewis^X* und *Lewis^Y* Blutgruppenantigenen wurde auf der Oberfläche von Urothelkarzinomen gefunden (Cordon-Cardo et al. 1988). *Lewis^X* wurde zur immunhistochemischen Detektion von Harnblasentumorzellen in Urin verwendet (Golijanin et al. 1995; Sheinfeld et al. 1990).

Metanestin, ein weiteres Glykoprotein, welches eine Metastase-assoziierte Expression in Urothelkarzinomen zeigt, wurde von Takemoto et al. (1997) entdeckt.

Das Glykoprotein gp170, das vom Multi-Drug-Resistance-Gen *mdr1* kodiert wird, ist eine membranständige Effluxpumpe für eine Vielzahl lipophiler chemischer Verbindungen. Sie verleiht Tumorzellen Resistenz gegen eine Reihe unterschiedlicher Zytostatika. Erhöhte *mdr1*-Expression korreliert mit verringerter Anreicherung des verwendeten Zytostatikum im Zellplasma (Noonan et al. 1990).

1.4 Signaltransduktion durch Tyrosinkinasen

Die Tyrosinphosphorylierung zellulärer Proteine wurde zuerst als Signalantwort auf Wachstumsfaktoren und Onkogene entdeckt. Sie ist das Resultat eines fein abgestimmten Gleichgewichtes von Protein-Tyrosin-Kinasen (PTKen) und -Phosphatasen (PTPasen). PTKen können in Rezeptor-Tyrosin-Kinasen (RTKen), in der Regel Wachstumsfaktor-Rezeptoren, und zytosolische Tyrosin-Kinasen eingeteilt werden (Van der Geer et al. 1994).

Die zytosolischen Tyrosin-Kinasen werden durch Rezeptoren, die selbst keine intrinsische Kinaseaktivität haben, benutzt, um Signale zu transduzieren, wie z.B. viele Rezeptoren für Hormone, Zytokine und extrazelluläre Matrixproteine. Die zytosolischen Tyrosin-Kinasen werden in vier Hauptfamilien unterteilt: *Fak*, *Jak*, *Src* und *ZAP70/Syk*.

Durch Tyrosin-Phosphorylierung und –Autophosphorylierung werden hochaffine Bindungsstellen für *SH2*- (*src*-Homologie 2) und *PTB*- (Phosphotyrosinbindung) Domänen geschaffen, die für die Interaktion der an der intrazellulären Signalübertragung beteiligten Proteine von großer Bedeutung sind.

Die meisten Signale die durch Zell-Zell- und Zell-Matrixinteraktionen, sowie durch Bindung von Wachstumsfaktoren, Zytokinen und Hormonen, einschließlich auto- und parakriner Faktoren, an ihre Rezeptoren entstehen, werden über solche Transduktionsmoleküle vermittelt. Sie können für den Phänotyp von Krebszellen mitverantwortlich sein. Manche dieser Moleküle sind als Onkogenprodukte bekannt, und es ist zu vermuten, daß sich eine Reihe weiterer transformierender Proteine darunter befinden und auf ihre Entdeckung warten (Defilippi und Tarone 1997).

1.5 Differential Display Reverse Transkription-Polymerase Kettenreaktion (ddRT-PCR)

Die *Differential Display* Reverse Transkription-Polymerase Kettenreaktion (ddRT-PCR) ist eine Technik zur Darstellung von differentiell transkribierter mRNA mittels Zufallsprimer von 10 Basenpaaren Länge und Polyadenylat-Ankerprimer (Liang und Pardee 1992). Theoretisch würde mit allen möglichen Kombinationen der 4 Nukleinsäurebasen in 10mer Oligonukleotiden die Amplifikation von spezifischen Fragmenten aus allen Transkripten einer Zelle möglich sein. Der große Vorteil dieser Methode ist ihre relative Einfachheit, der geringe Zeitaufwand und vor allem die Möglichkeit, die Expressionsmuster mehrerer Proben auf *einem* Polyacrylamidgel nebeneinander darzustellen. Bei alternativen Methoden, die auf dem Prinzip der *substraktiven Hybridisierung* basieren, werden nur *zwei* Zellpopulationen oder Gewebe miteinander verglichen, wobei nur spezifische Transkripte der *einen* Probe isoliert werden, von der die zweite Probe, die aus einem Gemisch (Pool) von RNA oder cDNA mehrerer Zellpopulationen oder Geweben bestehen kann, subtrahiert wird. Bei der ddRT-PCR werden in beiden Proben sowohl auf-, als auch abregulierte Transkripte gefunden. Bei der *substraktiven Hybridisierung* werden die den beiden zu vergleichenden Proben gemeinsamen Transkripte aus der RNA der *einen* Probe durch Hybridisierung mit einem Überschuß an Treiber-cDNA von mRNA der *anderen*

Probe eliminiert. Die differentiellen mRNAs werden in komplementäre DNA-Kopien revers-transkribiert, die dann kloniert und sequenziert werden. Es können mit den differentiellen Transkripten markierte Gensonden hergestellt werden, um cDNA Bibliotheken zu durchsuchen.

Urothelkarzinome zeigen, wie andere Krebsarten auch, große Heterogenitäten auf, sowohl auf der zellmorphologischen („Grading“) und -soziologischen (TNM-Klassifikation, ob *in situ* Karzinom oder exophytischer Tumor, Invasionsneigung und Metastasenbildung), als auch auf der korrespondierenden zytogenetischen und molekularen Ebene. Daher ist der Informationsgewinn größer, wenn eine Reihe individueller Tumoren zur Darstellung kommt. Dies würde bei den letztgenannten Alternativmethoden einen wesentlich größeren Zeit- und Arbeitsaufwand, sowie den Einsatz großer RNA- bzw. Gewebemengen, welche nicht vorhanden sind, erfordern. Aus diesen Gründen wird für diese Untersuchung die Methode der *Differential Display* Reverse Transkription Polymerase Ketten Reaktion (ddRT-PCR) gewählt.

1.6 Homologiedomänen-Konsenssequenz RT-PCR (Hodoko RT-PCR)

Anstatt einerseits nur bekannte Genprodukte zu untersuchen, und damit wahrscheinlich nur einen kleinen Teil der für das Krebsgeschehen verantwortlichen Moleküle zu erfassen (konventionelle RT-PCR), und andererseits mit willkürlich ausgewählten Zufallssequenzen alle in einer Zellpopulation vorliegenden Transkripte repräsentieren zu wollen (ddRT-PCR), versucht diese Arbeit neben den eben genannten methodischen Ansätzen einen Mittelweg zu beschreiten: In Homologieregionen von Proteinfamilien wurden Kernkonsenssequenzen gesucht, die für die meisten Familienmitglieder gelten, und davon Oligonukleotidsequenzen für PCR-Primer abgeleitet. Für die *SH2*-Domäne z.B. wurde die maximale Übereinstimmung in der Aminosäuresequenz ESET (Glu-Ser-Glu-Thr) gefunden. Die gemäß des degenerativen genetischen Kodes abgeleitete Nukleinsäuresequenz lautet: gay tcn gay ac (das 3'-terminale, unbestimmte Nukleotid wurde weggelassen, um das für die Primerbindung wesentliche 3'-Ende nicht unspezifisch zu lassen; y entspricht einem g oder a an derselben Position, n entspricht einer der vier Basen). Die Konsens-Aminosäuresequenz, die nach Tyrosinphosphorylierung am häufigsten durch *SH2*-Domänen gebunden wird, besteht aus EEY (Glu-Glu-Tyr). Die abgeleitete Nukleotidsequenz ist: gay gay ta (die letzte unbestimmte Base wurde wieder aus genanntem Grund weggelassen). Für die *SH3*-Domäne wurden zwei Konsenssequenzen identifiziert: LYDY (Leu-Tyr-Asp-Tyr) und SNYV (Ser-Asn-Tyr-Val). Die entsprechenden Nukleotidsequenzen lauten: ctn ta(t/c) ga(t/c) ta und ag(t/c) aa(t/c) ta(t/c) gt. Als Gegenstrang-Primer wurde ein

Thymidin-Oligonukleotid mit einer NotI Schnittstelle dT₁₂-NotI (gcg gcc gct ttt ttt tt) genutzt. Diese PCR-Methode ist vergleichbar mit dem Hybridisieren von cDNA-Bibliotheken mit entsprechenden degenerativen Oligonukleotidproben. Als Beispiel sei hier die Vorgehensweise von Matuoka et al. 1992 genannt, die auch nach mRNA Sequenzen mit *SH2*-Homologieregionen gesucht haben. Ihre Oligonukleotidprobe war komplementär zu der von der *SH2* Konsenssequenz FL(V/I)RESET abgeleiteten Nukleinsäuresequenz. Sie klonierten und beschrieben *ASH*, ein Protein mit einer *SH2* und zwei *SH3* Domänen. *ASH* funktioniert wahrscheinlich als ubiquitäres Signaltransduktionsmolekül. Es gleicht *Sem-5*, dem Produkt eines Nematoden-Signaltransduktionsgens, das zwischen einer Rezeptor-Protein-Tyrosin-Kinase und einem *Ras*-Protein vermittelt, und bindet *in vitro* an phosphotyrosinhaltige Proteine, einschließlich des aktivierten *EGF*-Rezeptors.

1.7 Zielsetzung der Arbeit

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, eine Reihe von Urothelkarzinom-Primärtumoren verschiedener pathologischer Malignitätsgrade und Stadien auf die Expression bekannter und unbekannter, für Tumorentstehung und maligne Phänotypen möglicherweise bedeutender Gene zu untersuchen. Durch Amplifikation genspezifischer mRNA-Fragmente durch Reverse Transkription Polymerase Kettenreaktion wird die Expression folgender, in der Einleitung kurz beschriebener Gene dargestellt: Der Mobilitätsfaktor *Hepatozyten Wachstumsfaktor/Scatter Factor (HGF/SF)*; das für unbegrenzte Zellteilungen wichtige *Telomerase-Ribonukleoproteinenzym (Telomerase RNA)*; die Adhäsionsproteine *E-Cadherin* und *CD44*; die mit *E-Cadherin* interagierenden zytoplasmatischen *Catenine a und b*; die für die Stabilität des Genoms und die allgemeine Genexpression bedeutenden DNA-Methyltransferasen *Dnmt 1* und *2*; die *Zytokeratine 8, 18* und *20*; die für Urotheldifferenzierung charakteristischen *Uroplakine* und das *Mal*-Protein; sowie das bei der multiplen Chemotherapieresistenz beteiligte, und als Effluxpumpe fungierende *mdr1* (Multi Drug Resistance) Genprodukt *P-gp 170*.

Unbekannte Gene werden mittels Starter(Primer)-Oligonukleotide willkürlich gewählter Sequenzen in der *Differential Display* RT-PCR, oder mittels Konsenssequenz-Primer in der *Homologiedomänen-Konsenssequenz (HoDoKo)*-RT-PCR dargestellt. Unter den "Unbekannten" sind auch bekannte Gensequenzen zu erwarten. Zweck der Strategie ist es aber, die Möglichkeit für die Entdeckung „neuer“ Gene offenzuhalten, die differentiell exprimiert werden, und sich eventuell als „neue“ Onkogene, Tumorsuppressorgene oder andere Gene erweisen, die für die

maligne Transformation, Invasion oder Metastasierung mitverantwortlich sind. Sie könnten bei der mitogenen Signalübertragung, der Zellzykluskontrolle, der Absiedlung vom Primärtumor (Auflösung der Adhäsion) und bei der Motilität, Invasivität, bis hin zur Gewebsaffinität (z.B. durch Expression bestimmter Integrine) während der ektopen Ansiedlung von Krebszellen und Bildung von Metastasen eine Rolle spielen. Sie könnten große diagnostische und/oder therapeutische Bedeutung bekommen. Umgekehrt sind auch Gene zu erwarten, die für die normale Differenzierung von Urothel, oder allgemein von Epithelien wichtig sind, und anti-tumorigen wirken könnten.

Die Expression der urothelspezifischen *Uroplakine* wird im Hinblick auf ihre Eignung als Marker für urotheliale Karzinome getestet und für die Entwicklung eines *Uroplakin* RT-PCR Bluttests genutzt.

Mit der vorliegenden Arbeit soll zur molekularen Charakterisierung von Urothelkarzinomen beigetragen werden. Sie geht von der Prämisse aus, daß nur durch die profunde Kenntnis der Unterschiede zwischen dem normalen und transformierten Zelltyp es möglich sein wird, den Phänotyp, einschließlich des malignen Verhaltens, wie Invasion, Metastasierung etc., zu verstehen und rationale Strategien zur Behandlung von Krebserkrankungen zu entwickeln, die gezielt und hochspezifisch in molekulare Strukturen und Prozesse transformierter Zellen eingreifen, ohne die Zellfunktionen normaler Gewebe zu stören. Darüberhinaus geben Erkenntnisse, die durch Untersuchungen an Krebszellen gewonnen werden, auch häufig Aufschluß über die entsprechenden Prozesse in normalen Zellen, Geweben und Organen, während der Entwicklung und im adulten Organismus (z.B. bei Regeneration, Wundheilung etc.).

Hoffnung und Zuversicht bleiben, daß immer mehr Krebsarten in ihren Ursache-Wirkungs-Zusammenhängen verstanden werden, und daß damit echte Heilung von Krebs realisierbar wird, was mit den heutigen therapeutischen Mitteln leider noch zu selten der Fall ist. Es besteht daher ein dringender Bedarf an verbesserten diagnostischen und therapeutischen Verfahren.

2. Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Gewebeproben

In der folgenden Tabelle werden den verwendeten cDNA Proben der Gewebetyp und die pathologische Klassifizierung des jeweiligen Primärtumors zugeordnet, dem die RNA entstammt (G: Malignitätsgrad; OP: Operation; T: Tumorstadium; TUR: transurethrale Resektion; ZE: Zystektomie):

Probe	Gewebetyp	TNM-Klassifizierung	Grad	Histologie	OP
1	Ureter-Bindegewebe ohne Urothel				
2	Harnblasentumor	pTa	G1	klein, papillär	TUR
3		pTa	G1	bifokal, papillär	TUR
4		pT3b	G1		ZE
5		pTa	G1		ZE
6		Urothel von Patient 5			
7	Harnblasentumor	pT1	G2	papillär	TUR
8		pT1	G2	papillär	TUR
9		pT3a	G2	part. papillär	TUR
10		pT3b2	G2		ZE
11			G2		ZE
12			G2		ZE
13		pT3b	G3	angedeutet adenoid-proliferativ	ZE
14	Urothel von Patient 13				
15	Harnblasentumor	pT3a	G3		ZE
16			G3		ZE
17		pT3b	G4	großzellig, part. adenoid	ZE

2.1.2 PCR-Primer-Oligonukleotide

Sequenzen der Oligonukleotide, die als Primer für die Amplifikation der angezeigten Fragmentgrößen aus den cDNAs der aufgelisteten Gene durch Polymerase Kettenreaktion (PCR) verwendet wurden:

Gen	5'-Sinnstrang-Primer	3'-Gegensinnstrang-Primer	bp
<i>bovin:</i>			
Uroplakin Ia	gct gac cag tac cgc ata ta	aca tgg cta tca gca tca cg	630
Ib	tcg tag gca tca tga agt cc	ctg ctc cag tag aac atg gt	541
II	tgc ata cca ggt gac aaa cc	agc agt gga gat aag agc ag	340
III	caa ctg gct agt gtg acc tt	gtt cac aga cgt gta tga gg	741
<i>human:</i>			
Uroplakin Ia	tgc atc acg tcc tac accca	gcc ctt ggt gaa cag gta gt	320
Ib	ctc ttc ctg aag cag atg ct	tcc agt aga aca tgg tac cc	408
II	tgc ata cca ggt gac aaa cc	ggg act tag ttc act gaa gg	527
III	gtc tac ctg tat gtc ctg gt	gat gga cgt gat gac gat ca	461
III _{Mac}	tgg tca ggg tgg gtg caa ac	gcc cgt gga cat aat gac cc	126
Mal-1	ttc teg gtc ttc acc acc ttg c (Liebert et al. 1997)	gag agt aaa cac agc acc cac	595
a-Aktin	agg cca acc gcg aga aga tga	atg tca cac tgg gga agc	446
GAPDH	aca gtc cat gcc atc act gcc (Lycke und Larsen 1995)	gcc tgc ttc acc acc ttc ttg	228
E-Cadherin	gat tct gct gct ctt get gt	agc cag ctt ctt gaa gcg at	451
a-Catenin	ctc tgg ctc ctg aat atc ag	gtt gct tac cac agg tca tc	389
b-Catenin	ctt gga tat cgc cag gat ga	cag gca ctt tct gag ata cc	326
CK 8	gta cga gga tat tgc caa cc	cgt gtc teg atc ttc ttc ac	609
CK 17	cgt cag gtg cgt acc att gt	ttg tca tca ggc aag gaa gc	215
CK 18	tca gga cct cgc caa gat ca	tgg tgt cat tgg tct cag ac	551
CK 20	ttc gga gta aca tgg aac gc	gat att agg tgg tct aca gc	551
Vimentin	cag tcc ctc acc tgt gaa gt	gat aac ctg tcc atc tct ag	396
dnmt-1	ttc agc aca acc gtc acc aa	cag aac tag tcc tta gca gc	290
dnmt-2	cta caa atc cct tac caa tt	cat atg acc atc ttt cag ag	251
Telomerase	aga tct cga cca gtc cct ca	tcc tac tgc tca agg tca tc	203
HGF	tga gaa tgg ttc ttg gtg tc	ctc cag tag ttg tct tag ga	250
P-gp	ccc atc att gca ata gca gg (Noonan et al. 1990)	gtt caa act tct get cct ga	157
Ferritin H	tca gtc act act gga act gc	cat tat cac tgt ctc cca gg	209
mt 12S rRNA	acg tta ggt caa ggt gta gc	gtt cgt cca agt gca ctt tc	281
rib. L19	cat gta tca cag cct gta cc	tct tgg tct ctt cct cct tg	233

mts1	aac gag gtg gac ttc caa ga	tca gca tca agc acg tgt ct	213
HMG1	gct gca tat cga gct aaa gg	ctg cgc tag aac caa ctt at	187
nucDSP	act gtg gac gag aag gcc tt	ggg tgt aca cac aag tgc tg	257
cyt b	cca ttg cga gcg gca tct ac	tca cac gac ctc gtc ggt ca	245
S-7	aga cgc ctc ggg tct ctc cg	ata ctt ggg tgg agg ctt cg	142
S-19	tgtaa aag agc agg gtc ac	tta ctg ttg gca aga cct ca	110
S-21	atg tct gat acg cgc cga at	tat cag tac caa gcg tga ag	105
EEY+	gac gtc cat gga yga yta		
SH3-SNYV	ag(ct) aa(ct) ta(ct) gt		
SH3-LYDY	ctn t(at)(ct) ga(ct) tt		
SH2-ESET	gan ag(ct) ga(ag) a(gc)		
AP1	tac aac gag g		
AP2	tgg att ggt c		
AP1+	gac gtc cat gga caa cga g		
AP 3.1	agg tga ccg t		
dT ₁₂ -NotI	gcg gcc gct ttt ttt ttt tt		

Die Oligonukleotide wurden in Auftragsynthese von MWG-Biotech in Ebersberg (<http://www.mwgdna.com>) hergestellt und in sterilem A. bidest. gelöst [100 µM].

2.1.3 Zelllinien

Die **RT4** Harnblasenkarzinomzelllinie (Abbildung 1c auf Seite 50) stammt von einem niedriggradigen (G1) papillomatösen primären Harnblasenkarzinom ab und stellt sich auch in Zellkultur als gut differenziert dar (Masters et al. 1986). Der einschichtige Inseln bildende Zellrasen zeigt eine starke Tendenz zu einem epithelartig dichten Zusammenhang, der auf starke Interzellularverbindungen schließen läßt. In der Regel bilden die RT4-Zellen einen einschichtigen Zellrasen, läßt man sie längere Zeit in einer Kulturflasche, so zeigen sie die Tendenz, anstatt sich flach über den Boden auszubreiten, eher innerhalb ihrer Inseln immer dichter zu wachsen, die Zellen werden dabei immer kleiner, um schließlich in die dritte Dimension auszuweichen, womit die Zellkultur mehrschichtig wird. So erscheint eine Zellinsel im phasenkontrast-mikroskopischen Bild im Vergleich zu typischen einschichtig wachsenden Zellkulturen als sehr dick, wie in der Abbildung (1c) auf Seite 50 an der Unschärfe des Pseudopodien-Randsaumes der Zellinseln und während des Mikroskopierens durch Auf- und Abfokussieren zu erkennen ist.

Die **5637** Harnblasenkarzinomzelllinie (Abbildung 1b auf Seite 49) besteht aus mäßig differenzierten (G2) Zellen, die nicht zur Inselbildung neigen, sondern sich relativ gleichmäßig über die gesamte Fläche der Kulturflasche ausbreiten. Es entstehen keine engen Interzellularverbindungen wie bei den RT4 Zellen.

Die Zelllinien wurden vom Deutschen Krebsforschungszentrum (DKFZ) in Heidelberg bezogen.

2.1.4 Nährmedien, Chemikalien und andere Materialien für die Zellkultur

Urothelzellprimärkultur

Keratinocyten-Serumfreies Medium	GibcoBRL, Eggenstein
Rinderhypophysenextrakt	GibcoBRL, Eggenstein
Humaner Epidermaler Wachstumsfaktor (rhEGF), rekombinant [10 µg/ml]	GibcoBRL, Eggenstein
Choleratoxin	Sigma, St. Louis, USA

Harnblasenkarzinomzelllinien

RPMI 1640	GibcoBRL, Eggenstein
-----------	----------------------

Fibrozyten

Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)	GibcoBRL, Eggenstein
Fötales Rinderserum	GibcoBRL, Eggenstein
L-Glutamin 200 mM	GibcoBRL, Eggenstein
Trypsin/EDTA (0,05%/0,02% in PBS, pH 7,2)	GibcoBRL, Eggenstein
Dispase I (lyophilisiert)	Boehringer, Mannheim
Trypanblau 0,5% (in 0,85% NaCl)	Flow Laboratories, Virginia
Zellkulturflaschen Nunclon™ 260 ml	Nunc, Wiesbaden-Biebrich
Multikammerkulturplatten (6-Kammer) Falcon	Becton-Dickinson, Heidelberg

2.1.5 Chemikalien für die RT-PCR und Sequenzierung

TRIzol™-Reagenz	GibcoBRL, Eggenstein
Oligo(dT) ₁₂₋₁₈ [0,5 mg/ml]	GibcoBRL, Eggenstein
MgCl ₂ (50 mM)	GibcoBRL, Eggenstein
dNTP-Mixtur (dATP, dCTP, dGTP, dTTP; jew. 10mM)	GibcoBRL, Eggenstein

Reverse Transkriptase:

M-MLV (Moloney Murine Leukemia Virus) bzw. Superscript II Reverse Transkriptase (200 units/μl)	GibcoBRL, Eggenstein
Erststrangpuffer 5 x [250 mM Tris-HCl (pH 8,3), 375 mM KCl, 15 mM MgCl ₂]	GibcoBRL, Eggenstein
Dithiothreitol (DTT) 100 mM	GibcoBRL, Eggenstein

Thermus aquaticus (Taq) DNA Polymerasen:

Taq DNA Polymerase [5 units/μl]	Boehringer, Mannheim
AmpliTaq Gold [5 units/μl]	Perkin Elmer, Weiterstadt
Platinum Taq [5 units/μl]	GibcoBRL, Eggenstein
PCR-Puffer, 10-fach konz. (pH 8,3 bei 20°C) [100 mM Tris-HCl, 15 mM MgCl ₂ , 500 mM KCl] bei Verwendung von PlatinumTaq Polymerase oder AmpliTaq Gold wurde die MgCl ₂ -Lösung [50 mM] separat geliefert	Boehringer, Mannheim GibcoBRL, Eggenstein Perkin Elmer, Weiterstadt

Die folgenden Chemikalien entsprechen der Reinheitsstufe für die Molekularbiologie:

Chloroform	Merck, Darmstadt
Isopropanol	Merck, Darmstadt
Ethanol	Merck, Darmstadt
Diethylpyrocarbonat	Sigma, St. Louis, USA

Acrylamid (30%)	Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Bisacrylamid (2%)	Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Ammoniumpersulfat (APS)	Merck, Darmstadt
TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin)	Merck, Darmstadt
Tris (Tris(hydroxymethyl)-aminomethan)	Merck, Darmstadt
Borsäure	Merck, Darmstadt
EDTA (Ethyldiamintetraessigsäure)	Merck, Darmstadt
HCl (konz.)	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid	GibcoBRL, Eggenstein
SYBR [®] Green I	Molecular Probes, Eugene, USA
Primer Oligo-Nukleotide (Auftragssynthese)	MWG-Biotech, Ebersberg

Molekulargewichtsmarker:

100 bp DNA ladder	GibcoBRL, Eggenstein
BioLadder [™] 100bp	AGS Angewandte Gentechnologie Systeme GmbH, Heidelberg

Stammlösungen:

Tris-Borat-EDTA (TBE)-Puffer, 10-fach konz.
 [108 g Tris Base, 55 g Borsäure, 40 ml 0,5 M EDTA (pH 8,0) auf 1 Liter]

Ethidiumbromid [10 mg/ml] wässrige Lösung, dunkel aufbewahrt

DNA-Auftragspuffer (6-fach konz.): 30% (v/v) Glycerol, 0,25% (w/v) Bromphenolblau

Sequenzierung

BigDye [™] Terminator Cycle Sequencing Kit	Perkin-Elmer, Weiterstadt
Centri-Sep Spin Columns	Princeton Separations, Adelphia, New Jersey, USA
QIAquick PCR Purification Kit	QIAGEN GmbH, Hilden

Klonierung

pGEM[®]-T Klonierungsvektor mit terminalen

Thymidinüberhängen für PCR-Produkte

Promega, Madison, WI, USA

T4 DNA Ligase [3 Weiss Einheiten/μl]

mit 10-fach konz. Puffer [300 mM Tris-HCL,

100 mM MgCl₂, 100 mM DTT, 10 mM ATP]

Promega, Madison, WI, USA

JM109 kompetente *Escherichia coli*

Promega, Madison, WI, USA

IPTG (Isopropyl-b-D-thiogalactopyranosid)

Boehringer, Mannheim

X-Gal (5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl-b-D-Galaktosid)

Boehringer, Mannheim

LB (Luria Bertani) Medium

GibcoBRL, Eggenstein

SOC Medium

GibcoBRL, Eggenstein

2.1.6 Geräte

Kühlzentrifuge 5402 (für 1,5 ml Röhrchen)

Eppendorf, Hamburg

Kühlzentrifuge Rotanta RP 4300 (15 ml und 50 ml)

Hettich, Tuttlingen

Thermocycler UNO und TRIO

Biometra, Göttingen

Horizontales Gel Elektrophorese System

GibcoBRL, Eggenstein

Vertikales Gel Elektrophorese System

(Mini-Protean II Dual Slab cell)

Bio-Rad, Richmond, CA, USA

ABI PRISM 310 Genetic Analyzer

Perkin-Elmer, Weiterstadt

ABI PRISM 373 A DNA Sequencer

Perkin-Elmer, Weiterstadt

2.2 Methoden

2.2.1 Gewebe und primäre Zellkulturen

Frisches Gewebe wurde auf direktem Weg vom Operationssaal ins Labor gebracht und sofort verarbeitet. Soweit es die Gewebemasse zuließ, wurde jeweils ein Drittel in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C aufbewahrt, in CryoMold Behältnissen mit TissueTek Medium eingebettet und schockgefroren, und in phosphatgepufferter 4%iger Formalinlösung für 24 Stunden bei 4°C eingelegt (Dies sei nur der Vollständigkeit halber erwähnt. Weil die anschließende Paraffineinbettung für die vorliegende Arbeit keine Relevanz hat, wird nicht weiter darauf eingegangen). Kleine transurethral resezierte Gewebeproben wurden insgesamt in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

2.2.2 Gewinnung von Urothelzellen aus Nierenbecken, Harnleitern und -blasen

Alle Arbeitsschritte wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Nierenbecken wurden nach Nephrektomie vom Nierenhilus her freipräpariert und mit dem Ureter entnommen. Das Gewebe wurde in PBS gespült und mit Schere und Pinzette von Fett- und lockerem gefäßführendem Bindegewebe befreit, sodaß nur noch das weiße, feste Bindegewebe zu sehen war. Danach wurden Nierenbecken und anhängender Ureter der Länge nach aufgeschnitten und in ca. 2 x 2 cm große Teile seziiert, die dann mit der Urothelschicht nach oben flach ausgebreitet in eine Kulturplatte mit sechs Kammern gelegt wurden. Zu jeder Gewebe enthaltenden Kammer wurden 5 ml Dispase I Lösung gegeben (verändert nach Fujiyama 1995). Die gefriergetrocknete Dispase I wurde in sterilem PBS gelöst (Stammlösung: 5 mg/ml). Für jede Kammer wurde 0,25 ml davon in 5 ml sterilem PBS zur Gebrauchslösung verdünnt. Nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden bei 4°C wurde die Urothelschicht mit einem Skalpell vorsichtig von der Bindegewebsunterlage geschoben, mit einer Pipette aufgenommen, in ein 15 ml Zentrifugenröhrchen zu 10 ml PBS gegeben und 10 min bei 400 x g und 4°C zentrifugiert.

Das Zellsediment wurde in 3 ml Trypsin/EDTA-Lösung (GibcoBRL) resuspendiert und 15 bis 20 min bei 37°C inkubiert. Nach Zugabe von 7 ml PBS oder Zellkultur-Medium wurde wieder bei 400 x g und 4°C zentrifugiert. Die sedimentierten Zellen wurden als Primärkultur in serumfreiem Medium (*Keratinozyten serumfreies Medium* mit 25 µg/ml Rinderhypophysenextrakt (BPE), 0,2 ng/ml epidermalem Wachstumsfaktor (rhEGF) und 30 ng/ml Cholera toxin (CT) resuspendiert, und nach Zellzählung in einer Neubauer Zählkammer (10 µl Zellsuspension wurde in 90 µl Trypanblau-Lösung verdünnt) in einer Dichte von 100.000 Zellen pro ml in 6-Kammer-Mikrokulturplatten oder 260 ml Kulturflaschen gegeben und in einem Inkubator bei 37°C in einer Atmosphäre von 5% CO₂ und 100%iger Luftfeuchtigkeit gehalten. Das Medium wurde in der Regel zweimal in der Woche oder bei Bedarf, wenn Medium verbraucht und angesäuert erschien, d.h. wenn der im Medium enthaltene pH-Indikator Methylrot verblaßte und das Medium eine gelbliche Färbung annahm, auch häufiger gewechselt. Wenn die Zellkultur konfluierte, wurde sie mit 10 ml PBS gespült und in 3 ml Trypsin/EDTA bei 37°C vom Boden der Kulturflasche oder Mikrokulturplatte gelöst, mit 7 ml PBS verdünnt, und in einem 15 ml Zentrifugenröhrchen 10 min bei 400 x g und 4°C zentrifugiert. Das Zellsediment wurde entweder in Zellkulturmedium resuspendiert und in 1:4 Dichte der Ausgangskultur weiterkultiviert, oder zur Gewinnung von RNA verwendet (s. 2.2). Eine repräsentative Urothel-Primärkultur wird in der Abbildung (1a) auf Seite 49 gezeigt.

Die nach Ablösung des Urothels verbliebene Bindegewebsschicht wurde mit einem Skalpell in kleine Stücke (ca. 1 mm x 1 mm) zerschnitten. Diese wurden entweder einzeln auf den Boden von 24-Kammer-Mikrokulturplatten gesetzt und nach 15 min Antrocknen bei Raumtemperatur mit DMEM/Ham's F12/10% FBS (2 ml pro well) überschichtet. Alternativ wurden die Bindegewebsblöckchen in einer Kollagenase-Lösung 1 bis 2 Stunden bei 37°C inkubiert und die Zellen mit PBS (10 x 5 ml) durch ein 100 µm Zellsieb (Falcon Cell Strainer) in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen (Falcon) gespült, 10 min bei 400 x g und 4°C zentrifugiert und nach Zellzählung in einer Dichte von 200.000 Zellen pro ml in Medium resuspendiert und in Kulturflaschen oder -platten gegeben. Die Kulturbedingungen waren wieder 37°C, 5% CO₂ und 100%ige Luftfeuchtigkeit. Die resultierende Fibroblasten-Kultur wurde bei Konfluenz 1 : 4 geteilt.

Zur Extraktion von Proteinen oder Nukleinsäuren wurden 10⁶ Zellen in 1 ml PBS resuspendiert, in einem 1,5 ml Zentrifugenröhrchen (Eppendorf) 10 min bei 400 x g und 4°C in der Mikro-Zentrifuge sedimentiert und ohne Überstand („trocken“) bei -80°C gelagert oder sofort weiterverarbeitet.

2.2.3 Zellkulturbedingungen

Die Urothelzellen wurden in einem serumfreien Medium kultiviert, das für Keratinozyten optimiert wurde (Southgate et al. 1994). Serum-freies Medium mit 25 µg/ml Rinderhypophysenextrakt, 0,2 ng/ml rhEGF und gegebenenfalls 30 ng/ml Cholera toxin (Letzteres nur für frisch aus Gewebe isolierte Urothelzellen).

Die Harnblasenkarzinomzelllinien RT4 und 5637 wurden nach Standardmethoden kultiviert (Freshney 1986). Als Zellkulturmedium wurde RPMI 1640 mit 10% (v/v) zugesetztem fötalen Rinderserum und 1% (v/v) Glutamin verwendet. Die Zellkulturen wurden in einem Inkubator bei 37°C und einer Atmosphäre aus 5% CO₂ und 100% Luftfeuchtigkeit gehalten. Sie wurden geerntet, sobald sie annähernd konfluent gewachsen waren. Nach dem Waschen der Zellen in PBS und dem Ablösen von der Kulturflasche durch 10 min Inkubation in Trypsin/EDTA-Lösung bei 37°C, wurden sie in einer Dichte von ca. 1 : 5 wiederausgesät. Für die Herstellung von Zell-Lysaten wurden die Zellen durch 10 minütige Trypsinbehandlung vom Boden der Kulturflasche abgelöst, in 10 ml PBS in einem 15 ml Zentrifugenröhrchen gewaschen und 10 min bei 400 x g für 5 min zentrifugiert. Die Zellzahl wurde, nachdem ein 10 µl Aliquot der Zellsuspension mit 90 µl Trypanblau-Lösung gemischt wurde, mit der Zählkammer-Methode bestimmt. Die Zellvitalität ergibt sich aus dem Anteil nicht durch Trypanblau gefärbter Zellen von der Gesamtzellzahl in %.

2.2.4 RNA Isolierung

Die zelluläre Gesamt-RNA wurde nach der Guanidin Thiocyanat-Phenol-Chloroform Extraktionsmethode nach Chomczynski und Sacchi (1987) isoliert.

Zellsedimente (1 Million Zellen) oder in flüssigem Stickstoff pulverisierte Gewebe (ca. 50 mg) wurden in 1 ml Trizol solange auf und abpipettiert, bis sie sich soweit wie möglich aufgelöst hatten. Nach 3 min Inkubation bei Raumtemperatur wurde 0,2 ml Chloroform dazugegeben und durch Invertieren gemischt. Nach Zentrifugation für 20 Minuten bei 10.000 x g und 4°C, wurde die obere, wässrige Phase vorsichtig abpipettiert, ohne die denaturierte Proteine enthaltende weiße Interphase zu stören, und in einem zweiten RNase-freien 1,5 ml Zentrifugenröhrchen mit 0,5 ml Isopropanol gemischt, um die RNA zu präzipitieren. Nach Zentrifugation bei 10.000 x g für 15 Minuten, wurde die Flüssigkeit vorsichtig abpipettiert und das RNA-Präzipitat in 1,5 ml

80%igem Ethanol gewaschen. In dieser Form wurde RNA bei -80°C gelagert. Nach Zentrifugation bei $7.500 \times g$ für 10 min wurde der Überstand vollständig dekantiert und das RNA-Präzipitat 10 min bei Raumtemperatur getrocknet, bis der Alkohol verdampft war. Nun wurde die RNA in 20 oder 40 μl RNase-freiem Wasser zunächst durch Auf- und Abpipettieren, dann durch zehnmütiges Erhitzen auf 55°C gelöst und durch Messung der Absorption bei 260 nm im Photometer quantifiziert. Für die Berechnung der Konzentration wurde die Entsprechung $1 \text{ OD} = 40 \mu\text{g/ml RNA}$ zugrundegelegt. Die Lösung wurde zusätzlich bei 280 nm gemessen, um Verunreinigung durch Proteine zu detektieren. Der Quotient $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$ stellt ein Maß für die Reinheit von Nukleinsäuren dar. Werte zwischen 1,7 und 1,9 wurden als Reinheitsnachweis gewertet. Kleinere Werte weisen auf Anwesenheit von Proteinen hin.

Zur Herstellung von RNase-freiem Wasser wurde destilliertes Wasser über Nacht mit Diethyl Pyrocarbonat behandelt (0,1%ige Lösung) und anschließend zweifach autoklaviert.

2.2.5 Komplementäre DNA Synthese (Reverse Transkription)

Boten-Ribonukleinsäure (mRNA) wurde durch reverse Transkription (RT) in komplementäre DNA (cDNA) überschrieben. In einem 0,5 ml Probenröhrchen wurde 1 μg der Gesamt-RNA in 11 μl RNase-freiem Aqua bidest. zu 1 μl oligo (dT)₁₂₋₁₈ (0,5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) pipettiert und in einem Thermocycler 10 min bei 70°C denaturiert, um Sekundärstrukturen aufzulösen, und dann sofort für 1 min auf Eis gestellt. Danach wurden 7 μl von der eiskalten RT Reaktionslösung (4 μl 5 x Erststrangpuffer, 2 μl DTT [100 mM], 1 μl dNTP [10 mM] jeweils) dazugegeben und gemischt. Nach 5 min bei 45°C im Thermocycler wurde 1 μl der Reversen Transkriptase Lösung (200 Einheiten M-MLV oder Superscript II) dazupipettiert, die Lösungen im Probenröhrchen kurz und gut gemischt und weitere 55 min bei 45°C inkubiert. Das Enzym wurde anschließend 15 min bei 70°C oder 5 min bei 95°C denaturiert.

2.2.6 Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Mit der Polymerase Kettenreaktion (Saiki et al. 1985 und 1988) wird ein Abschnitt einer DNA amplifiziert, der durch zwei Nukleinsäuresequenzen flankiert wird, die komplementär zu den Starter-Oligonukleotidsequenzen (Primer) sind. *Ein* Primer ist zum Sinnstrang, der *Andere*

zum Gegensinnstrang komplementär, und zwar so, daß die gebundenen Primer mit ihren 3'-Enden in Richtung des zu amplifizierenden Abschnittes weisen (Syntheserichtung der DNA-Polymerase). Die Primer sind so ausgewählt, daß sie keine komplementären Abschnitte zur eigenen Sequenz und der des anderen Primers aufweisen, einen GC-Gehalt zwischen 40 und 60% haben, und genspezifisch binden, d.h. bei einer Datenbankdurchsuchung keine Komplementaritäten zu anderen DNA-Sequenzen zeigen. Die thermostabile DNA-Polymerase aus dem thermophilen Bakterium *Thermus aquaticus* (*Taq* Polymerase) zeigt ihr Aktivitätsoptimum bei etwa 72°C und widersteht höheren Temperaturen, die zur Denaturierung (Schmelzen der Wasserstoffbrückenbindungen, Überführen der doppelsträngigen DNA in die Einzelstränge) der DNA benötigt werden (94°C). Bei einer Temperatur, die geeignet ist, die Primerbindung zu erlauben (etwa 60°C für einen 20-mer Primer) beginnt ein PCR-Zyklus nach Denaturierung der DNA. Die Primer binden an ihre komplementären Sequenzen. Durch Erhöhung der Temperatur auf 72°C beginnt die Synthese jeweils eines neuen komplementären Stranges in die Sinnstrang- und in die Gegensinnstrangrichtung. Danach wird bei 94°C erneut denaturiert und ein neuer Zyklus beginnt. Theoretisch wird bei jeder Runde der amplifizierte Abschnitt verdoppelt, was zu einem exponentiellen Anstieg der Menge der amplifizierten DNA führen würde. In der Praxis gibt es aber einige limitierende Faktoren, die die Effizienz und Ausbeute verringern. Besonders das Aufbrauchen der Desoxyribo-Nukleotide und der Abbau besonders des Adeninnukleotids bei der hohen Denaturierungstemperatur, aber auch die abnehmende Verfügbarkeit und Aktivität des Enzyms führen zu einer abgeschwächten Kurve, die nach einer gewissen Zyklenzahl in ein Plateau übergeht (Sättigungsbereich) (Mullis und Falloona 1987). Die Primersequenzen wurden den bekannten Nukleinsäuresequenzen entnommen. Diese wurden auf der Internet-Seite der *National Library of Medicine* von der *GenBank* (www.nlm.ncbi.nih.gov) auf den eigenen Computer kopiert. Auf derselben Internet-Seite liegt das *BLAST*-Programm, mit dessen Hilfe die für die Oligonukleotidsynthese ausgewählten Sequenzen mit denen der Datenbanken verglichen wurden.

2.2.6.1 Differential Display RT-PCR

Bei der Differential Display RT-PCR werden unbekannte Abschnitte von cDNAs mit Hilfe eines Primer-Oligonukleotids willkürlicher Sequenz (arbitrary primer) von 10 Basenpaaren Länge und eines dT₁₂VN Primer amplifiziert (Liang und Pardee 1992). Die Primer sind danach ausgesucht, daß sie einen GC-Gehalt von 50% haben und keine ununterbrochenen

selbstkomplementären Abschnitte von länger als 2 Nukleotide aufweisen (Bauer et al. 1993). Der dT₁₂VN Primer besteht von 5' nach 3' gelesen aus 12 Desoxy-Thymin-Nukleotiden, einer "Wobble-Base" (bei der Oligonukleotidsynthese wird an die gleiche Stelle in den Molekülen zufällig eine der Nukleinsäurebasen, die im Gemisch vorliegen, angehängt. V: A, G, C; N: A, T, G, C), und einer der vier Basen an seinem 3'-Ende. Die Anheftung (annealing) der Primer an komplementäre Sequenzen von cDNAs erfolgte 2 min lang bei 40°C. Die Verlängerung (Extension) der PCR-Produkte durch die hitzestabile DNA Polymerase aus *Thermus aquaticus*, einem thermophilen Archaeobakterium, wurde bei 72°C (30 sec) durchgeführt und die entstandenen doppelsträngigen DNA Moleküle bei 94°C (30 sec) für den nächsten Zyklus (insgesamt 40) in die Einzelstränge zerlegt (Denaturierung). Die PCR Produkte wurden auf einem 6%igen Polyacrylamidgel nach Molekülgrößen (Basenpaare) aufgetrennt und in 50 ml SYBR[®] Green I Lösung (1 : 10.000 Verdünnung in A.dest) für 20 min gefärbt. Auf einem UV-Illuminator wurde SYBR[®] Green I zur Fluoreszenz angeregt und die leuchtenden Banden mit einer Video (CCD) Kamera abgebildet und mittels Computerschnittstelle und Framegrabber-Karte (GelDoc System, BioRad) in einen Computer eingelesen. Mit dem Programm *Molecular Analyst* (BioRad) wurden die Abbildungen gespeichert, bearbeitet und ausgewertet. Zur Dokumentation wurde ein Ausdruck auf einem Thermodrucker oder nach Export als TIFF Datei in Adobe Photoshop (Bildverarbeitungsprogramm von Adobe Systems Incorporated, San Jose, CA, USA) auf einem Apple Power Macintosh PC (Cupertino CA, USA) eingelesen und in PowerPoint (Präsentationsprogramm von Microsoft Corporation, USA) beschriftet. Die Abbildungen wurden auf einem Laser-Drucker ausgedruckt, oder mittels eines Dia-Belichters auf einen fotografischen Film belichtet.

Die herkömmliche ddRT-PCR Technik zielt darauf ab, alle mRNAs darzustellen, indem eine geeignete Anzahl 10mer Oligonukleotide willkürlicher Sequenzen verwendet wird, die zusammen theoretisch in der Lage sind, mindestens einmal in jeder mRNA zu binden und in der ddRT-PCR gemeinsam mit dem oligo dT-Primer ein amplifizierbares Fragment zu bilden.

2.2.6.2 Homologiedomänen-Konsenssequenz (HoDoKo) RT-PCR

Um die Trefferrate für Gene, die bei der Krebsentstehung eine Rolle spielen könnten, zu erhöhen, habe ich nach Konsenssequenzen in Proteinfamilien gesucht, die eine wichtige Rolle bei der malignen Transformation spielen können. Dazu gehören Wachstumsfaktoren und ihre Rezeptoren, Signaltransduktionsmoleküle, Transkriptionsfaktoren und andere Kernproteine,

Adhäsionsmoleküle und weitere Proteine, die teilweise auch als Onkogene bekannt sind.

Sehr viele Proteine, wie z.B. Rezeptoren für Wachstumsfaktoren und Zytokine, Signaltransduktionsmoleküle (Protein-Kinasen und -Phosphatasen; Adaptermoleküle), enthalten sog. Src-Homologieregionen, benannt nach dem Onkogen, bei dem sie zuerst beschrieben worden sind. Es sind SH-2 und SH-3 Regionen bekannt, die bei der Interaktion von Proteinen (Andockung) der Signaltransduktionswege von Bedeutung sind. SH2 bindet an kurze, ein phosphoryliertes Tyrosin enthaltende Konsenssequenzen, SH3 an einen prolinreichen Abschnitt des Zielproteins.

Die Src Homologiedomänen SH2 (ESET) und SH3 (SNYV und LYDY) und EE(E/I)Y als Erkennungs- und Andockstelle für die SH2-Domäne.

IUB code for mixed base sites: N=G,A,T,C; V=G,A,C; B=G,T,C; H=A,T,C; D=G,A,T;
K=G,T; S=G,C; W=A,T;
M=A,C; Y=C,T; R=A,G.

Anstelle der 10mer Primer wurden 18 bis 20mer Oligonukleotide eingesetzt, die aus einer 3'-8mer-Bindungssequenz und einer 5'-Sequenz für die AatII und NcoI Restriktionsschnittstelle (gacgtccatgg-8mer) bestehen. Die Sequenz des 8mer entsprach entweder der des Zufallsprimer (arbitrary Primer) AP1 und wurde AP1+ genannt, oder der abgeleiteten degenerativen Sequenz von ausgesuchten Konsenssequenzen: für das Phospho-Tyrosin SH2-Bindungsmotiv EEY (Glu-Glu-Tyr) gargarta, für die Src Homologiedomänen SH2 ESET gan agy gar a, sowie SH3 SNYV agy aay tay gt und LYDY ctn twy gay tt. Damit das 3'-Ende, das für die Anheftung an die Zielsequenz besonders kritisch ist, nicht durch die "Wobble-Base" unspezifisch wird, wurde die 3'-terminale "Wobble-Base" weggelassen. Als 5'-Gegensinnprimer wurde ein 20mer, bestehend aus 12 Thyminnukleotiden am 3'-Ende und einer 5'-Sequenz mit der NotI-Restriktionsschnittstelle, verwendet. Der PCR Ansatz glich dem für 10mer Primer bei der ddRT-PCR, die PCR-Bedingungen bestanden aus 2 min Denaturierung bei 94°C, 4 min Anheftung mit niedriger Stringenz bei 50°C bis 40°C, wobei die Temperatur mit 0,2°C/sec erniedrigt wurde, gefolgt von 45 Zyklen bestehend aus 2 min bei 72°C, 30 sec bei 94°C und 30 sec bei 58°C. Danach schlossen sich 2 min bei 72°C, zur vollständigen Synthese der gesamten Fragmentlänge, und 4°C Dauerkühlung an.

2.2.6.3 Agarose-Gel Elektrophorese

In 0,5-fach konzentriertem TBE-Puffer wurden 1,5 oder 2% (w/v) Agarose (Elektrophoresegrad) in einem Mikrowellenofen durch Erhitzen vollständig gelöst und auf ca. 60°C abgekühlt in die zusammengesetzte Gelkammer gegossen. Die Lösung hatte etwa 1 Stunde Zeit zu gelieren. Nachdem die Kämme entfernt und das Gel mit 0,5-fach konz. TBE überschichtet war, wurden die Proben aufgetragen (6 µl pro Tasche). Die elektrophoretische Trennung wurde bei 6 V/cm Feldstärke für 30 bis 55 min durchgeführt. Das Gel wurde in Ethidiumbromid-Lösung [0,5 µg/ml] für 10 min gefärbt und anschließend auf dem UV-Transilluminator betrachtet und dokumentiert.

2.2.6.4 Polyacrylamid-Gel Elektrophorese

Für zwei vertikale Minigele wurden 10 ml Gel-Lösung gebraucht. Zu 5,2 ml H₂O wurde 1 ml 10-fach konz. TBE-Puffer, 2,6 ml Acrylamid (30%), 1,2 ml Bisacrylamid (2%), 50 µl APS (10%ige w/v wässrige Lösung, alle 2 Wochen frisch angesetzt und bei 4°C aufbewahrt), und 5 µl TEMED gegeben, gut gemischt und zwischen die Glasplatten der vorher zusammengesetzten Gelkammern gegossen. Anschließend wurden die Kämme eingefügt und das Acrylamid für mindestens 45 min polymerisiert. Die Kämme wurden entfernt, die Probenkammern kurz mit dest. Wasser ausgespült, und das Gel mit der Halterung in die Pufferkammer gestellt. Die Elektrophoresepufferreservoirs wurden mit 1 x TBE aufgefüllt, Luftblasen unter dem Gel entfernt und die Proben aufgetragen. Die elektrophoretische Trennung lief 1,5 Stunden bei 5 V/cm Feldstärke. Anschließend wurde das Gel 20 min unter Bewegung in SYBR[®] Green I DNA-Fluoreszenzfarbstoff (1:10.000 Verd. in Wasser) gefärbt und auf einem UV-Transilluminator betrachtet bzw. zur Dokumentation mit einer CCD-Kamera mittels des *Molecular Analyst* Programms (Bio-Rad) in einen Computer eingelesen. Als TIFF-Datei wurden die Gelabbildungen in Adobe Photoshop invertiert und für den Laser-Ausdruck in Helligkeit und Kontrast eingestellt. Dies wurde aus Gründen des Druckes vorgenommen, weil die Farbsättigung des schwarzen Hintergrundes bei fluoreszenzgefärbten Gelen ungleichmäßig (Streifen und Flecken) verteilt und der Toner zu rasch verbraucht war. Außerdem ist so die Beschriftung auf den Abbildungen besser möglich. Es geht dabei keine Information verloren.

2.2.6.5 Reamplifikation differentiell exprimierter Banden

Differentiell exprimierte Banden wurden mit einem Skalpell auf dem UV-Illuminator aus dem Polyacrylamidgel geschnitten und in 50 µl A. dest. in 0,5 ml Probenröhrchen im Thermocycler 10 min lang bei 70°C erhitzt. Davon wurden 4 µl in 0,2 ml PCR Probenröhrchen in 40 µl PCR Reaktionsansätzen unter den gleichen Bedingungen wie bei der ddRT-PCR reamplifiziert. Die Reamplifikationsprodukte wurden in 2%igen Agarosegelen in 0,5 x TBE Puffer 50 min bei 5 V/cm Feldstärke elektrophoretisch als Banden bestimmter molekularer Größen dargestellt (Ethidiumbromid- Färbung).

2.2.6.6 Klonierung der PCR-Fragmente

Taq DNA Polymerase hängt häufig ein einzelnes Desoxyadenosin an die 3'-Enden der amplifizierten Fragmente. Durch die Addition eines 3'-terminalen Thymidin an beide Vektorenden, wird somit die Ligation von PCR-Produkten mit dem Vektor, im Vergleich zur Ligation stumpfer Enden, wesentlich erleichtert.

Ligation: In einem 0,5 ml Zentrifugenröhrchen wurden 1 µl T4 DNA Ligase Puffer, 1 µl pGEM-T Vektor, ein molarer Überschuß des zu klonierenden PCR-Produktes, 1 µl T4 DNA Ligase (3 Weiss Einheiten) mit deionisiertem Wasser auf ein Endvolumen von 10 µl gebracht und gemischt. Die Reaktion wurde über Nacht bei 4°C inkubiert.

Transformation kompetenter Escherichia coli (Stamm JM109):

Die kompetenten Bakterien wurden im Eisbad aufgetaut und vorsichtig suspendiert. 50 µl von dieser Zellsuspension wurden vorsichtig in 1,5 ml Zentrifugenröhrchen zu jeweils 2 µl Ligrationsreaktionslösung pipettiert. Nachdem vorsichtig gemischt wurde, blieben die Röhrchen weitere 20 min auf Eis. Danach wurden die Zellen für 50 s einem Hitzeschock bei genau 42°C in einem Wasserbad ausgesetzt und wieder für 2 min auf Eis gelassen.

Dann wurden 950 µl SOC Medium, das Raumtemperatur hatte, zu den transformierten Bakterien gegeben und 1,5 h bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Jeweils 100 µl dieser Kulturen wurden auf LB Agarplatten, die Ampicillin, IPTG und X-Gal enthielten, ausplattiert und über Nacht (16-24 h) bei 37°C inkubiert (1,5% Agar in LB Medium gelöst, bei 50°C Ampicillin (100 µg/ml), IPTG (0,5 mM) und X-Gal (80 µg/ml) dazugegeben, gemischt und in 85 mm Petrischalen gegossen. Weiße Kolonien beherbergen inserierte DNA, blaue Klone

enthalten das intakte b-Galaktosidase-Gen, das nicht durch ein inseriertes PCR-Fragment unterbrochen, und damit funktionsunfähig gemacht wurde (Sambrook et al. 1989).

Weißer Kolonien wurden gepickt und in ampicillinhaltigem LB Medium bei 37°C unter Schütteln vermehrt. Plasmid wurde unter Verwendung des QIA Miniprep Kits isoliert.

2.2.6.7 Direktsequenzierung von reamplifizierten differentiellen Fragmenten

Zyklische Sequenzierung mit AmpliTaq[®] DNA Polymerase FS. Dieses Enzym ist eine Variante von *Thermus aquaticus* DNA Polymerase mit einer Punktmutation im aktiven Zentrum. Diese führt zu einer geringeren Diskriminierung von Dideoxynukleotiden, und damit zu einer gleichmäßigeren Intensitätsverteilung. Eine zweite Punktmutation in der aminoterminalen Domäne eliminiert die 5' nach 3'-Nuklease Aktivität der Taq DNA Polymerase. Die Sequenzierungen wurden mit einer fertigen Mischung von fluoreszenzmarkierten Dideoxynukleotiden, dNTPs (dATP, dCTP, dTTP, dUTP), AmpliTaq DNA Polymerase FS, thermostabile Pyrophosphatase, Magnesiumchlorid und Puffer ("Terminator Ready Reaction Mix"; PE Applied Biosystems, Perkin Elmer) angesetzt. Jede Base ist an einen distinkten Fluoreszenzfarbstoff unterschiedlichen Emissionsmaximum gekoppelt, der aus einem Fluoreszenzindonorfarbstoff besteht, vom Argonlaser im Sequenziergerät angeregt wird, und seine Energie auf einen Rhodaminakzeptorfarbstoff überträgt, der dann Licht einer bestimmten Wellenlänge emittiert, das vom Sequenzierer gemessen wird, wenn das terminierte DNA-Fragment in der Kapillare elektrophoretisch durch den Laserstrahl wandert. Mit einem Analyseprogramm wurde das Elektropherogramm und die Nukleotidsequenz erstellt. Das Programm arbeitet nicht hundertprozentig genau, es ist daher erforderlich, die vom Programm erstellte Sequenz mit dem Elektropherogramm zu vergleichen und gegebenenfalls zu korrigieren.

Durchführung:

Reinigung des PCR-Amplifikationsproduktes, Abtrennung von dNTPs und Primer:

QIAquick[™] PCR Purification Kit (QIAGEN). Alle Zentrifugationen wurden bei 12.000 x g durchgeführt. Die 5fache Menge des chaotrope Ionen enthaltenden Puffers PB wird zur PCR-Reaktionslösung gegeben, gemischt und auf das in einem 2 ml Sammelröhrchen steckende Zentrifugensäulchen, das eine Silikagelmembran als Adsorber enthält, aufgetragen und für 1

Minute zentrifugiert. Der Durchfluß wurde verworfen und die DNA im Säulchen mit 0,75 ml ethanolversetztem Puffer PE gewaschen und zentrifugiert. Nach Dekantieren des Durchflusses, wurde bei maximaler Geschwindigkeit ($15.600 \times g$) zentrifugiert. Das Säulchen wurde anschließend in ein 1,5 ml Mikrozentrifugenröhrchen gesetzt, und die DNA mit 30 μ l H₂O eluiert, indem die Elutionsflüssigkeit in Säulchenmitte aufgetragen, 1 Minute einwirken gelassen, und abzentrifugiert wurde. Das Eluat wurde direkt für die Sequenzierung weiterverwendet.

Sequenzieransatz:

30 bis 180 ng der PCR-Produkt DNA wurden mit 4 μ l der Sequenziermischung ("Terminator Ready Reaction Mix") und 10 pmol Primer auf ein Volumen von 20 μ l gebracht, gut gemischt und kurz zentrifugiert.

Die PCR-Bedingungen für die zyklische Sequenzierung:

Es wurden 35 Zyklen durchgeführt, bestehend aus 30 sec bei 96°C, 5 sec bei 38°C, einem langsamen Anstieg der Temperatur auf 60°C mit einer Steigung von 0,2°C/min und dem Halten bei 60°C für 2 min. Nach der letzten Runde wurde auf 4°C gekühlt.

Reinigung und Denaturierung der Sequenzierprodukte:

Es wurden Centri-SepTM Mikrozentrifugensäulchen P/N CS-901 verwendet. Die Säulchen wurden für mindestens 2 Stunden mit 0,8 ml destilliertem Wasser rehydriert. Danach wurden Luftblasen durch Ansnippen der Säulchen entfernt. Dem Gel wurde erlaubt sich wieder zu setzen. Nach Entfernen zuerst des oberen, dann des unteren Deckels, wurden die Säulchen so in einen Ständer gestellt, daß durch Wirkung der Schwerkraft das Wasser auslaufen konnte. Die Säulchen wurden in mitgelieferte Waschröhrchen gesteckt und bei $730 \times g$ für 2 Minuten zentrifugiert, um interstitielle Flüssigkeit zu entfernen. Die Sequenzierproben wurden vorsichtig auf die Mitte der Geloberfläche pipettiert, das Säulchen in 1,5 ml Mikrozentrifugenröhrchen inseriert und bei $730 \times g$ für 2 Minuten zentrifugiert. 4 μ l des Eluats wurden mit 12 μ l

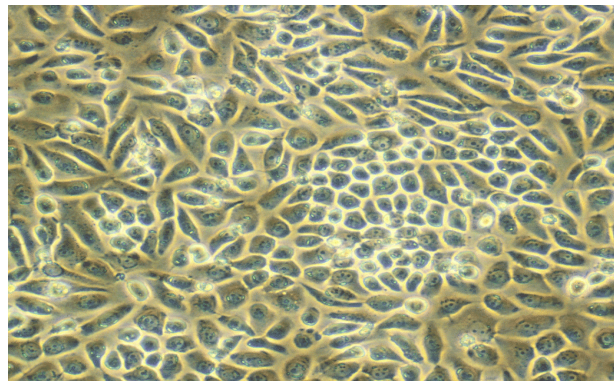
Denaturierlösung (Template Suppression Reagent, TSR), die in dem Sequenzier Kit mitgeliefert wird, gemischt und bei 94°C für 2 Minuten denaturiert.

Alle Proben, außer die Uroplakin-Fragmente, wurden in einem ABI PRISM™ 310 Genetic Analyzer (Abteilung "Molekulare Hämatologie" des Klinikum der Johann Wolfgang Goethe-Universität, Frankfurt), die UPIa, Ib, II und III PCR-Produkte in einem ABI PRISM 373 A DNA Sequencer (Auftragssequenzierung bei SequiServe, Dr. Willi Metzger, Vaterstetten) aufgetrennt und detektiert. Die Uroplakin-Fragmente wurden zuvor in pGEM kloniert und die Plasmide isoliert.

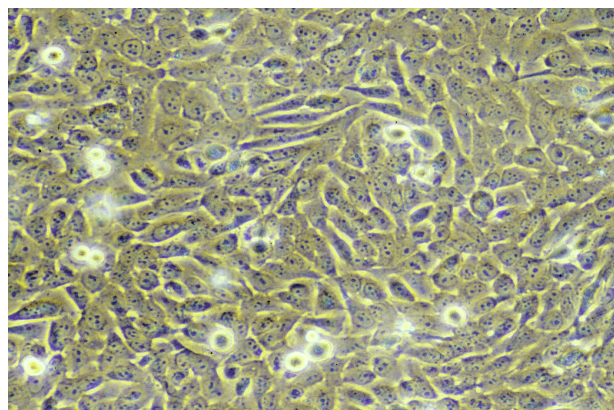
Datenbankvergleich der gefundenen Sequenzen

Das *Genbank BLAST* Programm ist auf der Internetseite des us-amerikanischen *National Center for Biotechnology Information* der *National Library of Medicine* und der *National Institutes of Health* www.ncbi.nlm.nih.gov zu finden. Mit der Nukleinsäure BLAST-Suche wurden die Datenbanken, wie *GenBank* und *EMBL*, nach Sequenzen durchsucht, die insgesamt oder in Abschnitten identisch sind. Mit dem Programm *ORF Finder* (open reading frame finder) wurden in unbekanntem Nukleinsäuresequenzen offene Leseraster identifiziert und in die entsprechende Aminosäuresequenz übersetzt. Diese wurde verwendet, um dann mit dem Protein-*BLAST*-Programm nach gleichen Sequenzabschnitten in den Sequenzen der Proteindatenbanken zu suchen.

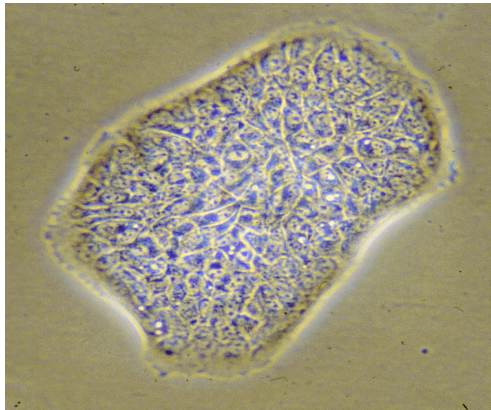
Abbildung 1. Kulturen primärer Urothelzellen und Fibroblasten aus Ureter, sowie der Urothelkarzinomzelllinien *RT4* und *5637*. Die Mikrophotografien wurden im Phasenkontrastverfahren mit einem inversen Mikroskop und einer Spiegelreflexkamera der Firma Olympus aufgenommen (100fache und 200fache effektive Vergrößerung auf der fotografischen Abbildung).



a) Urothelzellkultur (100fach)



b) 5637 Urothelkarzinomzelllinie eines mäßig-differenzierten Primärtumors (G2) (200fach)



c) RT4 Urothelkarzinomzelllinie eines gut-differenzierten Tumors (G1)
(100fach)

3. Ergebnisse

Uroplakin RT-PCR

3.1 *Uroplakin* RT-PCR von humaner Urothel-mRNA unter Verwendung der bovinen Sequenzen für die uroplakin-spezifischen Primer-Oligo-Nukleotide

Die Amplifikation der *Uroplakin* (UP) Ia und Ib Fragmente aus humaner komplementärer DNA mit den bovinen Primern funktionierte hoch spezifisch (Abbildung 1). Sie erzeugten jeweils nur *ein* Fragment, das der vorhergesagten Länge entspricht (UPIa: 630 bp; UPIb: 541 bp). Die *Uroplakin* II RT-PCR ergab zwei Fragmente: das Eine von ca. 250 bp, und das Andere von ca. 780 Basenpaaren Länge, 440 bp größer als erwartet (340 bp). Es handelt sich bei dem größeren Fragment nicht um ein Amplifikationsprodukt von der genomischen UPII-Sequenz, denn die Überprüfung durch eine PCR, in die zur Kontrolle RNA eingesetzt wurde, zeigte auch nach 60 Zyklen noch keine Bande. Die UPIII-Primer amplifizierten mehrere Fragmente unterschiedlicher Längen, wobei die mittlere und stärkste Bande auf dem Gel der zu erwartenden Länge von 741 bp entspricht. Die Sequenzierung der gereinigten Reamplifikate der Gelbanden, bestätigte ihre jeweilige *Uroplakin*-Identität. Die Homologie mit den Rindersequenzen war wie erwartet hoch: Für UPIa zeigte sich eine 88 %ige Übereinstimmung der Nukleinsäuresequenz, für UPIb 90 %, UPII 85 % und UPIII 70 %. Vor kurzem wurden die humanen *Uroplakin*-Sequenzen in den Datenbanken veröffentlicht. Der Sequenzvergleich in der *GenBank* mit dem *BLAST*-Programm zeigte folgende Übereinstimmungen der selbstermittelten Sequenzen mit den entsprechenden Abschnitten der humanen *Uroplakin* cDNAs: UPIa 98%, UPIb 99%, UPII 100% und UPIII 82%. Die Differenz zur erwarteten 100% Übereinstimmung liegt an den, besonders bei der UPIII Sequenzierung nicht eindeutig identifizierbaren Basenpositionen (n). Da es bei den Sequenzierungen lediglich um die Überprüfung der jeweiligen *Uroplakin*-Identität ging, war auf weitere Sequenzierungen verzichtet worden.

Abbildung (2) zeigt die UPIb-RT-PCR von drei unterschiedlichen Urothelpräparationen, daneben jeweils die nicht revers-transkribierte RNA zur Kontrolle der Reinheit der RNA-Isolation. Es ist keine Bande sichtbar, die auf das Vorhandensein genomischer DNA hinweisen würde. Die genomische Fragmentgröße ließ sich nur für UPII (ca. 2.500 bp, durch *Uroplakin*-PCR mit genomischer DNA) ermitteln, ein Hinweis darauf, daß alle eingesetzten Primerpaare ein bis mehrere Introns überspannen und somit eine eindeutige Zuordnung der amplifizierten *Uroplakin*-Fragmente zum Transkriptionsprodukt erlauben. Dies ist eine notwendige Voraussetzung bei der Detektion *einer* Urothelkarzinomzelle inmitten Millionen weißer

Blutzellen, deren DNA, die in Spuren die RNA-Lösungen verunreinigen könnte, mit DNase abgebaut werden müßte. Dieser Schritt konnte daher unterbleiben.

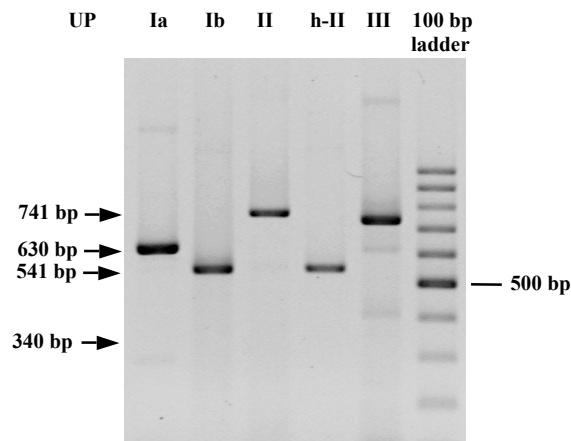


Abbildung 1. Uroplakin RT-PCR von humaner urothelialer RNA mit den, von den Rinder-Uroplakinsequenzen abgeleiteten Primern. Die gemäß den bovinen Sequenzen zu erwartenden Fragmentgrößen (Pfeile) sind: Uroplakin Ia 630 bp, Ib 541 bp, II 340 bp und III 741 bp. Diese stimmen auch bei allen Banden, ausgenommen der des UPII, mit der realen Fragmentgröße überein. Bei der Sequenzierung wurde auch die Identität der größeren UPII Bande bestätigt. h-UPII ist bereits mit dem humanen UPII Primerpaar amplifiziert worden. Das ethidiumbromidgefärbte 1,5%ige Agarosegel ist invers dargestellt. Der Molekulargewichtsmarker, eine 100 Basenpaarleiter, zeigt verstärkt die 500 bp Bande.

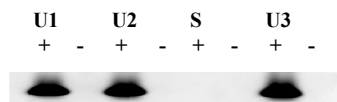


Abbildung 2. Kontroll PCR: Es wurden die cDNAs (+) und die RNAs (-) von drei verschiedenen Urothelproben (U) und einer nichturothelialen Zelllinie (S: SV80) als negative Kontrolle mit den UPIb-Primern mit 60 Zyklen amplifiziert. Das gleiche Ergebnis wurde auch mit den übrigen Uroplakinprimern erhalten (hier nicht gezeigt). Die UPIb-RT-PCR wurde gewählt, weil sie sich als die empfindlichste UP-RT-PCR erwies. In die (-) Ansätze wurde zehnmal mehr RNA eingesetzt, als in dem entsprechenden Volumen cDNA-Lösung (+) enthalten war, das in die PCR Reaktion eingebracht wurde.

3.2 Die Nukleinsäuresequenzen für die humanen Uroplakin Ia, Ib, II und III PCR-Fragmente

In der Zwischenzeit sind auch die humanen *Uroplakin* Nukleinsäuresequenzen bekannt, sodaß sie für einen Sequenzvergleich in den Datenbanken vorliegen. Daher werden hier die Übereinstimmungen der selbstermittelten Sequenzen mit denen der bovinen *und* humanen *Uroplakine* in den Datenbanken aufgeführt. Die Sequenzen werden nach gängiger Konvention von 5' nach 3' gelesen. Damit der Informationsgehalt der BLAST-Suchergebnisse nicht verloren geht, werden diese im Folgenden, unter den eigenen Sequenzen stehend, wiedergegeben. Der Erwartungswert (expect) gibt die Wahrscheinlichkeit an, mit der die gefundene Übereinstimmung rein zufällig vorkommt.

Uroplakin Ia:

```
ccnactggt gnnagtntca tagnaagatg acgtcttcnc ttgtnatkg attgcatct tctgcggytt ctctcttc atggtarcca gttttggtg  
gggtgccgca ctctgccgcc gccggtccat ggtcctcac tacttggtgc tcatgctcat cgtctacatc ttcagtgcg cctcctgcat  
cactcctac accaccgtg actacatggt gtccaacca tcctgatca ccaagcagat gctgacctc tacagcgcg acaccacca  
gggccaggag ctgaccgcc tctgggaccg cgtcatgatt gagcaagaat gctgtggcac atctggtecc atggactggg tgaactcac  
gtcagcttc cggcgccca ctccggaggt ggtgttccc tggcccccac tgtgtgtcg ccggacggga aactcatcc ccctcaacga  
ggaggctgc cgcctggggc acatggacta cctgttacc aagggtgct tgaacacat cggccacgcc atgacagct acactgggg  
tatctctggt ttgggttg ccatcctgat gtggacgctc cc
```

gb|AF085807|AF085807 **Homo sapiens uroplakin Ia mRNA**, partial cds
Length = 1218 Score = 1092 bits (549), Expect = 0.0
Identities = 562/569 (98%)

emb|Z29475|BTUROPL1 **B.taurus mRNA for uroplakin Ia**
Length = 1363 Score = 662 bits (333), Expect = 0.0
Identities = 508/569 (89%)

Uroplakin Ib:

```
ctccgtgagg gcatcatgta agtccgcnta nngcgtnta aattctcgt ancgctntg aagtntcgt ctgnntanca caactncanc  
acancgagac ttttcacac ccaacctt cctgaagcag atgctagaga ggtacaaaa caacagcct ccaacaatg atgaccagtg  
gaaaaaat ggagtcacca aaacctgga caggctcatg ctccaggaca attgctgtg cgtaaatgt ccatcagact ggcaaaaata  
cacatctgcc ttccgactg agaataatga tctgactat cctggcctc gtcaatgctg tttatgaac aatctaaag aacctctca  
cctggaggct tgtaactag gcgtgctgg ttttatcac aatcaggct gctatgaact gatctctggt ccaatgaacc gacacgctg  
gggggttcc ttggttgat ttgcattct ctgctggact tttgggttc tctgggtac catgtctac tggga
```

gb|AF042331|AF042331 **Homo sapiens uroplakin 1B (UPK1B) mRNA**, complete cds
Length = 796 Score = 856 bits (432), Expect = 0.0
Identities = 434/435 (99%)

emb|Z29378|BTUROPL2 **B.taurus mRNA for uroplakin Ib**
Length = 1964 Score = 563 bits (284), Expect = e-158
Identities = 397/435 (91%)

Uroplakin II:

atnaagaaa ntncaatac nttantacc tagtgaagaa ggggacagcc actgagtcca gcagagagat ccaatgtcc acactcctc
gaaggaacat ggaatccatt gggctgggta tggcccgcac agggggcatg gtggatca cgggtgctct ctctgtgcc atgttctgc
tgggtctggg ctctcatt gccctggcac tgggtccc caagtaagga ggtctgccc gagcagcagc ttctccagga agcccagggc
accatccage tcccagccc acctgtccc agggcccagg cctgtggctc ctttgggtcc ctgctctct cctctgccc tctctccc
tagagccctc tctctctct gtcctctcc ttgcccag tgcctacct tcaaacctc cattattct ctaccccac tctgtcaga
gtgtacttc ctcccattt accacttaa acaccccac aacaattccc ccatcttca gtgaactaag t

emb|Y13645|HSUROPLAK **Homo sapiens** mRNA for **uroplakin II**

Length = 932 Score = 597 bits (301), Expect = e-169

Identities = 301/301 (100%)

gb|L20633|BOVASYUNIT **Bos taurus** (clone UP2) **uroplakin II** mRNA, complete cds

Length = 1042 Score = 218 bits (110), Expect = 7e-55

Identities = 173/194 (89%)

Uroplakin III:

ntnactggg tngtggacc ttctacnct nngtntnac ntnannatt ntgnaaanan nacacgtntg nggaccacan angcaccnan
naagtctacc tgtatgtct ggtcgactca nccattcca gnaatgcctc aatgenagac agcgggnanna ccccnntggg ctenncttc
ntananacnn anggtgggag gacnggtccc tncaaagng tgccntnga nctnatcccc tgcgtgacc ngncagcct ggatnccatt
gggatgtnt ccanggcctc acagatcctg aatgentacc tggtcagggt ggggtgcaaac nggacctgcc tgtgggatcc caacttcng
ggcnctgta ncgannct gtnggcatcc acagaataca ggtncactn tgtcnggggt cattatgtcc acgggentgg tanaaganca
caccnttg tcaganccca nncgancaa ccagcncct ccanacnaa caatcaaac ctggncangc cggangatcg gacgcgtgat
cgtcatcact tcatctgg gntccctncc ctctncta ctgtgggt gttgccg

gb|AF085808|AF085808 **Homo sapiens uroplakin III** mRNA, complete cds

Length = 1059 Score = 422 bits (213), Expect = e-116

Identities = 412/497 (82%)

gb|L19542|BOVUROPLAK **Bovine uroplakin III** mRNA, complete cds

Length = 1705 Score = 83.8 bits (42), Expect = 3e-14

Identities = 156/199 (78%)

Die geringe Identität zum Human-UPIII von nur 82% ist durch die relativ hohe Zahl unbestimmter Basenpositionen (n) in der eigenen Sequenz zustande gekommen.

3.3 Uroplakin Ib mRNA in primären Harnblasenkarzinomen

Nachdem sich die *Uroplakine* Ia und Ib mit den bovinen Primern aus humanem Urothel gut amplifizieren ließen, wurde eine Reihe von humanen Harnblasenkarzinomen, die durch transurethrale Resektion oder nach Zystektomie aus Harnblasen entnommen worden waren, auf ihre UPIb-Expression hin getestet. Abbildung (3) zeigt das Ergebnis: alle gut bis mäßig differenzierten Urothelkarzinome zeigen die UPIb-Bande, während es bei den wenig differenzierten und anaplastischen Tumoren nur bei etwa der Hälfte zur Darstellung von UPIb kommt.

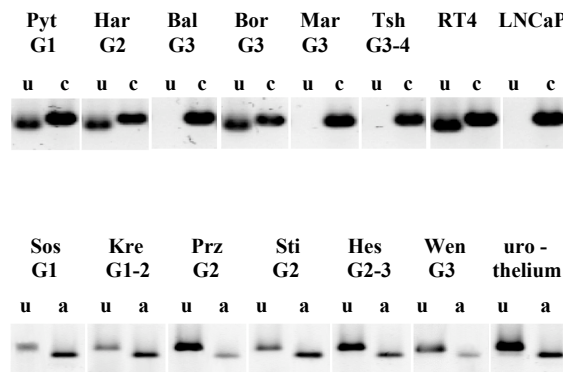


Abbildung 3. *Uroplakin* Ib-RT-PCR (u) von RNA aus zwölf individuellen Urothelkarzinomen verschiedener Malignitätsgrade (G1 – G4). Zur Kontrolle der cDNA und der PCR wurden in der oberen Reihe Primer für *Zytokeratin 18* (c), in der unteren Reihe für α -Aktin (a), beides konstitutiv exprimierte Gene, eingesetzt. Als positive Kontrollen für die UPIb-RT-PCR dienten eine Urothelprobe, sowie die gutdifferenzierte Harnblasenkarzinomzelllinie RT4. Die Prostatakarzinomzelllinie LNCaP war hier die negative Kontrolle.

3.4 Uroplakin RT-PCR von humaner Urothel-mRNA mit den human-Uroplakin-spezifischen Primer-Oligonukleotiden

Die humanen *Uroplakin*-Primer wurden so selektioniert, daß die amplifizierten PCR-Fragmente eine Größenleiter bilden und in einer Multiplex-PCR einsetzbar sind. Die Uroplakin Ia, Ib und II RT-PCRs lieferten gute Ergebnisse (Abbildung 4), allein die UPIII-Primer zeigten nicht immer eine reproduzierbar saubere Bande, sondern hin und wieder, wie auf der Abbildung

zu sehen ist, einige zusätzliche Nebenbanden. Es existieren auch human-UPIII RT-PCR Gele mit nur einer Bande, aber es soll hier gezeigt werden, warum es wenig sinnvoll ist mit diesem Primerpaar zu arbeiten. Daher wurde ein zusätzliches Primerpaar ausgewählt, das einzige, welches mithilfe eines Nukleinsäureprogramms (MacVector) ausgesucht worden ist. Die etwas stärkere Intensität der UPIII_{Mac}-Bande in der Abbildung ist darauf zurückzuführen, daß die PCR in diesem Fall absichtlich mit 5 zusätzlichen Zyklen durchgeführt wurde, da diese 126 bp kleine Bande bei gleicher Zyklenzahl schwächer gefärbt wird, als die größeren Banden der Uroplakine Ia, Ib und II.

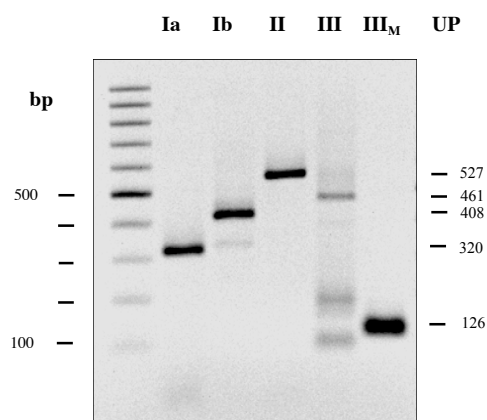


Abbildung 4. *Uroplakin* RT-PCR von urothelialer RNA. Die Primer-Sequenzen wurden den humanen Uroplakinsequenzen aus eigener Sequenzierung entnommen und amplifizieren folgende Fragmentgrößen: UPIa 320 bp, UPIb 408 bp, UPII 527 bp, UPIII 461 bp und UPIII_{Mac} 126 bp. Das 2%ige Agarosegel wurde mit Ethidiumbromid gefärbt und invers dargestellt. Der Molekulargewichtsmarker (linke Spur) ist eine 100 bp Leiter mit einer stärker fluoreszierenden 500 bp Bande.

3.5 Multiplexe Uroplakin RT-PCR von humaner Urothel- und Harnblasenkarzinom-mRNA mit den human-Uroplakin-spezifischen Primer-Oligonukleotiden

Mit einem Primergemisch für die Uroplakine Ia, Ib, II und III wurden die angezeigten Proben (siehe Material und Methoden S.24) einer Multiplex-RT-PCR unterzogen (Abbildung 5). Wie zu sehen ist, lassen sich alle vier Uroplakine simultan amplifizieren. Es kommt aber vereinzelt zu abweichenden Ergebnissen im Vergleich mit den Einzelgen-PCRs, d.h. daß die multiplexe Uroplakin-RT-PCR die Ergebnisse der Einzelgen-PCRs nicht zuverlässig reproduziert. Z.B. finden sich auf Spur 9 des Multiplex-PCR-Gels keine Banden, während die Einzelgen-PCRs UPIa und UPIb-Expression zeigen. Spur 10 zeigt UPIa und UPII-Expression in

der Multiplex-PCR, dagegen UPIa und UPIb bei der Einzel-PCR. Auf einigen Spuren ist bei der Multiplex-PCR keine UPIb-Bande sichtbar, die aber auf dem UPIb-Einzel-PCR-Gel fett zu sehen ist.. Das UPIII-Expressionsmuster stimmt dagegen gut überein, außer auf der Spur 14, wo bei der Einzel-PCR keine Bande zu sehen ist, wohl aber auf dem Multiplex-PCR-Gel.

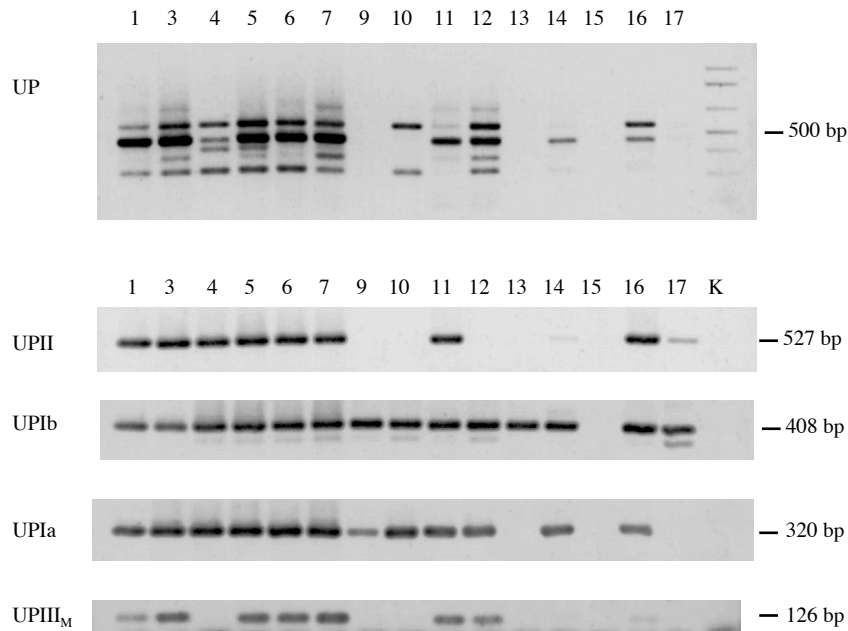


Abbildung 5. *Uroplakin* Multiplex-RT-PCR einer Reihe von Gewebeproben (siehe Material und Methoden S. 24) und darunter die entsprechenden Einzel-*Uroplakin*-RT-PCR-Gele. Die Fragmentgrößen: UPIa 320 bp, UPIb 408 bp, UPII 527 bp, UPIII 461 bp und UPIII_{Mac} 126 bp. In die UPIII-RT-PCR wurde *das* Primerpaar eingesetzt, welches die 126 bp große Bande amplifiziert, während im Multiplex-Ansatz *die* Primer verwendet wurden, die das 461 bp UPIII-Fragment erzeugen. Die Proben stammen von folgenden Geweben: 1) Ureter-Bindegewebe; 3) bis 5) G1-Urothelkarzinome; 7) bis 11) G2-Tumoren; 13), 15) und 16) G3-Tumoren und 17) ein G4-Karzinom. 6) und 14) sind makroskopisch normale Urothelien der Patienten 5) und 13) jeweils. Die 2%igen Agarosegele wurden mit Ethidiumbromid gefärbt und invers dargestellt. Der Molekulargewichtsmarker (rechte Spur des Multiplex-Ansatzes) ist eine 100 bp Leiter mit einer stärker fluoreszierenden 500 bp Bande.

3.6 Uroplakin Ib RT-PCR von Zellverdünnungsreihen in peripheren Blut

Die Amplifikation des Uroplakin Ib-Fragmentes mit 45 PCR Zyklen aus mRNAs einer Verdünnungsreihe zeigt die Nachweisempfindlichkeit der Methode. 1.000, 100, 10 und 1 urotheliale Zellen wurden in jeweils einem Milliliter peripheren venösen Blutes eines normalen Probanden suspendiert, eine native Blutprobe diente als negative Kontrolle. 1 und 10 Zellen wurden unter mikroskopischer Kontrolle in jeweils 1 ml Blut pipettiert. Die Abbildung (6a) zeigt als Beispiel eine Verdünnungsreihe der gut differenzierten (G1) Harnblasenkarzinomzelllinie *RT4*. Ähnliche Ergebnisse wurden auch mit Urothelzellen aus Primärkulturen und mit der mäßig differenzierten (G2) Urothelkarzinomzelllinie 5637 erzielt.

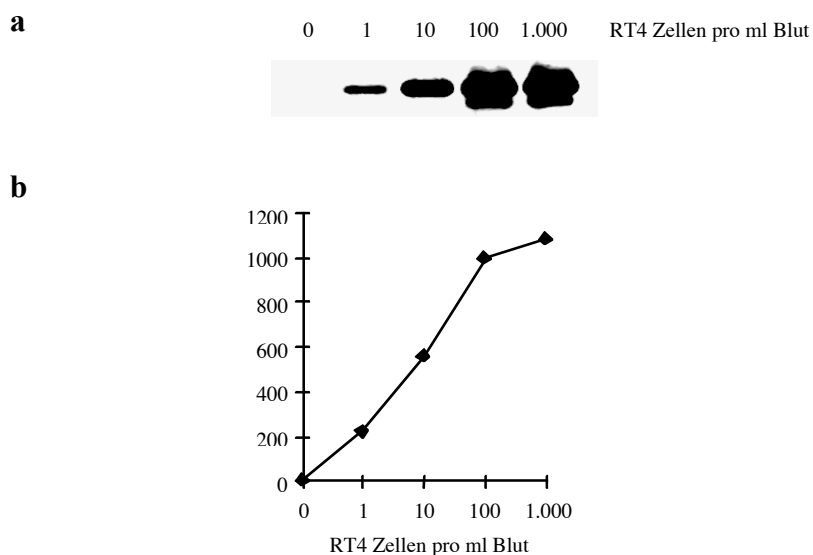


Abbildung 6. Uroplakin Ib RT-PCR von Gesamt-RNA aus jeweils 1 ml peripheren venösen Blutes eines normalen Probanden mit 1.000, 100, 10 und 1 zugesetzten *RT4* Harnblasenkarzinomzellen. Die negative Kontrolle bestand aus der nativen Blutprobe (0). In (a) ist das ethidiumbromidgefärbte Agarosegel abgebildet. Darunter (b) wird die graphische Darstellung der relativen Fluoreszenzintensitäten der DNA-Banden (adjusted volume count) gezeigt.

Das ethidiumbromidgefärbte Agarosegel liegt aus Gründen der Erkennbarkeit im Druckbild in einer invertierten und kontrastreichen Abbildung vor. Darunter erscheint die graphische

Darstellung (6b) der Bandenintensitäten, die einen beinahe linearen Anstieg in Abhängigkeit von der Zellzahl zeigt. Die Fluoreszenzintensitäten wurden, nach Aufnahme des Gels mit einer CCD-Kamera und Einlesen in den Computer, mit dem *Molecular Analyst* Programm als Summe von Pixelintensitäten über eine willkürlich bestimmte Einheitsfläche ausgemessen („adjusted volume count“ x mm² nach Substraktion des Hintergrundes).

Differential Display Reverse Transkription Polymerase Kettenreaktion (ddRT-PCR)

3.7 *Differential Display Reverse Transkription Polymerase Kettenreaktion (ddRT-PCR) einer Reihe von Urothelkarzinomen verschiedener Malignitätsgrade (G1 bis G4) und von zwei normalen Urothelien zum Vergleich – Nukleinsäuresequenzen der differentiellen PCR-Produkte*

Nachdem die ddRT-PCR durch Einstellung von dNTP-Konzentration und Primeranheftungstemperatur so optimiert war, daß nur noch selten redundante Banden auftraten, wurden zunächst 10 Primer willkürlich ausgewählter Zufallssequenzen: AP1 bis 10 (10-mer Nukleotide, arbitrary primer) sukzessive in Kombination mit einem der vier 3'-Ankerprimer (dT₁₂VG) eingesetzt. Da es nicht zweckmäßig ist, hier alle Polyacrylamidgele zu zeigen, sollen stattdessen einige Beispiele zur Anschauung kommen, von denen einige der sequenzierten Proben stammen. Die Dokumentation dieser fluoreszenzgefärbten Gele ist nur eingeschränkt möglich, weil der Dynamikbereich der Fluoreszenzintensitäten für die CCD-Kamera sehr groß ist. Sollen die schwachen Banden auf der Abbildung zu sehen sein, so muß lange belichtet werden, was dazu führt, daß starke Banden weite Bereiche des Gels und damit schwächere Banden überstrahlen. Entsprechendes gilt auch für die Entwicklungsdauer bei der Silberfärbung.

Durch Direktsequenzierung, die ohne Klonierung auskommt, konnten annähernd die Hälfte aller differentiell erschienenen, ausgeschnittenen und reamplifizierten ddRT-PCR-Fragmente in ihrer Sequenz bestimmt werden. Bei den restlichen Proben kam es zu mehr oder weniger starken Überlagerungen von zwei oder mehreren Sequenzen.

Abbildung (7) zeigt ein *Differential Display*-Gel (*dd*-Gel) mit den Primern AP1 und 2. Es steht exemplarisch für solche *dd*-Gele, die nur wenige starke Banden zeigen, wo also offensichtlich eine selektivere Primerbindung stattgefunden hat.

3.8 Differential Display RT-PCR mit den AP1 und 2 Primern

Die Differential Display RT-PCR mit den Primern AP1 und AP2 zeigt auf dem Gel (Abbildung 7a) nur wenige, dafür aber starke Banden. Die nummerierten Banden wurden ausgeschnitten und unter gleichen PCR-Bedingungen reamplifiziert (Abbildung 7b). Die Bande 1/2 erwies sich als Abschnitt aus der mRNA der schweren Kette von *Ferritin*, 2/1 als mitochondriale 12 S rRNA.

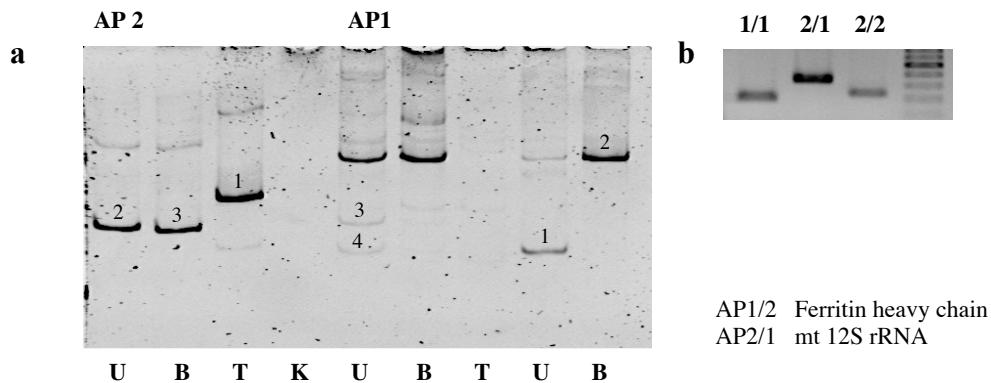


Abbildung 7. *Differential Display* RT-PCR mit den AP1 und 2 Primern in Kombination mit dT₁₂VG (a). Es werden normales Urothel (U), autologes submuköses Bindegewebe (B) und das Harnblasenkarzinom (T) desselben Patienten miteinander verglichen. Das 8%ige Polyacrylamidgel wurde 20 min in SybrGreen gefärbt. Daneben ist ein ethidiumbromidgefärbtes Agarosegel mit den reamplifizierten Banden AP1/1, AP2/1 und AP2/2, die aus dem linken Gel geschnitten wurden, zu sehen. Diese wurden anschließend direktsequenziert. Die Bande 1/2 erwies sich als Abschnitt aus der mRNA der schweren Kette von *Ferritin*, 2/1 als mitochondriale 12 S rRNA.

3.8.1 Ferritin H (Schwere Kette)

Der 5'-Primer AP1 und der 3'-Primer dT₁₂VG amplifizierten einen Abschnitt aus der mRNA der schweren Kette von *Ferritin*. Die Sequenzen waren in 274 von 280 Basen identisch (98%). Die sequenzierte Bande stammt aus der ddRT-PCR einer submukösen Bindegewebsprobe. Eine gleiche Bande zeigt sich auch in Urothel, aber nicht im Urothelkarzinom.

Ferritin, schwere Kette:

tcagaaccag cctgtgatga ctgggagagc gggctgaatg caatggagtg tgcattacat ttggaaaaa ngtgaaatca ggtgcactac
tggaactgca caaactggcc actgacagca aatgaccccc atftgtgtga ctagattgag gacacattac ctgaatgagc aggtgaaagc
catcaaagaa ttgggtgacc acgtgaccaa cttgcgcaag atggggaagc gccccgaatc tggcttggcn ggaatatent tttgacaag
cacacctgn gagacagtga ttaatgaang ctngcctct gggctaattt ccccatag

3.8.2 Mitochondriale 12 S ribosomale RNA

Mit den Primern AP2 und dT₁₂VG wurde ein Fragment aus der gesamten RNA eines Urothelkarzinoms amplifiziert. Die Größe der Gelbande unterscheidet sich deutlich von zwei gleichgroßen Banden der Urothel- und Bindegewebsprobe. Die Sequenzierung des aufgereinigten Amplifikates zeigte die Identität mit einem Abschnitt der mitochondrialen 12 S rRNA. Von 295 Basen sind 291 (98%) identisch mit der Sequenz des Gens für die 12 S rRNA auf dem mitochondrialen Genom.

Mitochondriale 12 S ribosomale RNA:

Gnttttagct ettataagat tcacatgcaa gcatccccgt tccagttagt tcaccteta aatcaccacg atcaaaaggg acaagcatca
agcacgcagc aatgcagctc aaaacgetta gctageccac acccccacgg gaaacagcag tgattaacct ttagcaataa acgaaagttt
aactaagcta tactaacccc agggttggtc aatttcgtgc cagccaccgc ggtecacga ttaaccaag tcaatagaag ccgnggtaaa
gagtgttta gatcaccccc tccccaaaa

3.9 Differential Display RT-PCR mit AP1+ / T₁₂-NotI Primern

AP1+ und T₁₂-NotI Primer amplifizierten einige differentielle Fragmente (Abbildung 8). Besonders Bande 4 scheint in den Tumoren stärker exprimiert zu werden. Die anderen numerierten Banden zeigen dagegen eher individuell exprimierte Gene bzw. Fragmente, deren Länge sich von den anderen unterscheiden.

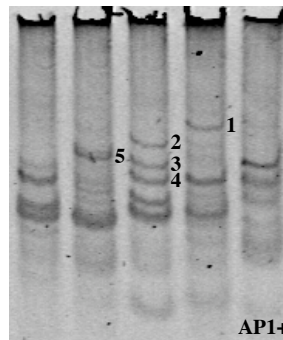


Abbildung 8. AP1+ / T₁₂-NotI ddRT-PCR Gel. Die zweite Spur repräsentiert das mit dem Tumor von Spur 1 autologe Urothel. Die anderen Spuren stellen G3 Tumoren dar. Die Bande 4 wird stark in den Tumoren, dagegen schwach im Urothel exprimiert. Die Sequenzierung identifizierte das Fragment als einen Abschnitt aus dem *mts1* Gen. Die reamplifizierte Bande ist auf Abbildung (10) zu sehen AP1+/4. Das 8%ige Polyacrylamid-Gel wurde mit SybrGreen gefärbt.

3.9.1 Metastase-assoziiertes, kalziumbindendes S100A4/MTS1 Protein

Das Fragment wurde mit dem AP1+ und dem T₁₂-NotI Primer amplifiziert (AP1+/4 Bande aus dem AP1+ ddRT-PCR Gel).

In einem Abschnitt von 139 Nukleinsäurebasen ist die ddRT-PCR-Sequenz mit dem *mts1* Gen, das für das S100A4 kalziumbindende Protein (*CAPL*) kodiert, identisch (Nukleotid 2650 bis 2788 des Homo sapiens *mts1* Gens: emb Z33457; Nukleinsäurebase 390 bis 528 der Homo sapiens *CAPL* Protein mRNA, complete cds.: gb M80563). Die benutzte Sinnstrang-Primersequenz AP1+ (gac gtc **cat gga caa cga**) stimmt in 12 Basen (fett), davon neun zusammenhängende Basen am 3'-Ende, mit der Sequenz von B2590 bis B2600 des *mts1* Gens überein. Die letzten 27 3'-terminalen Basen vor dem Poly-Adenyl-Anhang stimmen wieder gut mit der humanen *CAPL* Protein mRNA überein. Die 16 Basen davor und die ersten 40 Basen am 5'-Beginn der Sequenz waren nicht lesbar. Die 26 anschließenden Basen bis zum Beginn der

vom BLAST Programm erkannten Region, konnten anhand der mts1-Sequenz identifiziert und bestätigt werden, d.h. sie sind positionsgenau in den einander überlagernden Sequenzen enthalten. Die differentiell dargestellte Sequenz beinhaltet den kodierenden Abschnitt für die C-terminalen 37 Aminosäuren des *MTS1* Proteins, was 68% (112 von 165 Basen) von Exon 3 bzw. 36,6% der gesamten kodierenden Region ausmacht.

S100A4/MTS1/ CAPL:

```

ananannaag cggcccnagt ttacancnan cttnnagcagt tcantaccnn aacgaatact atgaaggctt cccagataan
cannccngga agaaatgaaa actcctntga tgtaggtggg ggggtctagc cagctggggc cctcctgtc gccagtgggc acttttttt t

```

3.10 Homologiedomänen Konsenssequenz RT-PCR mit dem SH2-Bindungsregion EEY-Primer und dT₁₂-NotI

Das folgende Gel (Abbildung 9) zeigt eine große Vielfalt der individuellen Expressionsmuster, es lassen sich aber differentielle Fragmente bei einigen Tumoren versus Urothel erkennen. Die Banden 3 und 6 sind stark im Tumor, schwach dagegen im zugehörigen Urothel exprimiert. Die Bande 12 kommt stärker in den fortgeschrittenen Tumorstadien vor. Die reamplifizierten Banden sind auf Abbildung (10) zu sehen.

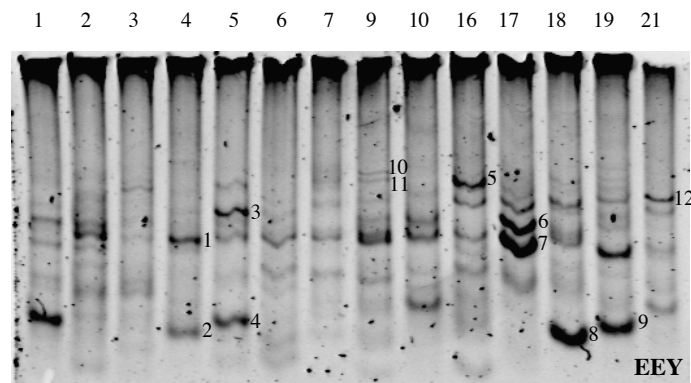


Abbildung 9. Differential Display RT-PCR mit dem von der Konsenssequenz der SH2-Bindungsregion EEY abgeleiteten 5'-Primer und dem 3'-dT₁₂-NotI. Die Proben stammen von folgenden Geweben: 1 Submuköses Bindegewebe; 2 bis 5 gutdifferenzierte Tumoren (G1); 6 normales Urothel des Patienten mit der Tumorprobe 5; 7 bis 10 mäßig differenzierte Tumoren (G2); 16, 17 und 19 wenig differenzierte Tumoren (G3); 18 zu 17 gehöriges Urothel; 21 ein undifferenzierter G4 Tumor. Das 8%ige Polyacrylamidgel wurde in SybrGreen gefärbt. Die Banden, die ausgeschnitten und reamplifiziert wurden, sind numeriert.

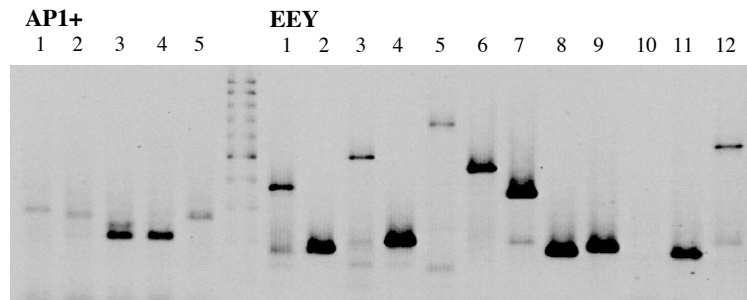


Abbildung 10. Reamplifikate der aus dem Polyacrylamidgel ausgeschnittenen Banden. Das 2%ige Agarosegel wurde in Ethidiumbromid gefärbt. Die Reamplifikate wurden in die Direktsequenzierung eingesetzt, wenn sie *eine* saubere Bande erkennen ließen.

3.10.1 High mobility group Protein HMG-1

Das Fragment, welchem die Bande 4 im EEY-ddRT-PCR Gel entspricht, stammt aus einem G1 Harnblasentumor. EEY/4 wurde reamplifiziert und sequenziert.

Ein Sequenzvergleich mit dem BLAST Programm zeigt, daß in einem Abschnitt von 19 Basen die ddRT-PCR-Sequenz (Base 45 bis 63) mit den Nukleinsäurebasen 722 bis 740 der Nicht-Histon-Chromatinprotein *HMG-1* (High Motility Group 1) mRNA des *Homo sapiens* identisch ist (dbj D63874, complete cds.). Die visuelle Überprüfung der davorliegenden 5'-Sequenz im Elektropherogramm enthüllt, daß sie offensichtlich nicht durch das *Low Complexity Filter* des Programms gelangt ist. Es handelt sich um eine repetitive Sequenz von gga- und gat-Motiven, die aber exakt mit der des *HMG-1* Gens übereinstimmt. Unmittelbar davor befindet sich auf dem Gen in der zu erwartenden Position eine Sequenz mit großer Übereinstimmung (fett) mit dem 3'-Ende des verwendeten 5'-Primer: 5'-**ggaggagga**-3'. Auch die 3'-flankierende Sequenz läßt sich eindeutig dem entsprechenden Abschnitt auf dem *HMG-1* Gen zuordnen, auch dort, wo es an einigen Stellen zu Überlagerungen zweier Sequenzen gekommen ist. Der 3'-Oligo dT-Primer hat an einen Abschnitt von 7 Adeninnukleotiden (B802 - 808; D63874) der *HMG-1* mRNA gebunden. Die Sequenz des differentiellen PCR Produktes kodiert die letzten 19 C-terminalen Aminosäuren des *HMG-1* Proteins, die ausschließlich aus Asparagin- und Glutaminsäure bestehen (saure C-terminale Domäne, s. Landsmann und Bustin 1993).

HMG-1:

ggagagaaga agagaagatg aagaagaaga tgatgatgat gaataagttg gttctagcgc agatntttt tntttggnt annaangatt
taanccacn ngnaaaaaa taattcttn aaannaaaaa aaaaaagggg ggcggaaa

3.10.2 L19 ribosomales Protein

Mit dem von der Konsenssequenz für die SH2-Bindungsstelle abgeleiteten Primer wurde ein Fragment amplifiziert und als Bande EEY/11 reamplifiziert, dessen Sequenz in einem Abschnitt von 101 Basen mit der des ribosomalen Proteins *L19* zu 100% identisch ist. Die Primersequenz liegt an der richtigen Position in der *L19* Sequenz, wo die Bindung zu erwarten ist. Allerdings waren die zwei 3'-Basen (a,t) in ihrer Reihenfolge vertauscht.

L19 ribosomales Protein:

tgatgcaga cttatccng gaggaagaga ccaagaata aaacctcca cttgtctgt acatactggc ctctgtgatt acatagatca
gccattaaaa taaacaagc ctaatctgc aaaaaaaaaa a

3.10.3 Humanes Neutrophilen-Cytochrom b, leichte Kette

Von 165 Basen zeigte ein Abschnitt von 105 Basen eine 99%ige Übereinstimmung mit der mRNA der leichten Kette des *humanen neutrophilen Cytochrom b*. Die Insertion eines Guaninnukleotids zwischen den Basenpaaren 583 und 584 des Cyt b Gens (human neutrophil cytochrome b light chain M21186) könnte ein Sequenzierartefakt sein. Da diese mRNA sehr wahrscheinlich aus neutrophilen Granulozyten, welche häufig in Tumoren zu finden sind, stammt und das Gen zudem eindeutig identifiziert ist, wurde auf die Verifikation verzichtet.

Der von EEY abgeleitete Primer paßt in 10 Positionen zu einer Sequenz an der erwarteten Stelle, nur die beiden 3'-Basen sind gc anstelle von ta, während die sieben in 5'-Richtung davor liegenden Basen mit der Primersequenz identisch sind (**gcc** **cag** **cga** **ggagga** **gta**, fett sind die übereinstimmenden Positionen).

Humanes Neutrophilen-Cytochrom b, leichte Kette:

tgctggngcg gcagcggcgg gncncngnga gntccccagg tgaacccat cnggtgacc gacaaggtcg tgtgacctcc
tgcaataaac gcagcgaagc cggaaaaaaaaaaaaagncgg gcegnaatnc ct

3.10.4 Homo sapiens keratin-verwandtes Protein, Zytokeratin 17

Der „EEY“-Primer beging eine Fehlpaarung an der vorletzten 3'-Position (c anstelle t), stimmt aber in den übrigen neun 3'-Positionen mit den im Zytokeratin-Gen an den erwarteten Positionen gefunden Basen überein (**tgaggagta**). Das Amplifikat stammt von einer G3 Tumorprobe (EEY/7). Die Sequenz stimmt in 355 von 361 Basen (98%) mit der *Homo sapiens* mRNA für das *Zytokeratin 17* Gen überein (beide sind identisch).

Zytokeratin 17:

aaacactgcc gtacgaaagg acacatacca ggaatacanta atcctgctgg atgtaagac gcgntggag caggagattg ccacctaccg
ccgctgctg gagggagagg atgccacct gactcagtac aagaaagaac cggtgaccac cgtcaggtg cgtaccattg
tggaagaggt ccaggatggc aaggtcatct cctcccgcga gcaggtccac cagaccacc gctgaggact cagctacccc
ggccggccac caggaggcag ggaggcagcc gcccatctg cccacagtc tccggctct ccagctcag cccctgctt cagtccttc
cccatgctt cttgctgat gacaataaag cttgtgact cagctataaa aaaaa

3.11 Unbekannte Sequenzen

S5: Die gut lesbare Sequenz stammt von einer G3 Tumorprobe (Probe 13), die mit dem „EEY“-Primer und dT12-NotI amplifiziert wurde (EEY/6) und stimmt in 20 zusammenhängenden Basen (B 43 bis B 62) mit dem *Neisseria meningitidis pilC1* Gen (B 1512 bis B 1531: emb Y13020) und in 18 Basen (B 15 bis B 32) mit dem *Homo sapiens* Xp22 BAC GSHB-590J6 (Genome Systems Human BAC library) Klon (B 108625 bis B 108608) überein. Das Programm *ORF Finder* identifizierte einen offenen Leserahmen in der Länge 108 Nukleinsäurebasen bzw. 35 Aminosäuren (B 109 bis B 2 der eingegebenen Sequenz). Diese Sequenz war in den Datenbanken nicht auffindbar (Protein BLAST).

S5:

gcnaggctc ggcgaacgct tgggacaagc caggcttanc aggcagccga cgagtggagc gaaataaggg gtcttggtca
tgatgctgc catgcttttg ttttttacc agcactgtga ctgtagcgac cttcaaggg ttctgaaaa aaaaaa

S7: Die Sequenz ist ohne Uneindeutigkeiten lesbar. Mit dem BLAST-Programm wurde keine ähnliche oder identische Sequenz in den Datenbanken gefunden. Die Bande EEY/8 wurde aus einer Urothel cDNA amplifiziert.

S7:

tagacgctc agggctctc cgaccggcg agtcagaate agcattcctt tctctcaac ggattacatt tctcaggaca acagtctgca
aaaagaaaat ggtgccgct tctgctaaa tcaagcccga agcctccacc caagtattga ccagcccgcg tagaaagaaa gttcccacgt
accagtcaaa aaaacgaaag ggcggaacc agccgcgct tcaaatcaa tgaatcact cgcctgtcg ggccggagca tccagctcga
aagcggtatg cagagcgcgt accgcaact ccagatact ctctcgata nggggggnc ctaaaa

S19: Die eindeutige Sequenz der AP3.1/1 Bande entspricht keiner bekannten humanen Sequenz in den Datenbanken. Auf der Nukleinsäure-Ebene war der größte Treffer das *Bombyx mori* (Seidenspinner) Gen für die Xanthin Dehydrogenase (21 von 21 zusammenhängende Basen, bei 366 bp eingegebener Sequenz). Es wurden zwei offene Leseraster (ORF) gefunden. Die eine Aminosäuresequenz war in 12 von 21 Positionen identisch und in 15 von 21 (71%) positiv mit der abgeleiteten Aminosäuresequenz des *Caenorhabditis elegans* Cosmid ZK 418.5.

S19:

gcaactgtg gtagttgat cccgaaaaa gactaaatta atttctctc agaacctgct tctcagaaat aataagaaac ttctgactag
tcaagaactt cagatgcaaa ggcagatcag acccaaatca caaaaaata gacgaagact ttctggattg tgaaagtgnat gatgttaa
agagcagggt cacatacagc acagaattct gacgtatttg taccagaatc tgataggtca gattataatt gtacaggagg aactgaggtc
ttgccaacag taacagaaaa cagtaataa aatgcatgcc ttctgcagga aagtgnagg ttctaagac ccctaagaaa actcattcag
atgcaaaa

S21:

Die Sequenz von AP3.1/3 hatte keine nennenswerten Übereinstimmungen mit den bekannten Sequenzen der Datenbanken. Der größte Treffer waren 19 von 19 Basen aus dem PstC-2 Gen

von *Mycobacterium tuberculosis*. Es wurden drei ORFs gefunden. Ein Abschnitt von 98 Aminosäuren war in 28 von 54 Positionen (51%) identisch und in 41 von 54 Positionen (75%) positiv mit dem *Escherichia coli* Gen für das *Methyl-Accepting Chemotaxis Protein*, sowie in 30 von 54 Positionen (55%) identisch und in 40 von 54 Positionen positiv für das *Escherichia coli* Serin-Chemorezeptorprotein.

S21:

```
ggngctggc cgcggcacgt ccgaacctgc cgctcaaca ctggngctgat cattcccagt cggcctcaat ggntcggctc gcgcatcgng  
atacgtatga ctactgaag accgataccg catgtacgag ttgctgcgcc tgctgacgaa cactntctgg ccgcagcagg cgctttgttc  
gaccaaggcc gcattttgct gtgtggcctc atccatctga gcagacagct tgacctt ggtccacacc tgacttctgct cagtgtctgc  
tgagcgatca ttccaataat gtctgatacg cgccgaatgg acgcgacgat ntctgcatg gtcgacccg cttggcaac caagttacgt  
gcctgctega cacgcttcac gcttggtact gatangctct tgattcctt gncggntag gcctacnttg ggcaaggntg cgcaactaa  
ccgctacag gcaaaccach ggctgtgcc ttgacngcgg ctcaccnctg gtaaggcat ttgggt
```

Es wurden noch weitere Sequenzen bestimmt, die hier nicht im Einzelnen aufgeführt werden, da sie entweder bereits aufgeführte Gene (mitochondriale 12 S rRNA), oder aber unlesbare oder nur streckenweise lesbare Mischsequenzen darstellen. Unter Letzteren gab es in kurzen Sequenzabschnitten Übereinstimmung mit verschiedenen *Homo sapiens* Genen. Dazu zählen die *Nuclear Dual-Specific Phosphatase* (SFB1; identisch in 17 zusammenhängenden Basen), der Typ II Rezeptor für das den *Müller Gang inhibierende Hormon* (Exon 8; 24 von 26 zusammenhängenden Basen) und *Bruton's Tyrosinkinase* (BTK). Desweiteren wurden Sequenzen aus den Wiederholungsfamilien (repeat families) „Alu“ und „LINE2“ identifiziert, sowie Abschnitte unbekannter Funktionen aus humanen Bac Klonen und Kosmiden.

Es folgen Gele von Standard-Reverse Transkription-Polymerase Kettenreaktionen und die dazugehörigen quantitativen Darstellungen der Bandenfluoreszenz in Balkendiagrammen gezeigt. Zuerst die Verifikation bzw. Falsifikation der differentiellen Expression der mit der ddRT-PCR gefundenen Sequenzen. Anschließend die Expressionsstärken einer Reihe von Genen, die in Verbindung mit Urothelkarzinomen von Bedeutung sind oder sein könnten, und in der Absicht mitgetestet wurden, die untersuchten Gewebe umfassender zu charakterisieren, um so die gewonnenen Ergebnisse mit denen anderer Untersuchungen vergleichen, und die Daten unbekannter mit denen bekannter Gene korrelieren zu können.

Die Nummern der Gewebeproben entsprechen der Auflistung im Abschnitt *Material und Methoden* dieser Arbeit. Zur Orientierung: Die Proben 6 und 14 sind makroskopisch normale Urothelien.

3.12 Verifikation bzw. Falsifikation der differentiellen Expression der sequenzierten ddRT-PCR Proben durch konventionelle PCR

Da Tumormaterial aus transurethralen Resektaten sehr limitiert war, konnte für die Überprüfung der differentiellen Expression keine Northern Hybridisierung, bei der μg -Mengen von RNA eingesetzt werden muß, um ein Signal zu erhalten, durchgeführt werden. Die empfindlichste, und daher materialschonendste Methode ist die PCR Amplifikation. Hierbei wurde die cDNA (1 μg RNA im 20 ml Ansatz) um den Faktor 50 verdünnt, um dann mit 1 μl in den 20 μl PCR Ansatz eingebracht zu werden (ein Äquivalent von 1 ng RNA). Diese Menge reicht theoretisch aus, um selbst Transkripte geringer Kopienzahl pro Zelle darzustellen.

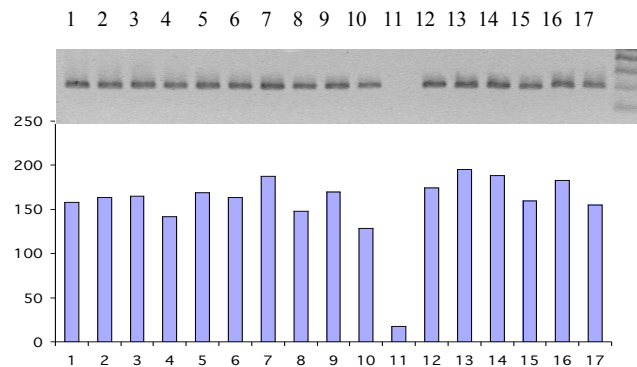
Ferritin, schwere Kette

Die DNA-Banden zeigten bei allen Proben etwa die gleiche Fluoreszenzstärke. Eine differentielle Expression der schweren Kette von Ferritin konnte mit konventioneller RT-PCR nicht gezeigt werden.

Mitochondriale 12S ribosomale RNA

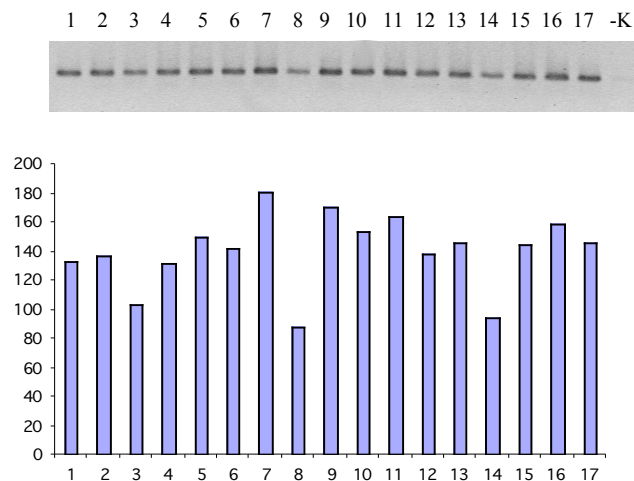
Für die mitochondriale 12S rRNA gilt dasselbe. Eine differentielle Expression wurde nicht bestätigt.

CAPL/S100A4 (mts1)



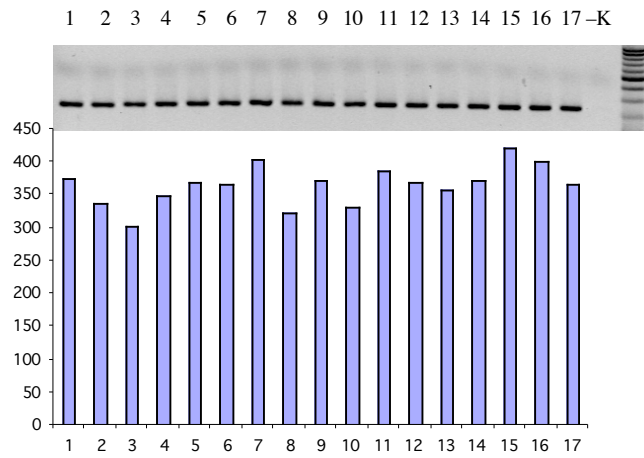
Das mit Metastasierung in Verbindung gebrachte *mts-1* Gen scheint trotz einer differentiellen Bande in der ddRT-PCR in allen untersuchten Gewebeproben exprimiert zu sein. Bis auf die sehr schwache Bande bei der Probe 11, gibt es hier keine großen Unterschiede in der Expressionsstärke, weder zwischen den Tumoren unterschiedlicher pathologischer Grade, noch im Vergleich zu normalem Urothel und Bindegewebe.

HMG-1



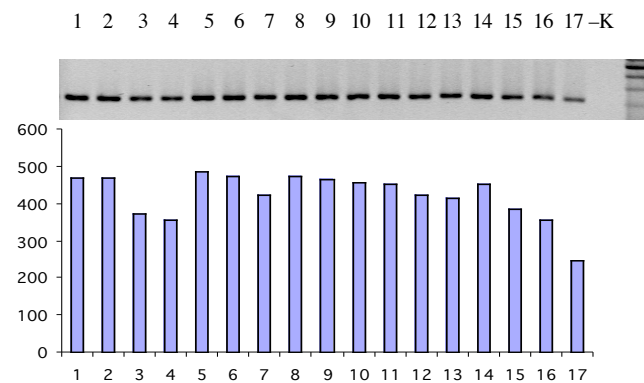
Eine auffallend niedrige Expression von HMG-1 zeigt die Urothelprobe 14 im Vergleich zum autologen Harnblasentumor 13. Desweiteren wurden keine Korrelationen der Expressionsstärken mit Tumoren und Malignitätsgraden gefunden.

L19 ribosomales Protein



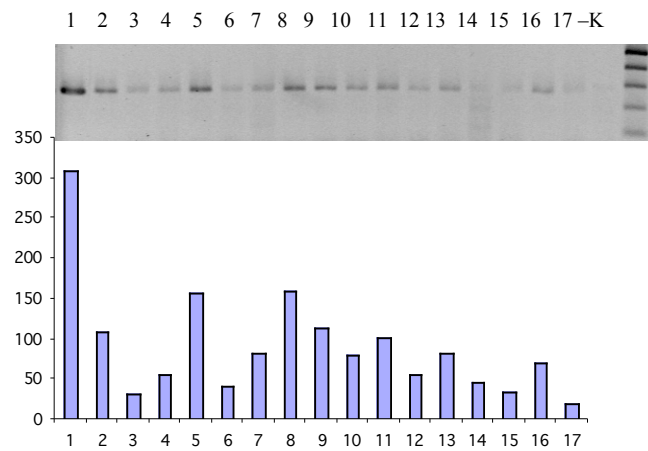
Eine gleichmäßige Stärke der Expression des L19 Proteins darf konstatiert werden.

Zytokeratin 17



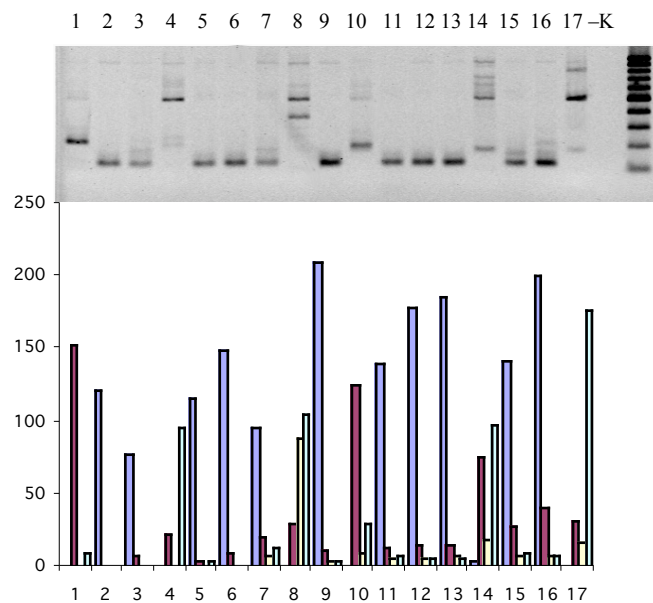
Die differentielle Expression bestätigt sich auch beim Zytokeratin 17 nicht. Es ist aber ein leichter Rückgang der Expressionsstärke zu den wenig differenzierten Tumoren hin zu erkennen.

Nuclear Dual-specific Phosphatase



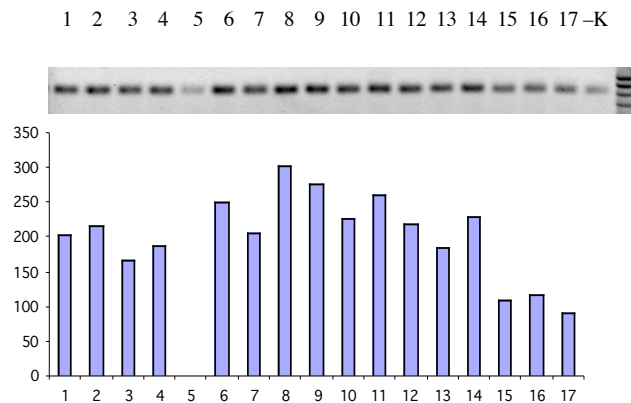
Die stärkste Gel-Bande zeigt die Probe 1, ein Ureterbindegewebe. Die Tumoren zeigen intensivere Banden als die korrespondierenden normalen Urothelien.

S19



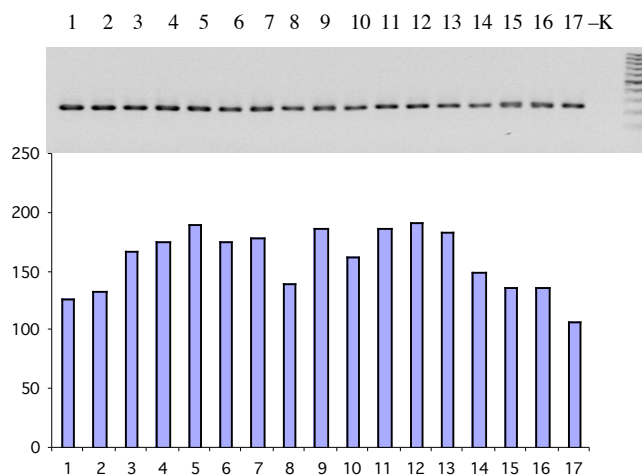
Die RT-PCR zeigt bei den meisten Proben die erwartete Bande bei 110 Basenpaaren (graue Balken). Fragmente von etwa 200 bp (schwarze Balken) sind bei zwei Proben (1 und 10) prominent, bei zwei weiteren vorhanden (15 und 17). Vier Proben (4, 8, 14 und 17) weisen jeweils ein etwa 500 bp langes Fragment auf (schräg gestreifte Balken).

S21



Das S21-Fragment zeigt eine Tendenz zur abnehmenden Expression mit zunehmender Entdifferenzierung der Tumoren. Urothel exprimiert die entsprechende mRNA stärker als die korrespondierenden Tumoren. In einem Fall (5) ist die Intensität der Bande so schwach, daß sie im Hintergrund untergeht (Die Negativkontrolle zeigt eine Bande und wurde daher subtrahiert).

GAPDH

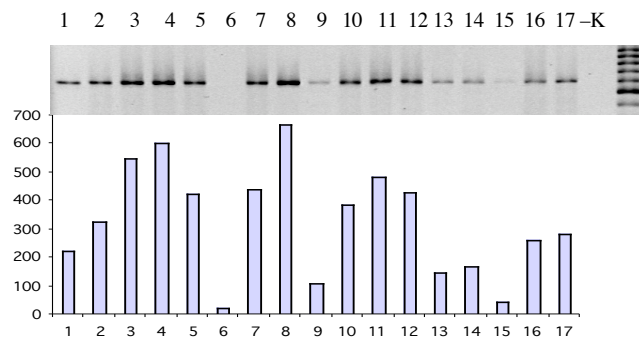


Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase dient als wenig reguliertes Gen der Kontrolle der eingesetzten RNA bzw. cDNA Menge und der Standardisierung der PCR.

3.13 Differentielle Expression einiger ausgesuchter Gene, die bei der Entstehung und Ausbreitung von Urothelkarzinomen oder anderen Krebsarten von nachgewiesener oder potentieller Bedeutung sind und/oder als Tumormarker dienen könnten.

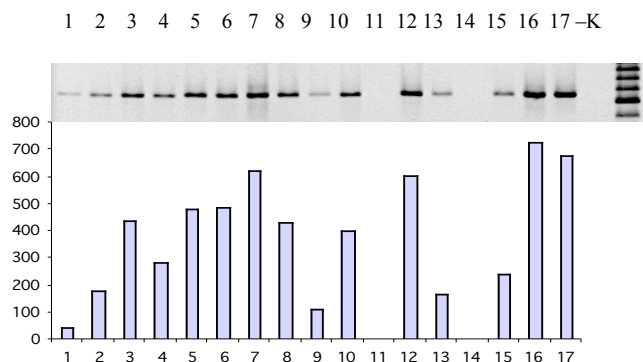
Zytokeratin 8

Die Expression von *Zytokeratin 8* ist in den meisten Tumoren stärker exprimiert als in den Urothelien.

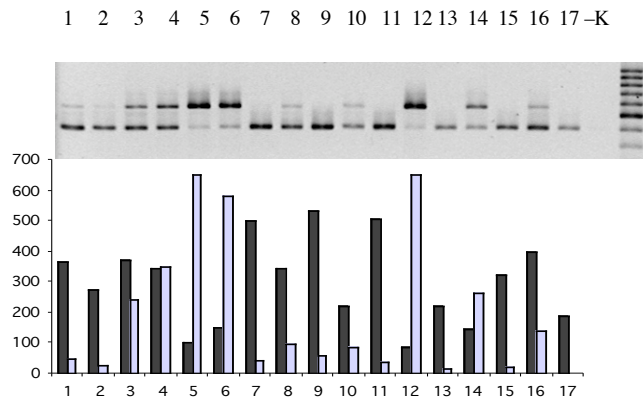


Zytokeratin 18

Ein Zusammenhang zwischen Tumorgrad und -stadium und Zytokeratin 18-Expression läßt sich nicht erkennen.

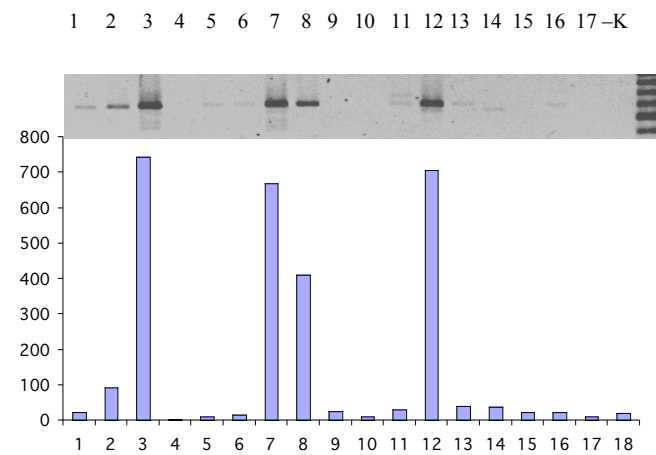


Zytokeratin 20



Mal

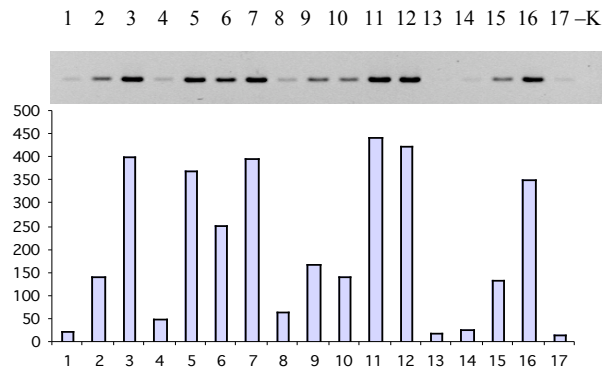
(als Differenzierungsmarker auch bei Urothel beschrieben)



Einige der gut bis mäßig differenzierten Tumoren zeigen *Mal*-Expression, nicht aber die Urothelien.

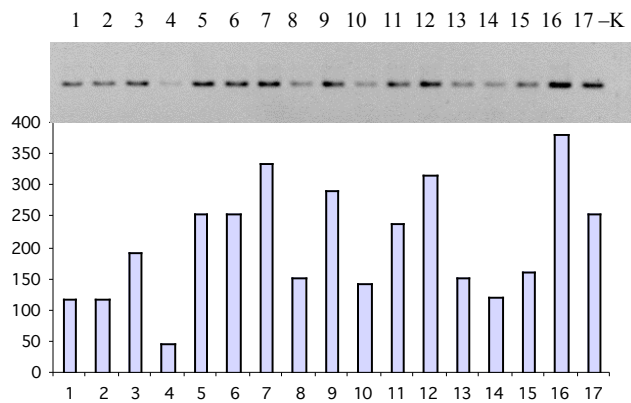
E-Cadherin

(Kalziumabhängiges epitheliales Zelladhäsionsmolekül, dessen metastasesupprimierende Eigenschaft experimentell belegt ist)



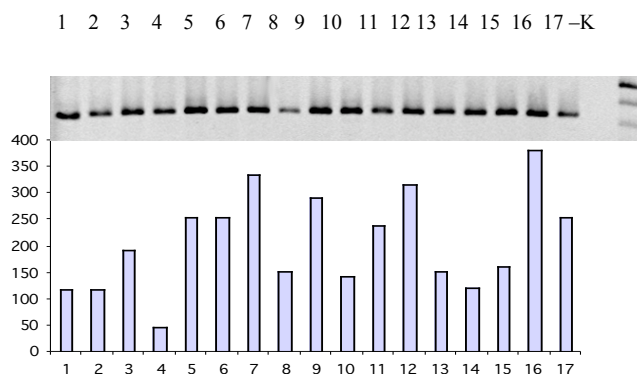
α -Catenin

(verankert den *E-Cadherin-Catenin*-Komplex im Zytoskelett)



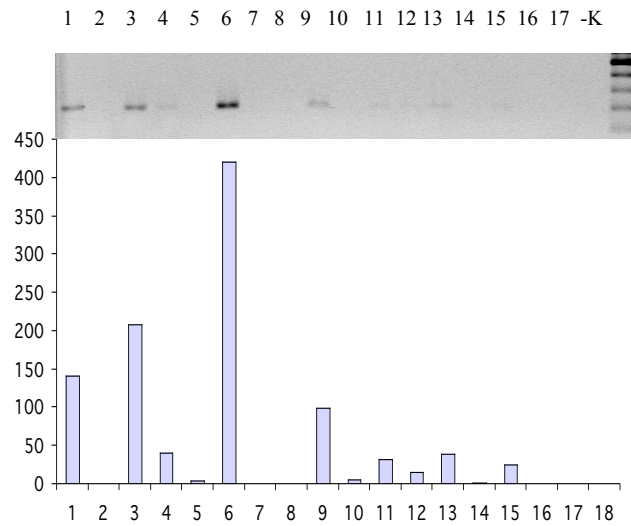
β -Catenin

(transduziert Signale nach homphiler Bindung von *E-Cadherin*)



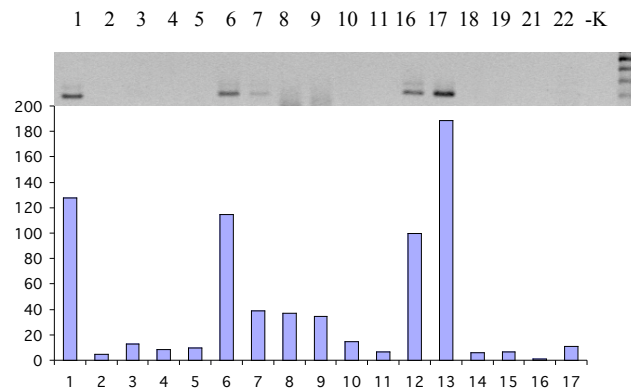
Scatter Factor (SF/HGF)

(Wird von Stromazellen sezerniert und verleiht nach Bindung an seinen Rezeptor (MET) Zellen erhöhte Motilität, die zu Invasion und Metastasierung beiträgt)

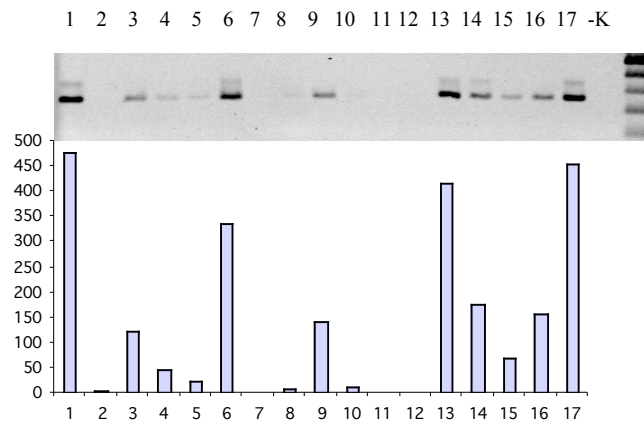


Telomerase RNA

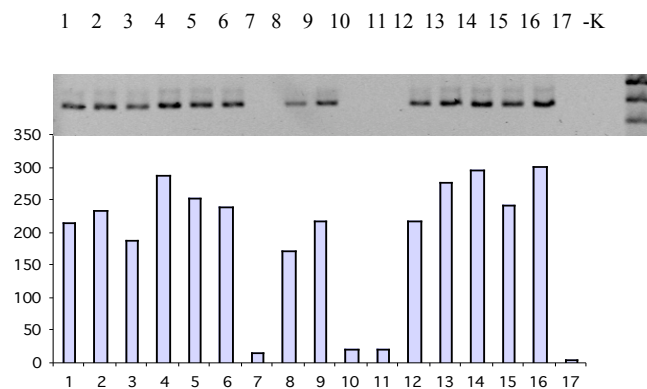
(Telomerase verlängert die repetitiven Chromosomenenden (Telomere), trägt damit zur Stabilität des Genoms bei und verleiht Zellen Immortalität)



DNA-Methyltransferase (dnmt 1) (Methyliert DNA und reguliert damit Transkription. Eine fehlerhafte DNA-Methylierung könnte zur Karzinogenese beitragen)

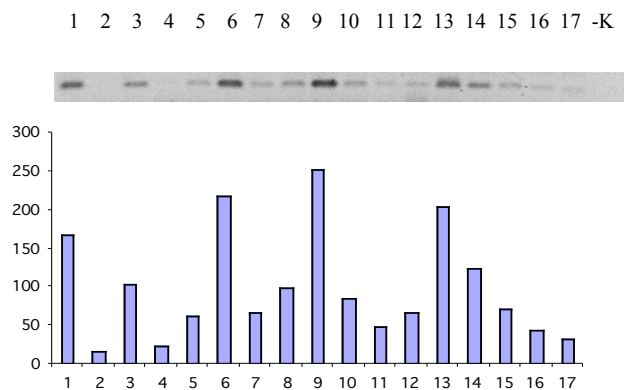


DNA-Methyltransferase (dnmt 2)



P-Glykoprotein (mdr1)

(Vermittelt einen vorherrschenden Typ der multiplen Resistenz gegen bestimmte Zytostatika (Multi Drug Resistance; mdr))



4. Diskussion

4.1 Uroplakin-PCR

Die *Uroplakin*-PCR wurde zu einer Zeit entwickelt, als noch keine *Uroplakin* Nukleinsäuresequenz des *Homo sapiens* verfügbar war. Die *Uroplakine* wurden als hochkonservierte Proteine beschrieben: Antikörper gegen bovines *Uroplakin* reagierte mit dem entsprechenden Protein von acht anderen Arten, einschließlich dem des Menschen (Wu et al. 1994); die von Rind cDNA und Maus Gen abgeleiteten Aminosäuresequenzen für *Uroplakin* II waren zu 83% identisch; die elektrophoretische Wanderungsgeschwindigkeiten der Proteine glichen einander (Wu et al. 1994). Die Urothelspezifität wurde durch ein Reportergenkonstrukt mit dem UPII-Promotor in einem transgenen Maus-Experiment gezeigt (Lin et al. 1995). Das Reportergen wurde außer in Nierenbecken, den Harnleitern und Harnblase nur noch im Hypothalamus exprimiert, der auch für die ektope Expression vieler anderer Gene bekannt ist.

Daher wurde der Versuch unternommen, mit uroplakinspezifischen Primer-Oligonukleotiden, deren Sequenzen von den bovinen *Uroplakin* mRNAs stammten, die entsprechenden Fragmente aus humaner Urothel-cDNA zu amplifizieren. Da dies gut funktionierte, war es anschließend möglich, die PCR-Fragmente, die die vier humanen *Uroplakin*-mRNAs repräsentierten, zu klonieren und zu sequenzieren. In den resultierenden humanen *Uroplakin*-Sequenzen wurden dann Abschnitte ausgesucht, nach denen neue Primer-Oligonukleotide synthetisiert wurden. Die Fragmentlängen wurden so gewählt, daß eine Koamplifikation in *einer* Probe sinnvoll möglich ist, d.h. daß die entsprechenden Banden im Agarosegel gut unterscheidbar sein würden. Es entstand eine aufsteigende Leiter von UPIa (320 bp), UPIb (408 bp), und UPII (527 bp), mit UPIII als Zwischensprosse (461 bp; das mit den bovinen Primer amplifizierte Fragment, ließ aufgrund seiner Größe keine konsequente Fortsetzung der Leiter nach Oben hin zu). Die Koamplifikation der vier *Uroplakine* war zwar möglich, es zeigte sich aber im Vergleich zu den Einzel-PCRs, daß hin und wieder eine Bande ausfiel. Somit ist die Zuverlässigkeit dieser multiplexen UP-RT-PCR nicht hundertprozentig gewährleistet. Daher wurden für diese Arbeit die Expressionsdaten aus den Einzel-UP-RT-PCRs verwendet. Bei den meisten Banden stimmten jedoch die Ergebnisse der multiplexen UP-RT-PCR mit denen der Einzel-UP-RT-PCRs auch quantitativ überein.

Uroplakine werden auch in Zellkulturen von primären Urothelzellen und verschiedenen Harnblasenkarzinomzelllinien stabil exprimiert, im Unterschied zu Zytokeratin 20, einem anderen Marker der terminalen Differenzierung von Urothel (eigene Ergebnisse; Southgate 1994).

Auch in chemisch induzierten Tumoren blieb die UP-Expression weitgehend erhalten. Ogawa et al. fanden in einem Ratten Karzinogenese Modell mit N-[4-(5-Nitro-2-Furyl)-2-Thiazolyl]-Formamid (FANFT)-, Uracil-, Natrium-Saccharin- oder Natrium-Ascorbat-induzierter urothelialer einfacher Hyperplasie, papillär-nodulärer Hyperplasie, Papillomen und Karzinomen, daß hier *Uroplakine* im Unterschied zu normalem Urothel, wo *Uroplakine* nur in der Deckzellschicht lokalisiert sind, eine ungeordnete und fokale Expression, gewöhnlich ohne Expression auf Deckzellen, aufwies (bei FANFT und Uracil induzierten Karzinomen), oder daß Intermediärzellen in geordneter Weise gefärbt waren (bei Uracil-induzierter einfacher Hyperplasie). Es scheint, daß ungeordnete Differenzierung ein Index für Malignität bei malignen Erkrankungen der Harnblase ist. Sie ist ein frühes Ereignis bei FANFT-induzierten Läsionen aber ein Spätes bei Uracil-, Natrium Saccharin- und Natrium Ascorbat-induzierten Läsionen (Ogawa et al. 1996).

Mit den bovinen UPIb-PCR-Primern wurde in der vorliegenden Arbeit eine Reihe humaner Urothelkarzinome unterschiedlicher pathologischer Grade und Stadien mittels RT-PCR auf ihre UPIb-Expression untersucht und gefunden, daß alle gut bis mäßig differenzierten Urothelkarzinome und etwa die Hälfte aller wenig differenzierten bis anaplastischen Tumoren UPIb exprimieren.

In weitgehender Übereinstimmung mit diesem Ergebnis für UPIb zeigen Moll et al. 1995 in einer immunhistochemischen Studie, daß UPIII Protein in 88% (14/16) der untersuchten papillären nicht-invasiven, 53% (29/55) der invasiven und 66% (23/35) der Metastasen nachweisbar war. Dagegen waren 177 nichturotheliale Karzinome für Uroplakine negativ.

Die Expression von Uroplakin in Metastasen, sowie in chemisch induzierten Tumoren im Tiermodell ließ es als Möglichkeit denken, mit einem UP-RT-PCR Test ausgestreuende und potentiell metastasierende Urothelkarzinomzellen im Blut von Urothelkarzinom-patienten nachzuweisen.

Der hier entwickelte UPIb-RT-PCR Bluttest konnte *eine* urotheliale Zelle (von normalem Urothel, der gut differenzierten (G1) Urothelkarzinomzelllinie *RT4*, sowie der

mäßig differenzierten (G2) Urothelkarzinomzelllinie 5637) in einem Milliliter Blut nachweisen und zeigt damit eine sehr hohe Nachweisempfindlichkeit.

Lobban et al. (1998) verfolgten die gleiche Idee, und sequenzierten PCR-Fragmente, die mit Primern, deren Sequenzen den bovinen Uroplakingenen, im Fall von *UPIb* zusätzlich dem *TII* Gen des amerikanischen Nerzes, entnommen wurden, aus humaner urothelialer cDNA amplifiziert wurden. Sie stellten eine humane urotheliale cDNA-Bibliothek her, isolierten daraus aber nur die *UPII*-cDNA und sequenzierten sie in voller Länge (920 bp). Mit *in vitro* transkribierten RNA-Proben untersuchten sie die mRNA Expression in normalen Ureteren durch *in situ* Hybridisierung, und stellten eine auf die Schirm- bzw. Deckzellschicht begrenzte *UPIa* und *II*-Expression fest. *UPIb* konnte zusätzlich in den oberen Intermediärzellen nachgewiesen werden, während *UPIII* nicht detektierbar war. Keine der *Uroplakin*-Proben zeigte irgendeine spezifische Hybridisierung mit den untersuchten nicht-urothelialen Geweben (Niere, Lunge und Duodenum). Mit *Ribonuclease Protection Assay* fanden die Autoren alle vier *Uroplakin*-Transkripte in mRNA aus Ureteren und verglichen die relativen Bandenintensitäten miteinander. In Übereinstimmung mit meinen eigenen Ergebnissen, wurden *UPIa* und *UPII* am stärksten exprimiert, *UPIII* am schwächsten. Die Expressionsstärke war in Urothelkarzinom-Zelllinien mit dem Differenzierungsgrad korreliert. In Urothelkarzinom-Tumoren wurde die Uroplakinexpression mit *in situ* Hybridisierung untersucht. Neun nicht-invasive Tumoren zeigten begrenzte *UPIa* und *UPII* mRNA-Expression in den gut differenzierten Zellen an der Papillenoberfläche oder in der flachen dysplastischen Mukosa, geringdifferenzierte Gebiete waren dagegen negativ. *UPIb* mRNA Expression war nach der neoplastischen Transformation dysreguliert. Acht primäre invasive Tumoren und ihre Lymphknotenmetastasen wurden untersucht: Vier der Tumoren hatten sowohl im Primärtumor, als auch in den Metastasen die *UPIb* Expression verloren, die anderen vier zeigten eine starke *UPIb* Expression im gesamten Urothel. Die Expression von *Zytokeratin 20* korrelierte nicht hundertprozentig mit der *UPIb* Expression. *CK20* Expression war in fünf von sieben invasiven Tumoren erhalten, *UPIb* dagegen nur in drei. *UPIb* war dafür in allen fünf Primärtumor-Metastase-Paaren exprimiert, während es bei *CK20* zu einem differentiellen Verlust der Expression in einem Fall kam. Die Zahlen reichen nicht aus, um eine repräsentative Aussage für Urothelkarzinome treffen zu können.

In guter Übereinstimmung mit der vorliegenden Arbeit kommen Lobban et al. zu dem Schluß, daß *UPIb* weniger auf differenziertes Urothel beschränkt ist, als die anderen Uroplakine. Seine konstitutive Expression in proliferierenden Urothelzellkulturen, sowie

die Expression in entdifferenzierten Urothelkarzinom-Tumoren, waren schließlich der Grund, warum in der eigenen Studie die *UPIb* Expression als Marker für Urothelkarzinome gewählt wurde.

Yuasa et al. (1998) haben Primer synthetisiert, die von den 5'- und 3'-untranslatierten Bereichen der bovinen *UPIb* und *UPIII* abgeleitet waren, amplifizierten in einer PCR die entsprechenden Abschnitte humaner urothelialer mRNA und sequenzierten diese. Mit einer genesteten PCR untersuchten sie drei normale Urothelgewebe und 12 TCC Tumoren (drei Grad 1; sieben Grad 2; zwei Grad 3 Urothelkarzinome). *UPIb* und *UPIII* wurden in allen diesen Proben exprimiert. Angesichts der geringen Probenzahl, besonders bei den Grad 3 - Tumoren, läßt sich keine signifikante Aussage treffen. Nach den eigenen Ergebnissen, die mit anderen Untersuchungen übereinstimmen, exprimieren bei den entdifferenzierten Grad 3 bis 4 Tumoren nur noch etwa die Hälfte *UPIb* (siehe vorliegende Arbeit; Lobban et al. 1998) oder *UPIII* (Moll et al. 1995). Es sind aller Wahrscheinlichkeit nach zufällig zwei UP positive G3 Tumoren erfaßt worden. Yuasa et al. haben, genau wie in der vorliegenden Arbeit beschrieben wird, einen *Uroplakin*-RT-PCR-Bluttest eingesetzt, und haben damit im periphären Blut aller drei Patienten mit metastatischen Tumoren Urothelkarzinomzellen detektiert, nicht aber in allen neun nicht-metastatischen Urothelkarzinomen oder in drei gesunden Freiwilligen. Sie kommen zu dem Schluß, daß zirkulierende Urothelkarzinomzellen mit einer Uroplakin-spezifischen RT-PCR nachgewiesen werden können. Bis heute sei kein spezifischer Serummarker für Urothelkarzinome bekannt. Uroplakine seien daher Kandidaten für urothelkarzinomspezifische Serumentumormarker.

In der gleichen Annahme, daß humane Uroplakine mit denen des Rindes ähnlich hoch homolog sind wie bovines *UPIb* mit dem Nerz *TII*, nutzten Finch et al. (1999) nach solchen Sequenzen hergestellte Primer, um in zwei PCR-Ansätzen überlappend ein 5'- und ein 3'-Fragment zu amplifizieren und über eine interne EcoNI-Restriktionsschnittstelle ligieren, sodaß die gesamte kodierende Sequenz kloniert wurde (die Amplifikation des gesamten kodierenden Abschnittes ist den Autoren nicht gelungen). Im Northern Blot zeigten alle zehn untersuchten RNA Proben von normalem Urothel ähnliche *UPIb*-Expressionsstärken. Keine der fünf Blasenkarzinomzelllinien zeigte irgendeine detektierbare *UPIb* mRNA Expression im Northern Blot. Die 5637 Zelllinie, die übrigens von einem Grad 2 Tumor stammt und nicht, wie von Finch et al. berichtet, von einem gut differenzierten Urothelkarzinom, zeigt in den eigenen Tests eine *UPIb* Expression von gleicher Stärke wie in normalen Urothelien und in der gut differenzierten *RT4* Zelllinie. Genau wie mit der *RT4*-Zelllinie, war es möglich mithilfe des *UPIb*-RT-PCR Bluttestes eine

5637 Zelle in 5 ml Blut zu erkennen. Von den 16 durch Finch et al. untersuchten Harnblasenkarzinomproben, zeigten im *Northern Blot* nur fünf Tumoren eine Expressionsstärke vergleichbar mit Normalurothel. Verringerte Expression von UPIb mRNA wurde in vier Blasengeschwülsten beobachtet, und in sieben Tumoren war die UPIb Expression ganz verschwunden. Untersucht wurden vorwiegend mittelgradig bis entdifferenzierte Tumoren, und auch wenn, wie die Autoren richtig darlegen, aufgrund der geringen Probenzahl keine akkurate Korrelation zwischen der Höhe der Uroplakin-Expression und dem Grad der Invasion und dem Krebsstadium herstellbar ist, läßt sich aus der Verteilung der *UPIb* Expression dennoch die Tendenz erkennen, daß bevorzugt die G3 Tumoren sich unter den Proben befanden, die einen Verlust der *UPIb* Expression erfahren haben.

Finch et al. weisen darauf hin, daß ihre Studie nicht ausschließen kann, daß als Ursache für Verlust oder Reduktion der *UPIb* Expression Punktmutationen oder kleine Deletionen verantwortlich sind. Andere mögliche Mechanismen bei der Deregulation der *UPIb* mRNA Expression wären Promotorveränderungen, Hypermethylierung des *UPIb* Gens oder Promotors, oder die verringerte Expression eines Gens, dessen Produkt die *UPIb* Transkription reguliert. Die Autoren diskutieren die Rolle anderer Tetraspanproteine (solche mit vier transmembranen Domänen) als Metastases-Suppressor-Gene, wie z.B. *CD63* bei Melanomen, *KAIL* in prostatischem und pankreatischem Krebs, *CD9* in Brust- und kleinzelligem Lungenkrebs. Eine solche Rolle könnte bestenfalls nur einer Untergruppe von Urothelkarzinomen zukommen, da etwa die Hälfte der metastasierenden Urothelkarzinome *UPIb* exprimieren. In diesen Fällen müßte dann aber das UPIb Protein defekt sein, oder infolge einer veränderten mRNA nicht translatiert werden.

Im transgenen Mausmodell wurde gezeigt, daß ein Reporter-genkonstrukt mit der UPII-Promotorregion (3,6 kb 5'-flankierende Sequenz) in den suprabasalen Zellschichten des Urothels exprimiert wird. Das Transgen war in keinem getesteten nichturothelialen Epithel oder anderen Gewebe, außer dem Hypothalamus, exprimiert (Lin et al. 1995).

Im Widerspruch dazu stehen Beobachtungen in unserem Labor, daß Uroplakine beim Menschen auch in nicht-urothelialen Geweben, wie z.B. Nierenparenchym, bestimmte Uroplakinexpressionsmuster zeigen (Kaspar 1998). Uroplakin mRNA befindet sich in unterschiedlichen Kombinationen von Uroplakin Ia, Ib, II und III und in verschiedenen relativen Konzentrationen zueinander auch in einigen anderen nicht-urothelialen Geweben und Tumoren. Dies zeigt, daß die in der Literatur etablierte Urothelspezifität, zumindest

auf der Transkriptebene, durch unsere RT-PCR-Untersuchungen für den Menschen nicht bestätigt werden.

Dies wird möglicherweise zusätzlich durch die Herkunft eines humanen cDNA Klons belegt, dessen Sequenz ihn als Uroplakin III Sequenz identifiziert. Er stammt aus mikrodisssezierten Zellen, die histologisch als Prostatakarzinomzellen bestimmt wurden (Strausberg 1997). Es ist aber nicht auszuschließen, daß diese Zuordnung ein Irrtum war, und es sich dabei in Wirklichkeit um Urothelkarzinomzellen handelte.

Der *Uroplakin*-RT-PCR Bluttest könnte trotz der eingeschränkten Spezifität sinnvoll eingesetzt werden. Erstens könnten bei bekanntem Primärtumor eines Urothelkarzinoms disseminierte uroplakinpositive Tumorzellen mit hoher Nachweisempfindlichkeit aufgespürt werden, die eine Progression zum invasiven und damit potentiell Metastasen bildenden Stadium anzeigen würden, noch bevor Sekundärtumoren mit den herkömmlichen Methoden diagnostiziert werden könnten. Eine Einschränkung der Nützlichkeit erzwingt aber das Faktum, daß gerade von den stark entdifferenzierten Tumoren, die die größte Tendenz zu Invasion und Metastasierung aufweisen, nur noch etwa die Hälfte *Uroplakin* bildet. Dies trifft genauso für eine ganze Reihe von Markern zu, einschließlich der Zytokeratine, die aber bei weitem nicht die Gewebsspezifität der Uroplakine aufweisen, auch wenn diese relativiert werden muß. Da die frühzeitige Diagnose eines progredienten Urothelkarzinoms von besonderer Dringlichkeit ist, sollte dieser *Uroplakin*-RT-PCR Bluttest an Blutproben von betroffenen Patienten getestet werden und empirisch festgestellt werden, ob er für die Diagnose taugt und von klinischer Nützlichkeit werden kann.

4.2 Differential Display RT-PCR

Die differentielle Expression spezifischer Transkripte in Urothelkarzinomen unterschiedlicher Malignitätsgrade und nicht neoplastisch veränderten Urothelien wurde mit der *Differential Display* RT-PCR Methode dargestellt. Diese bietet den Vorteil, daß die mittels Zufallsprimer amplifizierten Fragmente mehrerer Proben auf *einem* Polyacrylamidgel nebeneinander aufgetrennt und miteinander verglichen werden können. Bei alternativen Techniken, die auf der Eliminierung gemeinsamer Transkripte durch substraktive Hybridisierung beruhen, können nur zwei mRNA-Populationen miteinander verglichen werden, wobei nur differentielle Transkripte der einen Probe gefunden werden.

Der Arbeits- und Zeitaufwand, dieses Prozedere an vielen Gewebeproben durchzuführen, ist sehr viel größer. So müßte man sich auf eine stichprobenartige Auswahl beschränken, was aufgrund der großen Heterogenität bei Krebszellen nicht wünschenswert ist. Hat man nach substraktiver Hybridisierung, Klonierung differentieller Transkripte oder dem Screening von cDNA Bibliotheken mit differentiellen Genproben, Gene identifiziert, muß der Nachweis, daß das gefundene Transkript auch bei anderen Geweben eine Rolle spielt erst noch erbracht werden, während dies bei der ddRT-PCR schon auf dem ersten Gel sichtbar wird. Der Nachteil der ddRT-PCR ist aber ihre Neigung, mRNAs hoher Kopienzahl bevorzugt zu amplifizieren und solche, die in wenigen Kopien pro Zelle vorliegen - dies könnte für das Krebsgeschehen sehr wichtige Gene betreffen - zu unterschlagen. Dieser Kritikpunkt gilt auch für die einfache substraktive Hybridisierung. Außerdem ist mit falsch positiven Fragmenten zu rechnen, was den Vorteil gewonnener Zeit wieder zunichte machen kann, wenn man bei der Überprüfung ihrer differentiellen Expression feststellt, daß es sich bei den ddRT-PCR Banden um falsch Positive handelt (Diatchenko 1996). In der vorliegenden Untersuchung zeigt sich dieses Problem deutlich: Die meisten der gefundenen differentiellen Gelbanden bzw. PCR-Fragmente repräsentieren Gene, deren differentielle Expression durch eine konventionelle RT-PCR nicht bestätigt wurde. Der Einwand, dies könne an der Tendenz der konventionellen PCR liegen, quantitative Unterschiede zu nivellieren, sollte aus theoretischen Gründen hier nicht zutreffen, weil alle PCR-Reaktionen in der exponentiellen Phase gestoppt wurden. Außerdem waren Unterschiede sichtbar, aber diese ergaben selten konsistente Korrelationen zu pathologischen Kriterien, wie Tumorgrad und -stadium, oder zu bestimmten Harnblasentumoren im Vergleich mit den autologen Urothelien.

Die Beobachtung, daß die in der *Differential Display* RT-PCR gefundenen differentiellen PCR-Fragmente besonders solche Transkripte darstellen, die in hoher Kopienzahl in der Zelle vorliegen, wird von Bertoli et al. 1995 bestätigt. In einem Modellsystem wurde die Sensitivität der ddRT-PCR getestet. Primer mit den perfekt passenden Sequenzen für PR1a (Pathogenesis Related Protein, das in Tabakmosaikvirus-infizierten Blättern etwa 1% der mRNA ausmacht) und TobRB7, welches konstitutiv in Tabakwurzeln, nicht aber in Blättern exprimiert wird, und etwa 0,3% der gesamten mRNA repräsentiert, konnten in der ddRT-PCR die entsprechenden mRNAs nicht detektieren. In einem einfacheren System wurden in Verdünnungsreihen der sehr häufigen Kaninchen α - oder β -Globin mRNAs 4 pg Ziel-RNA in 2 mg Gesamt-RNA detektiert, was einem raren Transkript entspräche. Wurde aber in einem realistischeren System diese Globin RNA mit

heterologer Gesamt-RNA gemischt, so konnte keine Primer/Ziel-RNA Kombination α - oder β -Globin bei < 400 pg (1,2% von mRNA, entsprechend einer mittelmäßig bis häufig auftretenden mRNA) detektieren. Die Ursache hierfür liegt vermutlich bei der Konkurrenz um die in niedriger Konzentration eingesetzten Nukleotide. In hoher Kopienzahl vorliegende Transkripte sind schneller zu detektierbarer Konzentration amplifiziert und brauchen die Nukleotide auf, sodaß seltene Transkripte keine Chance haben so hoch amplifiziert zu werden, daß sie auf dem Gel als Banden sichtbar werden. Die Nukleotide als limitierender Faktor können nicht in beliebig höherer Konzentration eingesetzt werden, da dies den Hintergrund erhöhen würde. Eine Möglichkeit bestünde in einer stringenteren PCR mit längeren Primern bei höherer Anheftungstemperatur, was aber die Repräsentation für mRNAs verringerte. In der vorliegenden Arbeit wurde ein Kompromiß versucht: 20mer Nukleotid-Primer durften im ersten Zyklus bei wenig stringenter Anheftungstemperatur wie 7 bis 11-mere binden (40°C). Danach wurde die PCR unter stringenter Primerbindung bei 58°C , durchgeführt. Eine Reduzierung der Template-Komplexität wäre eine weitere Maßnahme, um die Repräsentation für Transkripte geringer Häufigkeit zu erhöhen.

Im Allgemeinen ist es bei der *Differential Display* RT-PCR von Vorteil, wenn der Komplexitätsgrad der mRNA Population so gering wie möglich gehalten wird. Das ist z.B. bei einer Zelllinie der Fall, die unter standardisierten Kulturbedingungen gehalten, durch *einen* definierten Parameter beeinflusst, und mit der unbehandelten Referenzkultur verglichen wird. Dies wird durch Behandlung mit einer chemischen Verbindung oder einem physikalischen Faktor erreicht (Ion oder chemische Verbindung: z.B. experimentelle, therapeutische oder toxische Wirksubstanz, Antikörper, Sense- oder Antisense-Oligonukleotid, mRNA, Expressionsvektor; Bestrahlung, Temperatur-, pH- oder mechanischer Streß etc.). Mit solchen definierten und standardisierten Bedingungen sind bereits viele Gene gefunden und beschrieben worden. Auch bei Krebszelllinien waren solche Ansätze häufig erfolgreich. Auf der anderen Seite stellen *in vitro* Kulturbedingungen ein artifizielles System dar, welches kaum die *in vivo* Situation widerspiegelt und Kulturartefakte produzieren kann. Kleinste Unterschiede in den Kultur- und Versuchsbedingungen können zu divergierenden oder gar konträren Ergebnissen führen. Die Wechselwirkungen zwischen verschiedenen Zelltypen, entweder durch direkte Zell-Zell-Kontakte oder indirekt vermittelt durch extrazelluläre Matrix, Zytokine, Hormone, und andere parakrine Faktoren, werden mit einer *in vitro* Monokultur nicht erfaßt. Solche Faktoren können aber für das biologische Verhalten von Krebszellen

entscheidend sein, und Eigenschaften wie erhöhte Proliferation, Motilität, Invasion, Metastasierung etc. und die zugrundeliegenden Vorgänge von der Signalvermittlung bis zur veränderten Genexpression unter Umständen erst induzieren. Um die *in vivo* Verhältnisse zu erfassen, wurde in dieser Arbeit der Versuch unternommen, mRNAs aus Tumorgewebe und aus normaler Mukosa der harnleitenden Wege miteinander zu vergleichen, anstatt mit Zelllinien oder Primärkulturen zu arbeiten. Die Gefahr, falsch positive Ergebnisse zu erhalten ist bei diesem Ansatz höher, als bei dem vorher Beschriebenen, da ein Tumor und eine Mukosa aus heterogenen Zellpopulationen bestehen, die außer den Epithel- bzw. Karzinomzellen, auch noch Stroma- bzw. submuköse Bindegewebs-Fibrozyten, Endothel- und Immunzellen (Gewebsmakrophagen, infiltrierte Lymphozyten und neutrophile Granulozyten, wie das Beispiel der bei der ddRT-PCR gefundenen leichten Kette des *Neutrophilen-Cytochrom b* zeigt) enthalten, und dies in unterschiedlicher quantitativer Zusammensetzung. Diese Zellen produzieren alle ihre spezifischen mRNAs und beeinflussen einander auch in ihrer Genexpression. Damit entsteht eine Komplexität, die, wie oben beschrieben, für die ddRT-PCR-Methode limitierend sein kann, was die Detektion von Transkripten, die in niedriger Kopienzahl je Zelle vorliegen, betrifft. Eine solche Verschiebung in Richtung Erfassung häufiger mRNAs, wie dies bei Bertoli et al. 1995 beschrieben wurde, wird durch die vorliegende Arbeit bestätigt: *Ferritin*-, *Zytokeratin*-, *High-Mobility-Group (HMG)* Protein- und ribosomale RNAs u.a. gehören nicht zu den seltenen Transkripten. Die Bevorzugung von häufigen Transkripten liegt aber möglicherweise auch daran, daß starke Gelbanden leichter erkannt und reamplifiziert werden und Amplifikate seltener Transkripte unter der Nachweisgrenze liegen, bzw. im Hintergrundrauschen untergehen. Mit einer relativ hohen Stringenz der PCR-Bedingungen wie dem PCR- Start bei hoher Temperatur, der optimierten Deoxynukleotid-Konzentration und der relativ hohen Anheftungstemperatur, sollte dieser Tendenz entgegengewirkt werden. Eine Verbesserung wurde durch die Verwendung längerer Primer erzielt, die beim ersten PCR-Zyklus bei niedriger Anheftungstemperatur (40°C) und reduzierter Spezifität relativ häufig binden durften - mit der 3'-Sequenz von acht oder mehr Basen - , und dann bei stringenten Bedingungen nur noch ihre eigene komplementäre Sequenz in voller 20mer-Länge binden konnten, wodurch dann ausschließlich die zuvor begonnenen Fragmente weiteramplifiziert wurden. Daß der Primer in seiner vollen Länge eine komplementäre Sequenz in der humanen cDNA-Population findet, ist bei der Verwendung von Erkennungssequenzen für Restriktionsendonukleasen in Kombination mit willkürlichen Basenreihungen äußerst

unwahrscheinlich. Bei der Überprüfung der verwendeten Primer mit dem *BLAST*-Programm, das die eingegebene Sequenz mit allen in Datenbanken gespeicherten Nukleinsäuresequenzen vergleicht, wurde keine Übereinstimmung gefunden, was jedoch nicht ausschließen kann, daß es eine solche mit bislang noch nicht sequenzierten Genabschnitten gibt.

Im Widerspruch zu theoretischen Erwägungen, die eine exakte 3'-Basenpaarung fordern, zeigt die Analyse der von den Primern in den jeweiligen Genen gebundenen Sequenzen, daß eine Bindung und Extension durch *Taq* Polymerase auch noch an einem 3'-Ende stattfinden kann, bei dem die letzten beiden Basen in ihrer Reihenfolge vertauscht (at statt ta), oder durch andere Basen ersetzt sind (gc statt ta). Daß an den fraglichen Stellen tatsächlich Mutationen vorliegen ist äußerst unwahrscheinlich, aber nur nach Sequenzierung der entsprechenden Abschnitte zweifelsfrei auszuschließen. Dies würde aber über Aufgabe und Zweck dieser Arbeit hinausgehen. Eine mögliche Degradierung des Primer, dem die letzten beiden 3'-Basen fehlen und der mit diesem verkürzten 3'-Ende spezifisch bindet, wäre in diesem Zusammenhang noch zu diskutieren. Allerdings hätte diese Verkürzung des Primer zu einer schlechteren Bindung an die komplementäre Sequenz unter Hot Start Bedingungen, und damit zum Ausfall der Bande führen müssen.

Internes Priming unter niedrigstringenten PCR-Bedingungen

Es ist immer wieder zu beobachten, daß eine sauber aus dem Polyacrylamidgel geschnittene größere Bande, bei der Reamplifikation zusätzlich eine kleinere Bande hervorruft, die schon auf dem originalen ddRT-PCR-Gel sichtbar, und immer mit der Größeren koamplifiziert war. Vermutlich ist dieses Phänomen durch internes Anheften und Starten der PCR-Reaktion durch den Zufallsprimer AP in der Sequenz des größeren Fragments verursacht. In einer ansequenzierten Stichprobe hat sich dies bestätigt. Das kleinere Fragment entsprach einer Teilsequenz des größeren Amplifikats. Durch Optimierung der dNTP-Konzentration ließ sich die Anzahl der Banden reduzieren und damit die unerwünschte Redundanz vermeiden. Möglicherweise ist dabei die Mg^{2+} Konzentration der kritische Faktor, denn die freie Verfügbarkeit von bivalenten Kationen ist wegen der Chelatbindung durch Desoxyribonukleotide von deren Konzentration abhängig (siehe auch Kidd und Ruano 1995).

DNase-Behandlung der RNA-Lösung

Der initiale Versuch die *Differential Display* RT-PCR ohne DNase-Behandlung der RNA in der Annahme durchzuführen, daß die Anreicherung der RNA bei der RNA-Isolierung ausreichen müsste, um Amplifikate von eventuellen Spuren genomischer DNA unter die Nachweisgrenze zu drücken, hat zu einer relativ hohen Rate repetitiver Sequenzen wie *Alu*- und *LINE 1/2-Repeats* geführt. Die Behandlung der isolierten RNA mit RNase-freier DNase ist also erforderlich. Selbst nach dieser Maßnahme stellte sich in einem Fall das reamplifizierte, differentielle Fragment als repetitive Sequenz genomischer DNA heraus, die entweder nicht vollständig abgebaut, oder aber durch nachträgliche Kontamination noch vor der Amplifikation in die Probe gelangt war.

Allerdings besteht auch die Möglichkeit, daß die Amplifikation repetitiver Sequenzen auf Introns von Primärtranskripten (hnRNA), also noch ungespleißter Vor-Boten-RNA, die *Alu*-Wiederholungen enthalten können, zurückzuführen ist. *Alu*-Wiederholungen enthalten außerdem vor ihrer 3'-Direktwiederholungssequenz (Direct Repeat) einen Abschnitt aus Adeninnukleotiden, der für die Oligo(dT)-Primerbindung verantwortlich sein könnte (Darnell et al. 1990). *Alu*- und *LINE* (Long Interspersed Elements) Wiederholungen zählen zu den nichtviralen Retroposons, Transposons mit RNA als Zwischenstadium, die vor ihrer Insertion in chromosomale DNA-Sequenzen reverse transkribiert werden muß. Sie machen 10 bis 20 Prozent des menschlichen Genoms aus und haben vermutlich eine Bedeutung bei der Evolution und der Genexpression, da sie auch als Enhancer wirken können bzw. Proteinbindungssequenzen mitschleppen können. Die *Alu*-Wiederholungssequenzen werden auch durch RNA-Polymerase III transkribiert und tauchen als relativ instabile 200 bis 400 Nukleotide lange RNAs auf. Diese zeigen eine starke Verwandtschaft mit der 7SL RNA. Diese ist Bestandteil der Signalerkennungspartikel, die bei der Sekretion neugebildeter Polypeptide durch die Membran des Endoplasmatischen Retikulum (ER) helfen. In diesem Fall, wenn die Amplifikation dieser Wiederholungssequenzen nicht auf Verunreinigung mit Spuren genomischer DNA, sondern auf Transkripte, die solche Repeats wie *Alu* oder *LINE* enthalten, zurückzuführen sind, dann könnte die Isolierung zytoplasmatischer RNA nach Sedimentierung der Zellkerne, anstatt der Verwendung der Gesamt-RNA, eine Lösung des Problems sein. Zytoplasmatische RNA enthält keine Introns - Primärtranskripte verlassen nicht den Zellkern - , und transkribierte *Alu*-Wiederholungssequenzen sind nicht stabil, werden also im Zellkern bereits abgebaut. Der Einsatz von oligo(dT)-affinitätsgereinigter

polyadenylierter RNA (überwiegend mRNA) in die *Differential Display* RT-PCR hat jedoch bei Liang und Pardee (1992) zur Erhöhung des unerwünschten Hintergrundes geführt.

Daß nicht nur polyadenylierte RNA bei der ddRT-PCR erfaßt wird, zeigen die Beispiele ribosomaler RNAs, die normalerweise nicht polyadenyliert sind (Baserga et al. 1985), und des HMG (High Mobility Group) Proteins, bei dessen mRNA die Oligo(dT)-Primer an einen internen Abschnitt von sieben Adeninnukleotiden gebunden hat. Auch die Bindung eines Zufallsprimers AP an Sinn- *und* Gegensinnstrang in amplifizierbarer Distanz und Ausrichtung ist möglich und tritt hin und wieder auf.

4.3 Direktsequenzierung mit den kurzen 10-mer *Differential Display*-Primer-Oligonukleotiden

Nach dem Standardprotokoll des "ABI PRISM BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit", ist die Sequenzierung mit den 10-mer Primern - nur die Anheftungstemperatur war wegen der kürzeren Primer auf 38°C gesenkt worden - nicht gelungen. Dies führte zu der Arbeitshypothese, wonach die Punktmutation im aktiven Zentrum der verwendeten speziellen Sequenzier-*Taq* Polymerase zwar einen besseren Einbau der Dideoxynukleotide erlaubt, aber zu einer Verschlechterung der Polymeraseaktivität führt. Die Vorstellung war, daß bei der niedrigen Anheftungstemperatur die Polymeraseaktivität noch zu gering ist, um die Primer zu verlängern, und daß der schnelle Anstieg auf die Synthesetemperatur zum vorzeitigen Ablösen der Primer führt. Würde aber die Temperatur nur langsam ansteigen, bliebe der durch die Punktmutation in ihrer Aktivität verschlechterten Polymerase genügend Zeit, die Primer in einer Geschwindigkeit zu verlängern, die mit dem Anstieg der Temperatur proportional ist, um so eine stabile Bindung an die Matrize zu gewährleisten. Ein langsamer Anstieg der Temperatur von 38°C auf 60°C mit einer Steigung von 0,2°C/min erlaubte schließlich die direkte Sequenzierung auch mit den 10mer-Zufallsprimern, wodurch die Arbeitshypothese bestätigt wurde.

Das oben beschriebene interne Anheften könnte das Phänomen der Sequenzüberlagerungen bei einigen differentiellen PCR-Amplifikaten erklären. Die 10 Basenpaare langen Primer der ddRT-PCR sind in diesen Fällen ungeeignet, und ein Klonierungsschritt oder die Ligation von doppelsträngigen Oligonukleotid-Linkern an das PCR-Produkt ist notwendig, um dann mit längeren Primern, die zu Plasmid- bzw. Linkersequenzen komplementär sind, eine saubere Sequenzierung zu erreichen. Längere

Primer, in Verbindung mit einer höheren Anheftungstemperatur, reduzieren die Wahrscheinlichkeit, daß sekundäre Hybridisierungsstellen auf der zu sequenzierenden DNA liegen. Die Sequenzierung eines geklonten PCR-Fragmentes birgt die Gefahr, daß wegen der - im Vergleich zu anderen DNA-Polymerasen - höheren Fehlerrate durch die bei der PCR eingesetzten *Taq*-Polymerase auch die resultierende Sequenz fehlerhaft ist. Es wäre daher die Linker-vermittelte Direktsequenzierung der Amplifikate vorzuziehen, da hierbei die Lesefehler der *Taq*-Polymerase überdeckt werden. Für den hier verfolgten Zweck der Identifizierung von Sequenzen mit bekannten Genen (hier waren es die Uroplakine), reicht die Genauigkeit der Sequenzierung von klonierten PCR-Produkten aber aus.

4.4 Durch die ddRT-PCR differentiell dargestellte Transkripte

4.4.1 Ferritin, *schwere Kette*

Die bei der ddRT-PCR gefundene differentielle Darstellung von *Ferritin* hat zunächst überrascht und konnte mit einer konventionellen Ferritin-spezifischen RT-PCR auch nicht bestätigt werden. Dennoch soll hier auf Befunde anderer Autoren eingegangen werden, die dem Ferritin onkologische Bedeutung beimessen. Higgy et al. (1997) haben bei Brustkrebs eine erhöhte Ferritinmenge gefunden und diskutieren, daß schnell proliferierende Zellen wie maligne Krebszellen einen höheren Bedarf an Eisen und somit am Eisenspeicherprotein Ferritin haben. Ihre Vermutung, wonach eine erhöhte intrazelluläre Eisenkonzentration durch Bildung freier Radikale Mutationen auslösen, und dadurch einen wesentlichen Beitrag zur Karzinogenese leisten könnte, wobei die Hochregulierung der Ferritintranskription eine primäre Ursache darstellen würde, ist interessant, aber in Ermangelung entsprechender Daten bei anderen Tumoren noch unausgereifte Spekulation. Man könnte auch umgekehrt argumentieren, daß der hohe Transferringehalt durch hohe Eisenbindungskapazität die Zelle vor freiem Eisen, und damit vor der Bildung freier Radikale schützt. Der Nachweis, daß eine erhöhte Transkription des Ferritins zu den ersten Ereignissen bei der Krebsentstehung gehört, steht noch aus.

In einem Ratten Progressionsmodell, das phänotypisch und zytogenetisch humanem oberflächlichem Blasenkrebs ähnlich ist, haben Vet et al. 1997 durch differentielle Hybridisierungsanalyse eine Überexpression von *Ferritin H* (schwere Kette) in der

Tumorlinie mit geringerer metastatischer Kapazität und besser differenziertem Phänotyp gefunden. In der vorliegenden Studie wurde Ferritin besonders stark von mesothelialen Zellen des Tumorstroma gebildet.

Migliari et al. 1991 haben erniedrigte Ferritinkonzentrationen in Serum- und Urinproben von 20 Patienten mit Urothelkarzinomen im Vergleich zu 20 gesunden Probanden gemessen. Es bestanden statistisch signifikante Unterschiede bei den Mittelwerten von Serum- und Urin-Ferritinkonzentrationen. Die individuellen Werte streuten allerdings sehr stark, sodaß der Schlußfolgerung der Autoren, die Ferritinbestimmung, besonders im Urin, könne ein interessanter Tumormarker für Blasenkrebs werden, nicht vorbehaltlos zugestimmt werden kann.

Im Gegensatz hierzu fand eine chinesische Studie erhöhte Urin-Ferritinkonzentrationen bei allen (7) Patienten mit Nierenbeckenkarzinom, 4 von 13 Patienten mit Nierenzellkarzinom, 1 von 13 Patienten mit gut differenziertem (G1) Harnblasenkarzinom, 8 von 19 Patienten mit G2 Blasenkarzinom und bei allen 5 Patienten mit wenig differenziertem (G3 und 4) Blasenkarzinom (Tang et al. 1989). 96 gesunde Erwachsene dienten als Vergleichsgruppe. Die Autoren schlossen, daß ein Urin-Ferritintest bei der Unterscheidung zwischen gut und schlecht differenzierten Harnblasenkarzinomen, sowie zwischen Nierenbecken- und Nierenzellkarzinomen hilfreich sei.

4.4.2 Mitochondriale 12S ribosomale RNA

Die Sequenzierung eines differentiellen Fragmentes ergab einen Teil der 12S mitochondrialen ribosomalen RNA. Dies könnte man für ein Artefakt halten, da laut Lehrbuchmeinung ribosomale RNAs im Unterschied zu proteinkodierenden Transkripten nicht polyadenyliert würden (S.283 in: Darnell et al. 1990), wenn nicht Baserga et al. bereits 1985 berichteten, daß bei der reversen Transkription mit Oligo-Desoxythymidylat auch mitochondriale ribosomale RNA kopiert wird. Da viele der schnell proliferierenden Krebszellen eine erhöhte Anzahl von Mitochondrien beherbergen und diese möglicherweise aktiver ihre Gene transkribieren, könnte die differentielle Darstellung von mitochondrialer rRNA durchaus den realen Verhältnissen entsprechen. Allerdings ist dies als ein die Krebsentstehung begleitendes, nicht aber ursächliches Phänomen zu betrachten.

4.4.3 High mobility group Protein HMG-1

HMG Proteine sind Kernproteine, die drei DNA-Bindungsdomänen (AT-Haken) und einen stark sauren C-Terminus enthalten (Baxevanis und Landsman 1995). *HMGI* und *HMGY* sind Translationsprodukte alternativ gespleißter mRNAs des *HMGI*-Gens. Das *HMGI-C* Protein ist das Produkt eines zweiten Gens. Die drei AT Haken genannten Oktapeptide, sind mit ihrer konservierten RGR Sequenz (Arginin-Glycin-Arginin) für die Bindung des Proteins an die kleine Furche der DNA Doppelhelix von AT-Bereichen verantwortlich. Eine hochaffine Bindung entsteht dort, wo auf der DNA zwei oder drei AT Abschnitte in geeignetem Abstand vorhanden sind, um die multivalente Bindung der drei Bindungsmotive an dasselbe DNA-Molekül zu gewährleisten (Landsman und Bustin 1993). Phosphorylierungsstellen flankieren das zweite DNA-Bindungsmotiv und im Falle von *HMGI-C* werden diese Serine durch Cyclin/Cdk (Cyclin Dependent Kinase) zu Beginn der S-Phase und in der G2/M Phase des Zellzyklus phosphoryliert. Die Funktion dieser Phosphorylierungen ist nicht bekannt, aber die Ähnlichkeit der basischen Motive mit nukleären Lokalisationssignalen auf anderen Kernproteinen läßt vermuten, daß sie den nukleären Import regeln könnten. Die Inaktivierung des *HMGI-C* Gens in der Maus führt zu einem pygmischen Phänotyp mit einer starken Reduktion des Fettgewebes und zu Fibroblasten, die *in vitro* langsamer proliferieren als Wildtypfibroblasten. Das *HMGI-C* Gen wird in der Maus-Embryogenese in den meisten Geweben, mit Ausnahme des Gehirns, exprimiert. Nach 15 Tagen Embryonalentwicklung wird das Gen abgeschaltet, und in adulten Geweben kann kein Transkript nachgewiesen werden. Das Protein wurde in einigen Nager- und Humantumoren, hauptsächlich Sarkome und Karzinome, entdeckt, nicht aber in Leukämien. Eine starke Expression wurde in Schilddrüsentumoren, kolorektalen Karzinomen, sowie in Brust- und Prostatakrebs gefunden. Die ektope Expression eines embryonalen Proteins in adulten Tumoren läßt darauf schließen, daß *HMGI-C* eine Rolle als Onkogen spielen könnte, was seiner Funktion bei der Kontrolle des Zellwachstums im Embryo entspräche. In Lipomen war das *HMGI-C* Gen Ziel chromosomaler Translokationen, die zu ektope Expression und zu Fusionsproteinen führten, denen zwar die C-terminale saure Domäne fehlte, die drei DNA-Bindungsdomänen aber erhalten blieben. Das *HMGI-C* Protein war bei einer großen Zahl benignen humaner Tumoren mesenchymaler Herkunft an der Zelltransformation beteiligt. Während das translozierte *HMGI-C* Gen hauptsächlich mit gutartigen Tumoren assoziiert war, wurde bei einer großen Zahl von Sarkomen eine Amplifikation der Region q13-15

des Chromosoms 12 beschrieben. Bei 13 von 122 Sarkomen war das *HMGI-C* Gen amplifiziert. Acht dieser Proben waren Liposarkome, was die Bedeutung des Gens beim Zellwachstum von Adipozyten unterstreicht. Ein *HMGI-C* Gegensinn-Expressionsvektor inhibierte die Zelltransformation durch onkogene Retroviren, was nahelegt *HMGI* als Onkogen zu klassifizieren.

Eine erhöhte *HMG-1* mRNA Expression (0,71 vs. 0,48 im Northern Blot) im Vergleich zu den entsprechenden Normalgeweben wurde bei 33 gastrointestinalen Adenokarzinomen gefunden, nachdem bei einem differentiellen Durchsuchen (Screening) der cDNA Bibliothek einer gut differenzierten Magenkarzinomzelllinie der cDNA Klon FM1 sequenziert und als humanes *HMG-1* identifiziert wurde (die abgeleitete Aminosäuresequenz zeigte an drei Stellen substituierte Aminosäurereste: Arg durch Gly in Position 11; Gln durch Ala in Position 149 und Gly durch Asp in Position 190 (Xiang et al. 1997)). Weil sich die Autoren daher nicht sicher waren, ob die Identität mit *HMG-1* damit gesichert war, blieben sie bei der Bezeichnung FM-1 für ihren Klon). Interessanterweise exprimierten bei den fortgeschritteneren Tumorstadien und bei den mäßig bis wenig differenzierten Tumoren die angrenzenden Gewebe ebenfalls *HMG-1*, im Gegensatz zu den benachbarten Geweben von gut differenzierten gastrointestinalen Tumoren, wie die *in situ* Hybridisierung mit FM-1 Gegenstrang-RNA (antisense) zeigte. Die Stärke der FM1-Expression in den korrespondierenden Nicht-Krebsgeweben korrelierte mit der Entdifferenzierung und Invasionstiefe der Krebszellen. In der vorliegenden Arbeit konnte mit einer konventionellen semiquantitativen RT-PCR nur bei einem Urothelkarzinom eine erhöhte Expression von *HMG-1* im Vergleich zum normalen Urothel desselben Patienten gezeigt werden.

HMG-1 verstärkt die sequenzspezifische DNA-Bindung von Progesteron-, Östrogen-, Androgen- und Glukokortikoidrezeptor *in vitro*, hat aber keinen Einfluß auf die Aktivität von Nicht-Steroid-Kernrezeptoren, wie Retinsäure- und Vitamin D-Rezeptor (Oñate 1994; Boonyaratanakornkit 1998). *HMG-1* und -2 binden nicht selbst an das *Progesteron-Response-Element*, eine spezifische Palindromstruktur bestimmter Sequenz auf der DNA, sind aber Bestandteil eines *HMG*-Progesteronrezeptor-DNA-Ternär-Komplexes. Mit dem Progesteronrezeptor, nicht aber mit dem Vitamin D Rezeptor, gehen *HMG-1* und -2 eine schwache Bindung in Abwesenheit von DNA ein. Diese Daten legen nahe, daß die kombinierte Wirkung von nicht-sequenzspezifischer DNA-Bindung und -Biegung durch die *HMG* Proteine und sequenzspezifischer DNA-Bindung durch Steroidhormonrezeptoren an das jeweilige *HRE* (*Hormone Responsive Element*) zur Verstärkung der

Transkription von Zielgenen führt. Die Autoren kommen zu der Schlußfolgerung, daß *HMG-1/-2* koregulatorische Proteine sind, die die DNA-Bindung und transkriptionale Aktivität von Steroidhormonrezeptoren erhöhen (siehe auch Zlatanova und van Holde 1998).

Jayaraman et al. (1998) identifizierten einen *p53* DNA Bindung aktivierenden Faktor aus Kernextrakten von *HeLa* Zellen als *HMG-1*. Ebenso konnte *HMG-2* die Bindung von *p53* Protein an die spezifische *p53* Bindungsstelle (Responsive Site) auf der DNA um den Faktor 10 bis 50 verstärken, wie in *Electrophoretic Mobility Shift Assays* gezeigt wurde. Im Gegensatz zu anderen Faktoren, die über eine Aufhebung der Autoinhibition durch das basische Carboxyl-Ende von *p53* die sequenzspezifische DNA-Bindung verstärken, übt *HMG-1* seine Wirkung auch auf die DNA-Bindung einer konstitutiv aktiven Form von *p53* aus, bei der diese regulatorische Region deletiert ist.

Weitere DNA-bindende Proteine, deren sequenzspezifische Bindung durch *HMG-1* verstärkt wird, sind der Östrogen-Rezeptor (Verrier et al. 1997), *HOX* Proteine (Zappavigna et al. 1996), und die *POU* Domäne enthaltenden Proteine *Oct 1*, *Oct 2*, und *Oct 6* (Zwilling et al. 1995). Desweiteren wird die spezifische Transkription durch RNA Polymerase II und III *in vitro* erhöht (Tremethick und Molloy 1986).

Kawahara et al. (1996) fanden in chirurgisch entfernten hepatozellulären Karzinomen von 20 Patienten eine Ko-Überexpression von *Thioredoxin* und *HMG-1* in beinahe allen Krebsläsionen im Vergleich zu normalem Gewebe.

Passalacqua et al. (1997) zeigten, daß die Sekretion und Bindung von *HMG1* Protein an die externe Zellmembranoberfläche für die Mäuse-Erythroleukämiezellendifferenzierung erforderlich ist.

HMG-1 und *-2* Proteine zeigten eine hohe Bindungsaffinität für cisplatin-geschädigte DNA, die mit dem Grad der Schädigung durch Cisplatin, einem in der Krebstherapie häufig applizierten Zytostatikum, korrelierte (Hughes et al. 1992; Turchi et al. 1996; Zlatanova et al. 1998). Dabei gehen das Lysin 6 der *HMG1* Box und das Platinatom selbst die Verbindung ein (Kane und Lippard 1996).

Daß das *HMG-1*-Transkript bei der ddRT-PCR gefunden wurde, könnte ein erster Hinweis sein, daß dieses Gen auch bei Urothelkarzinomen eine Rolle spielt. Bestätigt wurde die differentielle Expression nur für *ein* autologes Tumor-Urothel-Paar. Weitere Untersuchungen an Harnblasentumoren sollten die Frage klären, ob dem *HMG-1* bei Entstehung oder Progression des Urothelkarzinoms eine Bedeutung zukommt. Bustin und Reeves (1996) geben einen guten Überblick über die High Mobility Group Proteine.

4.4.4 CAPL/S-100-related Calcium-binding Protein, p9Ka, mts1 Gen

p9Ka wurde zuerst als Polypeptid entdeckt, das kultivierte Milchdrüsenepithelzellen der Ratte bilden, wenn sie sich in einen elongierten myoepithelartigen Zelltyp verwandeln. Die Erhöhung des *p9Ka* und seiner mRNA begleitet auch die durch den Nervenwachstumsfaktor (NGF) induzierte Differenzierung von *PC12* Phäochromozytomzellen der Ratte, die seruminduzierte Erhöhung der Wachstumsrate von murinen Fibroblasten in Kultur, und die onkogen- oder karzinogeninduzierte Transformation muriner Fibroblasten oder Rattennierenzellen. Auch wurde in einer metastasierenden Milchdrüsenepithelzelllinie der Ratte im Vergleich zu ihren nichtmetastasierenden Gegenstücken aus benignen Tumoren oder normalen Rattenmilchdrüsen erhöhte Werte für *p9Ka* und seine mRNA gefunden. In einer Serie engverwandter muriner Milchdrüsenepithel-Adenokarzinomzelllinien, die sich in ihrem Ausbreitungspotential in die Lungen von Empfängermäusen nach intramuskulärer Injektion unterschieden, gab es eine quantitative Korrelation zwischen metastatischem Potential und der Höhe der *p9Ka* mRNA Expression. Die Transfektion der benignen Tumorzelllinie Rama 37 mit 10 bis 100 Kopien des klonierten Ratten-*p9Ka*-Gens verlieh dieser Zelllinie metastatische Eigenschaften: Die Tumorzinzidenz stieg nach Injektion in Milchdrüsenfettpolster von Empfängerratten von 50% bei nichttransfizierten benignen Rama 37 Zellen auf nahezu 100% bei den Transfizierten. Die Latenzzeit der Tumorentstehung verringerte sich, und in mehr als 50% der Tiere breiteten sich die Tumoren in Lungen und Lymphknoten aus. In den *p9Ka*-transfizierten Brustdrüsenzellen, die aus Lungen- und Lymphknotenmetastasen isoliert und kultiviert wurden, blieb der metastatische Phänotyp stabil und zeigte die gleiche Metastasehäufigkeit nach Reinjektion in Milchdrüsenfettpolster wie bei den primären Transfektanten.

p9Ka zeigt 27% Übereinstimmung der Aminosäuresequenz mit dem Vitamin D-abhängigen intestinalen Kalzium-bindenden Protein der Ratte, mehr als 40% Übereinstimmung mit den Vertretern der S-100 Familie *EF*-Hand enthaltender Proteine und dem wachstumsregulierten *Calcyclin*, und 32% Entsprechung mit p11, der kleinen Untereinheit von *Annexin II*. Wie diese Proteine enthält *p9Ka* zwei potentielle *EF*-Hand Kalziumbindungsstellen und bindet zwei Kalziumionen mit moderater Affinität (K_d 34 bis 38 mM für das rekombinante *p9Ka*). *EF*-Hände bestehen aus einer Helix-Schleife-Helix-

Einheit (bei *Paralbumin*, einem 12 kDa Protein aus Karpfenmuskel, an dem diese Struktur zuerst gezeigt wurde, sind dies die E- und die F-Helix, die wie Zeigefinger und Daumen einer Hand angeordnet sind: Daher stammt der Name EF-Hand) und binden in der Schleife ein Kalziumion durch oktaedrische Koordination mit sechs Carboxylatsauerstoffatomen von drei Aspartat- und drei Glutamatresten, mit einem Carbonylsauerstoff der Hauptkette und dem Sauerstoff eines gebundenen Wassermoleküls (Kretsinger 1976). Immunhistochemische Lokalisierung zeigt eine strukturelle Assoziation mit dem Aktinzytoskelett, wie die identischen Färbemuster mit Anti-p9Ka-Serum und dem aktinfilamentbindenden Phalloidin zeigen. Als kalziumbindendes Protein, das mit dem Aktinfilament-Zellskelett verbunden ist und einen metastatischen Phänotyp induzieren kann, könnte *p9Ka* an der Regulation der Zellmotilität beteiligt sein.

Das humane *p9Ka* Gen ist auf Chromosom 1 in der q21 Region lokalisiert, die eine fragile Stelle enthält. Bei Brustkrebs sind die häufigsten zytogenetischen Veränderungen Abnormalitäten im Chromosom 1, wie Überrepräsentation des gesamten Chromosoms und Translokationen von Chromosom 1-Fragmenten, was beides zu einer Expression betroffener Gene führen könnte. Einige Zelllinien metastatischer Mammakarzinome exprimieren *p9Ka* mRNA stärker als epitheliale Zellen aus der Brustdrüse, die mit SV-40 Virus immortalisiert wurden, oder aus gutartigen humanen Brustdrüsenläsionen stammten.

Die eigene Untersuchung spricht nicht für eine Beteiligung des *mts-1*-Genproduktes an der Metastasierung. Das Transkript wird auch von nicht-metastasierenden Urothelkarzinomen und Normalurothel gebildet. Allerdings liegen keine Informationen über den weiteren Krankheitsverlauf vor, sodaß nicht auszuschließen ist, daß einige der Patienten noch ein metastasebildendes Stadium erreicht haben.

4.4.5 Weitere differentielle Transkripte

Die differentielle Expression der *Nuclear Dual-Specific Phosphatase* und der *Bruton's Tyrosinkinase* (BTK) konnte nicht gesichert werden. Bei *E-Cadherin* und den *Cateninen*, sowie bei den *Zytokeratinen* wurden keine neuen Erkenntnisse bezüglich ihrer Expression in Urothelkarzinomen hinzugewonnen. Es sei deshalb auf die Darstellung in der Einleitung und die dort angegebene Literatur verwiesen. Beim *Mal* Transkript konnte keine Korrelation zum urothelialen Differenzierungsgrad festgestellt werden, wie dies Liebert et al. 1997 *in vitro* beschrieben haben.

Die relativ hohe Übereinstimmung der abgeleiteten Aminosäuresequenz eines der drei gefundenen möglichen Leserastern (ORF: Open Reading Frame) bei der „unbekannten“ differentiell dargestellten Sequenz *S21* mit dem *Methyl-Accepting Chemotaxis Protein* und dem *Serin-Chemorezeptorprotein* von *Escherichia coli*, nicht aber bei der Nukleinsäuresequenz, lassen es als Möglichkeit erscheinen, daß es sich um ein konvergentes Gen handelt, dessen Genprodukt eine strukturelle und funktionelle Homologie aufweist. Es ist denkbar, daß eine bakterielle Besiedlung der Harnblase eines Urothelkarzinompatienten zu diesem ddRT-PCR-Resultat geführt hat. Andererseits könnte es noch unbekannte humane Gene geben, deren Proteinprodukte eine solche Übereinstimmung mit bakteriellen Rezeptormolekülen aufweisen. Als Beispiel sei hier die Sequenzhomologie von Glutamatrezeptoren im menschlichen Gehirn mit bakteriellen aminosäurebindenden Chemorezeptoren genannt, die als Modellmoleküle zur Strukturaufklärung dieser medizinisch wichtigen Rezeptoren herangezogen werden.

4.5 Untersuchung der differentiellen Expression verschiedener bekannter Gene mittels semiquantitativer RT-PCR

Da die semiquantitative RT-PCR keine widerspruchsfreien Ergebnisse erbrachte, wird hier auf eine detaillierte Diskussion verzichtet. Der Grund für die geringe Reproduzierbarkeit der differentiellen Expressionsmuster von Urothelkarzinomen verschiedener pathologischer Grade und Stadien im Vergleich zu morphologisch unverändertem Urothel liegt möglicherweise an der relativ hohen Verdünnung der eingesetzten cDNAs (1 ng Gesamt-RNA kam je PCR-Reaktion zum Einsatz). Diese Verdünnung war erforderlich, weil die verfügbare Gewebemenge bei einzelnen Tumorproben äußerst gering war (25 bis 80 mg Naßgewicht). Dadurch war auch die RNA-Menge limitierend, wenn man mit einer Reihe Zufallsprimer (20 AP- x 4 Ankerprimer) in der ddRT-PCR, und mit einer konventionellen RT-PCR noch weitere Gene testen will. Das Volumen, in dem die RNA verdünnt wurde, sollte für 100 RT-PCR-Ansätze reichen. Somit könnte es besonders bei Transkripten, die in niedriger Kopienzahl je Zelle vorliegen, zu stochastischen Effekten gekommen sein. Dafür spricht die Beobachtung, daß die Schwankungen zwischen gleichen Versuchsansätzen nicht kontinuierlich zu sein scheinen, sondern in quantisierter Art und Weise auftraten. Dies ließe sich damit erklären, daß zufällig ein, zwei, drei oder aber kein Transkriptmolekül in den PCR-Ansatz gelangt

war. Außerdem war eine gute Reproduzierbarkeit bei der GAPDH gegeben, deren Transkript in hoher Kopienzahl je Zelle vorliegt. Eine weitere Erklärungsmöglichkeit wäre eine nicht auszuschließende langsame Degradation der cDNA und RNA trotz ihrer Aufbewahrung bei -80°C. Allerdings hätte dies auch zu Unregelmäßigkeiten bei der GAPDH RT-PCR führen müssen. Dies war aber nicht in dem Ausmaß der Fall, was eher für die erste Erklärung sprechen würde. Das Tumormaterial war teilweise äußerst limitiert. Einige Proben standen nur als transurethrale Resektate von 30 bis 50 mg Naßgewicht zur Verfügung. Es war somit nicht möglich, die Expression der vorgesehenen Anzahl von Genen mit den Standardmethoden *Northern Hybridisierung* oder *RNase-Protection Assay* zu quantifizieren. Daraus erklärt sich auch die eingesetzte Verdünnung der cDNAs. Da sich die Versuche auch nicht mehr mit frischem Gewebe - weil nicht mehr vorhanden - wiederholen lassen, kann keine abschließende Aussage über die Expressionsstärken der untersuchten Gene getroffen werden. Damit können diese auch nicht sinnvoll Gegenstand der Diskussion sein. Allerdings sei ausdrücklich darauf hingewiesen, daß, neben *mts1* und *HMG1*, besonders die unbekannt Sequenzen aus der ddRT-PCR eine Tendenz zu differentieller Expression gezeigt haben und in weiteren Untersuchungen in ihrer Bedeutung für das Urothelkarzinom evaluiert werden sollten.

DNA-Methyltransferasen

Am Auffälligsten, wenn auch nicht vollkommen konsistent, war die differentielle Expression der DNA-Methyltransferasen *Dnmt-1* und *-2*, wobei im Vergleich zum korrespondierenden Urothel die Expression im Urothelkarzinom in einigen Fällen stark erniedrigt war. Es ist also durchaus möglich, daß die Hypothese von Fearon und Vogelstein (1990), wonach eine Hypomethylierung der DNA ein erster Schritt der Karzinogenese darstellt, auf eine Untergruppe von Urothelkarzinomen zutrifft. Dies müßte in einer weiteren Studie an einer größeren Zahl von Urothelkarzinomen überprüft werden.

Telomerase

Im Gegensatz zu Nagern, die längere *Telomere* und *Telomerase*-Aktivität in somatischen Zellen besitzen, zeigen menschliche Körperzellen keine oder kaum Telomeraseaktivität. Dadurch verkürzen sich die *Telomere* mit jeder Zellteilung.

Aufgrund dieser Telomer-Erosion geraten die Zellen nach einer bestimmten zellartspezifischen Anzahl von Zellzyklen in den seneszenten Zustand. Ektopische Expression des *hTERT* Gens, das die katalytische Untereinheit des Enzyms kodiert, verhilft einigen, wennauch nicht allen, präseneszenten primären Zellen dazu, sich unbegrenzt teilen zu können und führt zur Überwindung der sogenannten "Krise", eine proliferative Barriere nach Eintreten der Seneszenz, die durch Zelltod charakterisiert ist. Beinahe alle Tumoren zeigen nachweisbare Telomeraseaktivität. Daher konnte erwartet werden, daß *Telomerase* zur tumorigenen Konversion humaner Zellen beiträgt. Hahn et al. (1999) konnten zeigen, daß die serielle Einführung von *hTERT* und dem onkogenen *H-ras*^{V12}-Allel in humane embryonale Nieren(*HEK*)zellen, die das *Large-T* Onkoprotein aus dem *Simian Virus 40* exprimieren, um Seneszenz zu überwinden, diese Zellen zur Tumorbildung befähigte. Auch brachten die Autoren *Large-T* und Kombinationen von *hTERT* und *H-ras*^{V12} in normale humane Fibroblasten. Es wurden dabei etwa 60 Zellverdopplungen erreicht. Zellen, die nur *hTERT* und *ras* exprimierten, konnten nicht weitervermehrt werden, da diese Kombination nicht die *ras*-induzierte Seneszenz verhinderte. Die Expression von *hTERT* führte zur Immortalisierung von Fibroblasten, die *Large-T* exprimierten. *Telomerase*-negative polyklonale und monoklonale Zellpopulationen, die nur *Large-T* und *ras* exprimierten, erfuhren die "Krise" bei Zellverdopplung, und es entstanden auch nach zweimonatiger Kultur keine spontanen immortalen Klone. Onkogenes *ras* führte zu morphologischer Transformation, hatte aber nur geringe Wirkung auf die Wachstumsrate in Monolayer von Fibroblasten, die *Large-T* und *hTERT* exprimierten. Verankerungsunabhängiges Wachstum wurde in Weichgarkultur getestet und war nur für Zellen positiv, die die Kombination *Large-T*, *ras* und *hTERT* exprimierten. In immundefizienten Nacktmäusen erzeugte auch nur diese Kombination Tumoren. Ohne *hTERT* kam es gelegentlich zu kleinen abortiven Klonen bei Expression von *ras* und *Large-T* allein. Dies reflektiert eine replikative Mortalität bei Abwesenheit von *Telomerase*-Aktivität. Daraus folgern die Autoren, daß diese drei genetischen Elemente ausreichen, um *HEK* Zellen und humanen Fibroblasten Tumorigenität zu verleihen, schließen aber nicht aus, daß noch weitere genetische Alterationen erforderlich sind. Da das virale Onkoprotein *Large-T* durch Bindung an die Tumorsuppressorproteine *pRB* und *p53*, die dadurch funktionell inaktiviert werden, in mindestens zwei Signaltransduktionswege eingreift, sind das mit den Wirkungen von *hTERT* und *ras* vier unabhängige biochemische Wege, die betroffen sind. Andere Autoren konnten mit *E6* und *E7* Proteinen des humanen Papillomavirus in Kombination mit *ras*

und *hTERT* keine in Weichagar wachsenden Fibroblastenkolonien erzeugen. Daher ist es wahrscheinlich, daß *Large-T* noch einen oder mehrere andere Wege betrifft.

Mit *Northern Hybridisierung* wurde von Avilion und Greider (1996) humane *Telomerase*-RNA (hTR) gemessen. Es wurde dabei auch in Zellen ohne *Telomerase*-Aktivität ein hohes Niveau an hTR gefunden. Die Gegenwart der hTR ist also kein Parameter der *Telomerase*aktivität. Diesem Befund entsprechen auch die eigenen Ergebnisse, die keine Korrelation der hTR Höhe mit Gewebeart oder Tumorgrad und -stadium zeigen.

Telomerverlängerung ist auch ohne nachweisbare *Telomerase*aktivität in immortalisierten humanen Zellen gefunden worden (Bryan und Reddel 1995). Von 35 immortalisierten Zelllinien hatten 20 *Telomerase*aktivität, bei 15 war eine solche nicht nachweisbar. Hybride zwischen telomerasenegativen und -positiven Zellen begingen Seneszenz. Zwei seneszente Hybride zeigten *Telomerase*aktivität, was zeigt, daß *Telomerase* nicht zur Zellimmortalisierung ausreicht, oder daß die *Telomerase*aktivität durch andere Faktoren in diesen Hybridzellen unterdrückt wurde. Dies ist angesichts der Erkenntnisse von Hahn et al. (siehe vorhergehende Seite) eher wahrscheinlich. Über einen alternativen Weg der Telomerverlängerung ist bislang nichts bekannt.

4.6 Ausblick

Uroplakine, die in der Literatur als urothelspezifische Proteine etabliert wurden, sind nach den eigenen Ergebnissen und weiteren Untersuchungen aus der eigenen Arbeitsgruppe im Urologischen Forschungslabor des Klinikum der Johann Wolfgang Goethe-Universität (Kaspar 1998) zumindest beim Menschen nicht auf das Urothel begrenzt. Auch Nierenparenchym und Nierentumoren sowie andere nicht-urotheliale Gewebe und Tumoren können *Uroplakin*-mRNA enthalten. Da Blut gesunder Menschen kein *Uroplakin* enthält, könnte der hier vorgestellte *Uroplakin*-RT-PCR Test dazu verwendet werden, bei Vorliegen eines Urothelkarzinom-Primärtumors Patientenblut auf die Präsenz von Tumorzellen zu testen. Aufgrund der hohen Nachweisempfindlichkeit, eine Zelle ist in 1 oder mehreren Milliliter Blut nachweisbar, könnten disseminierende Tumorzellen eines invasiven und damit potentiell Metastasen bildenden Stadiums sehr frühzeitig erkannt werden. Der Test könnte auch zeigen, ob durch operative Eingriffe Tumorzellen in die Blutbahn gelangen. Disseminierende Tumorzellen weisen auf ein

invasives Stadium hin, und sind möglicherweise fähig, Metastasen zu bilden. Desweiteren ließe sich mit der *Uroplakin*-RT-PCR der Therapieerfolg bei systemischer Behandlung eines metastasierenden Urothelkarzinoms überprüfen und bei der Nachfolgeuntersuchung eine Progressionskontrolle bei Tumorrezidiven oder minimalen Resterkrankungen (Minimal Residual Disease *MRD*) durchführen. Es ließe sich bei positiven Befunden theoretisch allerdings nicht ausschließen, daß auch andere *Uroplakine*-bildende Malignome beteiligt sein könnten. Praktisch ist dies jedoch auszuschließen, da Zellen normaler Epithelien bei intakter Basalmembran, extrazellulärer Matrix und ungestörten Zell-Zell-Verbindungen (besonders die durch *E-Cadherin* vermittelten) nicht in die Blutbahn gelangen dürften. Die *Uroplakine* sind als urotheliale Marker für fortgeschrittene Krebsstadien nur eingeschränkt verwertbar, da bei den stark entdifferenzierten Urothelkarzinomen (G3-4) nur etwa die Hälfte uroplakin-positiv ist. Da es aber keinen alternativen Marker mit einer entsprechend hohen Selektivität für urotheliale Zellen gibt, könnte der Einsatz der *Uroplakin*-RT-PCR insgesamt dennoch zu einer Verbesserung bei der Diagnose der Urothelkarzinome führen. Die frühzeitige Entdeckung disseminierender Tumorzellen könnte durch ein zeitigeres Einsetzen therapeutischer Maßnahmen zu einer besseren Prognose für die Patienten mit progredienten Urothelkarzinomen beitragen. In Kombination mit molekularen Markern für maligne transformierte Zellen, wie z.B. der *Telomerase* bzw. deren Enzymaktivität, oder Mikrosatelliten, die Deletionen wichtiger Genorte von bekannten Tumorsuppressorgenen zeigen (z.B. Chromosom 17 q für p53 oder 9p für ein noch unbekanntes Gen, eine bei der Mehrzahl der Urothelkarzinome aller Malignitätsgrade angetroffene Deletion), könnte der *Uroplakin*-Nachweis bei der Charakterisierung von Urothelkarzinomen nützlich sein.

Die *Differential Display* RT-PCR ist eine Methode mit großem Potential, aber leider auch mit dem Problem falsch-positiver Resultate und der Verschiebung hin zu häufigen Transkripten behaftet. Die Verwendung längerer Primer-Oligonukleotide (20-mer), die initial bei niedriger Temperatur relativ unspezifisch (wie 7-11-mer) binden dürfen, um dann in einer stringenten PCR auf die Bindung der eigenen komplementären Sequenz in voller Länge beschränkt zu werden, stellt eine wesentliche Verbesserung der Methode dar.

Der Einsatz von Primern, die von Konsenssequenzen homologer Regionen wichtiger Proteinfamilien abgeleitet sind, öffnet die Option, gezielt nach bekannten *und* unbekanntem Mitgliedern ausgesuchter Gen- bzw. Proteinfamilien zu suchen, die aufgrund ihrer Funktion mit Krebsentstehung und -progression in Zusammenhang stehen können. In der vorliegenden Arbeit wurden die src-Homologieregionen SH2 und SH3, sowie die SH2-Bindungssequenz

ausgewählt. Diese Methode ließe sich aber universell für jede Proteinfamilie sowie auch bei anderen Fragestellungen anwenden. In der Praxis zeigt sich, daß die Primerbindung trotz des Startes der PCR bei 94°C nicht so stringent sequenzspezifisch stattfindet, wie die Theorie es fordert, und daß auch Proteine durch ihre mRNA erfaßt werden, die nicht die gesuchte Homologieregion enthalten. Obwohl keines gefunden wurde ist nicht auszuschließen, daß wenn alle dargestellten differentiellen Fragmente ausgewertet werden, auch die entsprechenden Proteinfamilien repräsentiert werden.

Vielleicht zeigten sich dann auch solche Transkripte, deren Expression durch die Interaktion der verschiedenen Zelltypen in den Tumoren induziert werden, und die bei der Untersuchung isolierter Zellpopulationen *in vitro* nicht entdeckt würden, die aber wesentlich zum Phänotyp der Tumoren beitragen könnten.

Die Mikrodissektion einzelner Zellen aus Gewebeschnitten ist eine Technik, mit der sich die *in vivo* Expressionsverhältnisse in bestimmten Zelltypen untersuchen ließen (Emmert-Buck et al. 1996; Bonner et al. 1997). Ob Quantität und Qualität der daraus isolierten RNA für die *Differential Display* RT-PCR mit einer Reihe von Zufallsprimern ausreichen würde, müßte experimentell getestet werden.

Die funktionelle Bedeutung einer noch weiter zu untersuchenden differentiellen Expression des *mts1* und des *HMG1*-Gens, der DNA-Methyltransferasegene *dnmt1* und *2*, sowie der unbekanntenen Gene, die durch die ddRT-PCR-Proben *S7*, *S19* und *S21* repräsentiert werden, sollte in einer zukünftigen Studie mit größeren Patienten- bzw. Tumorzahlen und durch *in vitro* Transfektionsexperimente mit Sinn- oder Gegensinn-Konstrukten evaluiert werden.

Durch Instabilität des Genoms von Karzinomzellen entstehen Sekundärmutationen, die den Phänotyp der Tumorzellen, einschließlich ihres Verhaltens (Neigung zu Invasion und Metastasierung z.B.) entscheidend mitprägen können. Aber auch eine veränderte Genexpression ohne offensichtlich zugrundeliegende Mutation, z.B. durch Hypomethylierung der DNA infolge verringerter Bildung von DNA-Methyltransferasen (Fearon und Vogelstein 1990; siehe auch Biran et al. 1994), oder durch erhöhte Synthese der *High Mobility Group*-Proteine, kann den malignen Phänotyp mitbestimmen.

Wie die vorliegende Studie unterstreicht, sind Karzinome in ihren Expressionsmustern sehr individuell. Die meisten Forschungsansätze verfolgen aber das Ziel, den größten gemeinsamen Nenner bei einer bestimmten Entität, in unserem Fall den Urothelkarzinomen, zu finden, um eine möglichst einfache diagnostische oder therapeutische Methode entwickeln

und etablieren zu können, die der größtmöglichen Teilmenge entspricht, aber auch bedauerlicherweise einen Teil ausschließt.

Die Untersuchungen führen zur Erkenntnis, daß unter den Urothelkarzinomen weiter differenziert werden muß. Dem histologischen Erscheinungsbild von gut differenzierten, exophytisch wachsenden Tumoren mit relativ geringer Neigung zur Progression einerseits, und den meist entdifferenzierten und rasch progredierenden *in situ* Karzinomen andererseits, entsprechen Unterschiede in der Molekularpathologie. Bei Ersteren ist z.B. der Verlust der Heterozygotität von Chromosom 9 vorherrschend, während Letztere durch Deletion des Tumorsuppressorgenortes für *p53* gekennzeichnet sind. Diese beiden Urothelkarzinomgrundtypen könnten in einer *Differential Display*-RT-PCR (Liang und Pardee 1992), *Representational Difference Analysis* (RPA, Hubank und Schatz 1994; Lisitsyn et al. 1993) oder *Suppression Subtractive Hybridization* (SSH, Diatchenko et al. 1996) miteinander verglichen werden.

Eine neue Technik, mit der simultan die Expression tausender Gene analysiert werden kann, verwendet *Microarrays*. Gegenwärtig sind mehr als eine Millionen humaner *Expressed Sequence Tag* (EST, exprimierte Sequenzabschnitte) Sequenzen auf den Datenbanken verfügbar, die vielleicht 50-90% aller humanen Gene repräsentieren. Die cDNA *Microarray*-Technik nutzt diese vielfältige Information zur Analyse der Genexpression. Bei dieser Methode werden DNA Proben, die cDNA Klone repräsentieren, auf einer Oberfläche (Nylonmembran, Glasobjektträger, Mikrochip etc.) angeordnet und mit fluoreszenzmarkierten Ziel-cDNAs hybridisiert. So kann eine Expressionsanalyse für mehrere tausend Gene gleichzeitig durchgeführt werden (Einen aktuellen Überblick geben Khan et al. 1999). Als Beispiel für die Anwendung dieser Technik soll die Arbeit von Moch et al. dienen.

In der Absicht, Gene mit Bedeutung für Nierenzellkarzinome zu identifizieren, wurde zuerst eine cDNA Array Analyse mit 5184 cDNA Klonen auf einem Filter durchgeführt, um Gene mit differentieller Expression zwischen der Nierenkrebszelllinie *CRL-1933* und normalen Nierengeweben zu finden (Moch et al. 1999). Es wurden 89 differentiell exprimierte Gene in der Krebszelllinie gefunden, u.a. für das zytoplasmatische Intermediärfilament *Vimentin*. In einem zweiten Schritt wurde eine Nierenkrebsgewebe-Mikroanordnung (*Microarray*), die 532 Nierenzellkarzinomgewebeproben enthielt, benutzt, um die *Vimentin*-Expression durch Immunohistochemie zu bestimmen. Die *Vimentin*-Expression war signifikant mit einer schlechten Prognose für den Patienten verbunden, unabhängig von Tumorgrad und -stadium (Moch et al. 1999).

Yang et al. (1999) kombinierten die Techniken der cDNA *Microarrays* mit der *Suppression Subtractive Hybridization (SSH)*. Eine Reihe cDNA Klone einschließlich 332 *SSH* Fragmente wurden durch PCR amplifiziert und mithilfe eines automatisierten Druckverfahrens auf einem Träger angeordnet. Die cDNA Arrays wurden mit fluoreszenzmarkierten Proben hybridisiert, die von RNA aus ER-positiven (*MCF7* and *T47D*) und ER-negativen (*MDA-MB-231* und *HBL-100*) Brustkrebszelllinien hergestellt wurden. Zehn um mindestens den Faktor 5 überexprimierte Klone wurden in den ER-positiven Zelllinien identifiziert. Eine *Northern Blot Analyse* bestätigte die Überexpression dieser 10 cDNAs. Durch Sequenzierung wurden vier dieser Klone als *Zytokeratin 19*, *GATA-3*, *CD24* und *Glutathion-S-Transferase mu-3* identifiziert. Vier Klone entsprachen *EST* Sequenzen von zwei verschiedenen Genen und zwei Klone erwiesen sich als neue Sequenzen.

Wenn in einigen Jahren das *Human Genome Project* abgeschlossen sein wird, kann wahrscheinlich mit der automatisierten und verfeinerten *Microarray*-Technik bei geringem cDNA-Probeninsatz simultan die Expression aller menschlicher Gene quantifiziert werden. Spätestens dann werden *Differential Display* RT-PCR bzw. *Representational Difference Analysis (RPA)* und substraktive Hybridisierungstechniken nicht mehr relevant sein. Die Analyse von Bedeutung und Funktion der mit der *Microarray*-Technik gefundenen hunderten von differentiell exprimierten Genen, z.B. bei Krebsentstehung und Tumorprogression, die Trennung der Spreu vom Weizen also, wird dann die größte Aufgabe und Herausforderung sein.

Um den komplexen Verhältnissen bei der differentiellen Genexpression von Tumorzellen im Vergleich zu den analogen Normalgeweben und der zyto- und molekulargenetischen Heterogenität der Malignome aus derselben Klasse – hier der Urothelkarzinome - gerecht zu werden, sollte die diagnostische Zukunft in einer möglichst differenzierten Charakterisierung eines individuellen Tumors bestehen, um so *jedem* Patienten die Aussicht auf eine maßgeschneiderte molekulare Therapie zu eröffnen.

5. LITERATURVERZEICHNIS

Agarwal A und Schatz DG (1997)

RAG1 and RAG2 form a stable postcleavage synaptic complex with DNA containing signal ends in V(D)J recombination.

Cell **89**: 43-53

Alper SL, Lodish HF (1991)

Impact of Molecular Biology on Nephrology, 1131-1133

In: Wilson JD, Braunwald E, Isselbacher KJ, Petersdorf RG, Martin JB, Fauci AS, Root RK (Hrsg):

Harrison's Principles of Internal Medicine

12. Aufl. McGraw-Hill, New York St. Louis San Francisco

Alroy J, Pauli BU, Weinstein RS (1981)

Correlation between numbers of desmosomes and the aggressiveness of transitional cell carcinoma in human urinary bladder.

Cancer **47**: 104-112

Ansamma J, Weiss GH, Jin L, Fuchs A, Chowdhury S, O'Shaughnessy P, Goldberg ID, Rosen EM (1995)

Expression of scatter factor in human bladder carcinoma.

J Nat Cancer Inst **87**: 372-377

Avilion AA, Piatyszek MA, Gupta J, Shay JW, Bacchetti S, Greider CW (1996)

Human telomerase RNA and telomerase activity in immortal cell lines and tumor tissues.

Cancer Res **56**: 645-650

Ayer LM, Rubin RL, Dixon GH, Fritzler MJ (1994)

Antibodies to HMG proteins in patients with drug-induced autoimmunity.

Arthritis Rheum **37**: 98-103

Ayer LM, Senecal JL, Martin L, Dixon GH, Fritzler MJ (1994)

Antibodies to high mobility group proteins in systemic sclerosis.

J Rheumatol **21**: 2071-2075

Barraclough R, Rudland PS (1994)

The S-100-related calcium-binding protein, p9Ka, and metastasis in rodent and human mammary cells.

Eur J Cancer **30A**: 1570-1576

Baserga SJ, Linnenbach AJ, Malcolm S, Ghosh P, Malcolm AD, Takeshita K, Forget BG, Benz EJ Jr (1985)

Polyadenylation of a human mitochondrial ribosomal RNA transcript detected by molecular cloning.

Gene **35**: 305-312

- Baxevanis AD, Landsman D (1995)
The HMG-1 box protein family: classification and functional relationships.
Nucleic Acids Res **23**: 1604-1613
- Bauer D, Müller H, Reich J, Riedel H, Ahrenkiel V, Warthoe P, Strauss M (1993)
Identification of differentially expressed mRNA species by an improved display technique (DDRT-PCR).
Nucleic Acids Res **21**: 4272-4280
- Bertioli DJ, Schlichter UHA, Adams MJ, Burrows PR, Steinbiß HH, Antoniw JF (1995)
An analysis of differential display shows a strong bias towards high copy number mRNAs.
Nucleic Acids Res **23**: 4520-4523
- Biran H, Ariel I, De Groot N, Hochberg A (1994)
On the oncodevelopmental role of human imprinted genes.
Med Hypotheses **43**: 119-123
- Boonyaratanakornkit V, Melvin V, Prendergast P, Altmann M, Ronfani L, Bianchi ME, Taraseviciene L, Nordeen SK, Allegretto EA, Edwards DP (1998)
High-mobility group chromatin proteins 1 and 2 functionally interact with steroid hormone receptors to enhance their DNA binding in vitro and transcriptional activity in mammalian cells.
Mol Cell Biol **18**: 4471-4487
- Borland G, Ross JA, Guy K (1998)
Forms and functions of CD44.
Immunol **93**: 139-148
- Bustin M, Reeves R (1996)
High mobility group proteins.
Prog Nucleic Acids Res Mol Biol **54**: 35-100
- Bryan TM, Englezou A, Gupta J, Bacchetti S, Reddel RR (1995)
Telomere elongation in immortal human cells without detectable telomerase activity.
EMBO J **14**: 4240-4248
- Cairns P, Sidransky D (1998)
Bladder Cancer, 639-645.
In: Vogelstein B, Kinzler KW (Hrsg): *The Genetic Basis of Human Cancer*.
McGraw-Hill, New York St. Louis San Francisco

- Chen RZ, Pettersson U, Beard C, Jackson-Grusby L, Jaenisch R (1998)
 DNA hypomethylation leads to elevated mutation rates.
Nature **395**: 89-93
- Chin L, Tam A, Pomerantz J, Wong M, Holash J, Bardeesy N, Shen Q, O'Hagan R, Pantginis J, Zhou H, Horner JW 2nd, Cordon-Cardo C, Yancopoulos GD, DePinho RA (1999)
 Essential role for oncogenic Ras in tumour maintenance.
Nature **400**: 468-472
- Chomczynski P, Sacchi N (1987)
 Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction.
Anal Biochem **162**: 156-159
- Conn IG, Vilela MJ, Garrod DR, Crocker J, Wallace DM (1990)
 Immunohistochemical staining with monoclonal antibody 32-2B to desmosomal glycoprotein 1.
 Its role in the histological assessment of urothelial carcinomas.
Br J Urol **65**: 176-180
- Cordon-Cardo C, Reuter VE, Lloyd KO, Sheinfeld J, Fair WR, Old LJ, Melamed M (1988)
 Blood group-related antigens in human urothelium: Enhanced expression of precursor, Le^x, and Le^y determinants in urothelial carcinoma.
Cancer Res **48**: 4113-4120
- Darnell J, Lodish H, Baltimore D (1990)
 Oncogenes and their proteins: Classification and characterization, 984-990.
 Intermediate Repeat DNA and Mobile DNA Elements, S.369 ff.
 In: *Molecular Cell Biology*.
 2. Aufl. Scientific American Books, vertrieben durch Freeman, New York
- Defilippi P, Tarone G (1997)
 Activation of tyrosine kinases.
 In: *Signal transduction by integrins*, S.29-46
 Molecular Biology Intelligence Unit, Landes Bioscience, Austin, Texas, USA
- Diatchenko L, Chris Lau YF, Campbell AP, Chenchik A, Moqadam F, Huang B, Lukyanov S, Lukyanov K, Gurskaya N, Sverdlov ED, Siebert PD (1996)
 Suppression subtractive hybridization: A method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries.
Proc Natl Acad Sci USA **93**: 6025-6030

- Dimhofer S, Koessler P, Ensinger C, Feichtinger H, Madersbacher S, Berger P (1998)
Production of trophoblastic hormones by transitional cell carcinoma of the bladder: association to tumor stage and grade.
Hum Pathol **29**: 377-382
- Fearon ER, Vogelstein BA (1990)
A genetic model for colorectal tumorigenesis.
Cell **61**: 759-767
- Finch JL, Miller J, Aspinall JO, Cowled PA (1999)
Cloning of the human uroplakin 1B cDNA and analysis of its expression in urothelial-tumor cell lines and bladder-carcinoma tissue.
Int J Cancer **80**: 533-538
- Freshney RI, Hg. (1986)
Animal cell culture: a practical approach.
IRL, Oxford
- Frixen UH, Behrens J, Sachs M, Eberle G, Voss B, Warda A, Lochner D, Birchmeier W (1991)
E-cadherin-mediated cell-cell adhesion prevents invasiveness of human carcinoma cells.
J Cell Biol **113**: 173-185
- Fujimoto K, Yamada Y, Okajima E, Kakizoe T, Sasaki H, Sugimura T, Terada M (1992)
Frequent association of p53 gene mutation in invasive bladder cancer.
Cancer Res **52**: 1393-1398
- Fujiyama C, Masaki Z, Sugihara H (1995)
Reconstruction of the Urinary Bladder Mucosa in Three-Dimensional Collagen Gel Culture: Fibroblast-Extracellular Matrix Interactions on the Differentiation of Transitional Epithelial Cells
J Urol **153**: 2060-2067
- Garnick MB, Brenner BM (1991)
Tumors of the urinary tract.
In: Wilson JD, Braunwald E, Isselbacher KJ, Petersdorf RG, Martin JB, Fauci AS, Root RK (Hrsg):
Harrison's Principles of Internal Medicine
12. Aufl. McGraw-Hill, New York St. Louis San Francisco

Geer P van der, Hunter T, Lindberg RA (1994)

Receptor protein-tyrosine kinases and their signal transduction pathways.

Annu Rev Cell Biol **10**: 251-337

Gent DC van, Hiom K, Paull TT, Gellert M (1997)

Stimulation of V(D)J cleavage by high mobility group proteins.

EMBO J **16**: 2665-2670

Golijanin D, Sherman Y, Shapiro A, Pode D (1995)

Detection of bladder tumors by immunostaining of the Lewis X antigen in cells from voided urine.

Urology **46**: 173-177

Grigorian MS, Tulchinsky EM, Zain S, Ebralidze AK, Kramerov DA, Kriajevska MV, Georgiev GP, Lukanidin EM (1993)

The mts1 gene and control of tumor metastasis.

Gene **135**: 229-38

Hahn WC, Counter CM, Lundberg AS, Beijersbergen RL, Brooks MW, Weinberg RA (1999)

Creation of human tumour cells with defined genetic elements.

Nature **400**: 464-468

Hart AP, Brown R, Lechago J, Truong LD (1994)

Collision of transitional cell carcinoma and renal cell carcinoma. An immunohistochemical study and review of the literature.

Cancer **73**: 154-159

Hartwell LH, Kastan MB (1994)

Cell cycle control and cancer.

Science **266**: 1821-1828

Higgy NA, Salicioni AM, Russo IH, Zhang PL, Russo J (1997)

Differential expression of human ferritin H chain gene in immortal human breast epithelial MCF-10F cells.

Mol Carcinog **20**: 332-339

Hirohachi S (1998)

Inactivation of the E-cadherin-mediated cell adhesion system in human cancers.

Am J Pathol **153**: 333-339

- Hollstein M, Sidransky D, Vogelstein B, Harris CC (1991)
p53 mutations in human cancers.
Science **253**: 49-53
- Hong RL, Pu YS, Chu JS, Lee WJ, Chen YC, Wu CW (1995)
Correlation of expression of CD44 isoforms and E-cadherin with differentiation in human urothelial cell lines and transitional cell carcinomas.
Cancer Lett **89**: 81-87
- Hubank M, Schatz DG (1994)
Identifying differences in mRNA expression by representational difference analysis of cDNA.
Nucl Acids Res **22**: 5640-5648
- Hughes EN, Engelsberg BN, Billings PC (1992)
Purification of nuclear proteins that bind to cisplatin-damaged DNA. Identity with high mobility group proteins 1 and 2.
J Biol Chem **267**: 13520-13527
- Iczkowski KA, Shanks JH, Bostwick DG (1998)
Loss of CD44 variant 6 expression differentiates small cell carcinomas of urinary bladder from urothelial (transitional cell) carcinomas.
Histopathology **32**: 322-327
- International Union Against Cancer (1992)
Urological tumors.
In Hermanek P, Sobin LH (Hrsg.)
TNM Classification of Malignant Tumors.
4. Aufl. Springer, Berlin
- Jayaraman L, Chandra Moorthy N, Murthy KGK, Manley JL, Bustin M, Prives C (1998)
High motility group protein-1 (HMG-1) is a unique activator of p53.
Genes Develop **12**: 462-472
- Kamata S, Kageyama Y, Yonese J, Oshima H (1996)
Significant telomere reduction in human superficial transitional cell carcinoma.
Brit J Urology **78**: 704-708

- Kamb A, Gruis NA, Weaver-Feldhaus J, Liu Q, Harshman K, Tavgigian SV, Stockert E, Day RS 3rd, Johnson BE, Skolnick MH (1994)
A cell cycle regulator potentially involved in genesis of many tumor types.
Science **264**: 436-440
- Kane SA, Lippard SJ (1996)
Photoreactivity of platinum (II) in cisplatin-modified DNA affords specific cross-links to HMG domain proteins.
Biochemistry **45**: 2180-2187
- Kaspar S (1998)
Mündliche Mitteilung. In der Doktorarbeit werden die Uroplakine exprimierenden nicht-urothelialen Normalgewebe und Tumoren im Detail dargestellt und diskutiert. In Vorbereitung.
- Kawahara N, Tanaka T, Yokomizo A, Nanri H, Ono M, Wada M, Kohno K, Takenaka K, Sugimachi K, Kuwano M (1996)
Enhanced coexpression of thioredoxin and high mobility group protein 1 genes in human human hepatocellular carcinoma and the possible association with decreased sensitivity to cisplatin.
Cancer Res **56**: 5330-5333
- Khan J, Saal LH, Bittner ML, Chen Y, Trent JM, Meltzer PS (1999)
Expression profiling in cancer using cDNA microarrays.
Electrophoresis **20**: 223-229
- Kidd KK und Ruano G (1995)
Optimizing PCR.
In: *PCR 2, a practical approach*.
McPherson MJ, Hames BD, Taylor GA (Hrsg), S. 9-10.
Oxford University Press, Oxford New York Athens
- Kim NW, Piatyszek MA, Prowse KR, Harley CB, West MD, Ho PL, Coviello GM, Wright WE, Weinrich SL, Shay JW (1994)
Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer.
Science **266**: 2011-2015
- King ED, Matteson J, Jacobs SC, Kyprianou N (1996)
Incidence of apoptosis, cell proliferation and bcl-2 expression in transitional cell carcinoma of the bladder: association with tumor progression.
J Urol **155**: 316-320

Knowles MA, Williamson M (1993)

Mutation of H-ras is infrequent in bladder cancer: confirmation by single-strand conformation polymorphism analysis, designed restriction fragment length polymorphisms, and direct sequencing.

Cancer Res Jan **53**: 133-139

Knuechel R, Siebert-Wellnhofer A, Traub O, Dermietzel R (1996)

Connexin expression and intercellular communication in two- and three-dimensional in vitro cultures of human bladder carcinoma.

Am J Pathol **149**: 1321-1332

Kretsinger RH (1976)

Calcium-binding proteins.

Annu Rev Biochem **45**: 239-266

Kurth, K-H, Rübber H (1993)

Tumoren, 180-246

In: Altwein, JE, Rübber H (Hrsg): *Urologie*

4. Aufl. Enke, Stuttgart

Laird PW, Jaenisch R (1996)

The role of DNA methylation in cancer genetics and epigenetics.

Annu Rev Genet **30**: 441-464

Landsman D, Bustin M (1993)

A signature for the HMG-1 Box DNA-binding proteins.

BioEssays **15**: 539-546

Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B (1997)

DNA methylation and genetic instability in colorectal cancer cells.

Proc Natl Acad Sci USA **94**: 2545-2550

Lianes P, Orlow I, Zhang Z-F, Oliva MR, Sarkis AS, Reuter VE, Cordon-Cardo C (1994)

Altered patterns of MDM2 and TP53 expression in human bladder cancer.

J Natl Cancer Inst **86**: 1325-1331

Liang P, Pardee AB (1992)

Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction.

Science **257**: 967-971

- Liebert M, Hubbel A, Chung M, Wedemeyer G, Lomax MI, Hegeman A, Yuan TY, Brozovich M, Wheelock MJ, Grossman HB (1997)
Expression of *mal* is associated with urothelial differentiation in vitro: identification by differential display reverse-transcriptase polymerase chain reaction.
Differentiation **61**: 177-185
- Lin JH, Wu XR, Kreibich G, Sun TT (1994)
Precursor sequence, processing, and urothelium-specific expression of a major 15-kDa protein subunit of asymmetric unit membrane.
J Biol Chem **269**: 1775-1784
- Lin JH, Zhao H, Sun TT (1995)
A tissue-specific promoter that can drive a foreign gene to express in the suprabasal urothelial cells of transgenic mice.
Proc Natl Acad Sci USA **92**: 679-683
- Linn JF, Lango M, Halachmi S, Schoenberg MP, Sidransky D (1997)
Microsatellite analysis and telomerase activity in archived tissue and urine samples of bladder cancer patients.
Int J Cancer **74**: 625-629
- Lipponen PK, Eskelinen MJ (1995)
Reduced expression of E-cadherin is related to invasive disease and frequent recurrence in bladder cancer.
J Cancer Res Clin Oncol **121**: 303-308
- Lisitsyn N, Lisitsyn N, Wigler M (1993)
Cloning the differences between two complex genomes.
Science **259**: 946-951
- Lobban ED, Smith BA, Hall GD, Harnden P, Roberts P, Selby PJ, Trejdosiewicz LK, Southgate J (1998)
Uroplakin gene expression by normal and neoplastic human urothelium.
Am J Pathol **153**:1957-1967
- Lycke K und Larsen F (1995)
In: *Biomagnetic techniques in molecular biology. Technical handbook*. 2. Aufl., S.65
Deutsche Dynal GmbH, Hamburg
- Maggiora P, Gambarotta G, Olivero M, Giordano S, Di Renzo MF, Comoglio PM (1997)
Control of invasive growth by the HGF receptor family.
J Cell Physiol **173**:183-186

- Mao L, Schoenberg MP, Scicchitano M, Erozan YS, Merlo A, Schwab D, Sidransky D (1996)
Molecular detection of primary bladder cancer by microsatellite analysis.
Science **271**: 659-662
- Masters JRW, Hepburn PJ, Walker L, Highman WJ, Trejdosiewicz LK, Povey S, Parkar M, Hill BT, Riddle PR, Franks LM (1986)
Tissue culture model of transitional cell carcinoma: Characterization of twenty-two human urothelial cell lines.
Cancer Res **46**: 3630-3636
- Matuoka K, Shibata M, Yamakawa A, Takenawa T (1992)
Cloning of ASH, a ubiquitous protein composed of one Src homology region (SH) 2 and two SH3 domains, from human and rat cDNA libraries.
Proc Natl Acad Sci USA **89**: 9015-9019
- Miettinen M (1995)
Keratin 20: immunohistochemical marker for gastrointestinal, urothelial, and Merkel cell carcinomas.
Mod Pathol **8**: 384-388
- Migliari R, Mela Q, Ruggiero V, Scarpa RM, Migliari M, Pitzus F, Usai E (1991)
Serum and urine ferritin in patients with transitional cell carcinoma of the bladder.
Arch Ital Urol Nefrol Androl **63**: 141-145
- Mizutani Y, Yoshida O, Bonavida B (1998)
Prognostic significance of soluble Fas in the serum of patients with bladder cancer.
J Urol **160**: 571-576
- Moch H, Schraml P, Bubendorf L, Mirlacher M, Kononen J, Gasser T, Mihatsch MJ, Kallioniemi OP, Sauter G (1999)
High-throughput tissue microarray analysis to evaluate genes uncovered by cDNA microarray screening in renal cell carcinoma.
Am J Pathol **154**: 981-986
- Moll R (1993)
Cytokeratine des Urothels und seiner Karzinome.
In: *Cytokeratine als Differenzierungsmarker: Expressionsprofile von Epithelien und epithelialen Tumoren*.
Veröffentlichungen aus der Pathologie/Progress in Pathology **142**: 62-71
- Moll R (1994)
Cytokeratins in the histological diagnosis of malignant tumors.
Int J Biol Markers **9**: 63-69

Moll R, Wu XR, Lin JH, Sun TT (1995)

Uroplakins, specific membrane proteins of urothelial umbrella cells, as histological markers of metastatic transitional cell carcinomas.

Am J Pathol **147**: 1383-1397

Morse JH, Barst RJ, Fotino M, Zhang Y, Flaster E, Fritzler MJ (1996)

Primary pulmonary hypertension: immunogenetic response to high mobility group (HMG) proteins and histone.

Clin Exp Immunol **106**: 389-395

Muller M, Heicappell R, Habermann F, Kaufmann M, Steiner U, Miller K (1997)

Expression of CD44V2 in Transitional Cell Carcinoma of the Urinary Bladder and in Urine.

Urol Res **25**: 187-192

Mullis KB, Faloona FA (1987)

Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction.

Methods Enzymol **155**:335-350

Mulvey MA, Lopez-Boado YS, Wilson CL, Roth R, Parks WC, Heuser J, Hultgren SJ (1998)

Induction and evasion of host defenses by type 1-piliated uropathogenic *Escherichia coli*.

Science **282**: 1494-1497

Nagafuchi A, Tsukita S, Takeichi M (1993)

Transmembrane control of cadherin-mediated cell-cell adhesion.

Semin Cell Biol **4**: 175-181

Naidoo R, Chetty R (1998)

The application of microsatellites in molecular pathology.

Pathol Oncol Res **4**: 310-315

Nakanishi Y, Ochiai A, Akimoto S, Kato H, Watanabe H, Tachimori Y, Yamamoto S, Hirohachi S (1997)

Expression of E-cadherin, a-catenin, b-catenin and plakoglobin in esophageal carcinomas and its prognostic significance.

Oncology **54**: 158-165

Nakopoulou L, Zervas A, Constantinides C, Deliveliotis C, Stefanaki K, Dimopoulos C (1995)

Epithelial differentiation antigens and epidermal growth factor receptors in transitional cell bladder carcinoma: correlation with prognosis.

Urol Int **54**: 191-197

Noonan KE, Beck C, Holzmayer TA, Chin JE, Wunder JS, Andrulis IJ, Gazdar AF, Willman CL, Griffith B, Von Hoff DD, Roninson IB (1990)

Quantitative analysis of MDR1 (multidrug resistance) gene expression in human tumors by polymerase chain reaction.

Proc Natl Acad Sci USA **87**: 7160-7164

Oda T, Kanai Y, Oyama T, Yoshiura K, Shimoyama Y, Birchmeier W, Sugimura T, Hirohashi S (1994)

E-cadherin gene mutations in human gastric carcinoma cell lines.

Proc Natl Acad Sci USA **91**: 1858-1862

Ogawa K, Sun TT, Cohen SM (1996)

Analysis of differentiation-associated proteins in rat bladder carcinogenesis.

Carcinogenesis **17**: 961-965

Oñate SA, Prendergast P, Wagner JP, Nissen M, Reeves R, Pettijohn, Edwards DP (1994)

The DNA-bending protein HMG-1 enhances progesterone receptor binding to its target DNA sequences.

Mol Cell Biol **14**: 3376-3391

Orntoft TF, Wolf H (1998)

Molecular alterations in bladder cancer.

Urol Res **26**: 223-233

Oyasu R, Nan L, Smith DP, Kawamata H (1994)

Human chorionic gonadotropin beta-subunit synthesis by undifferentiated urothelial carcinoma with syncytiotrophoblastic differentiation.

Arch Pathol Lab Med **118**: 715-717

Passalacqua M, Zicca A, Sparatore B, Patrone M, Melloni E, Pontremoli S (1997)

Secretion and binding of HMG1 protein to the external surface of the membrane are required for murine erythroleukemia cell differentiation.

FEBS Letters **400**: 275-279

Presti JC, Reuter VE, Galan T, Fair WR, Cordon-Cardo C (1991)

Molecular genetic alterations in superficial and locally advanced human bladder cancer.

Cancer Res **51**: 5405-5409

Reddy EP, Reynolds RK, Santos E, Barbacid M (1982)

A Point Mutation is Responsible For the Acquisition of Transforming Properties By the T24 Human Bladder Carcinoma Oncogene.

Nature **300**: 149-152

Robert Koch-Institut (1998)

Chronische Krankheiten. Neue Schätzung der Gesamtzahl an Krebs Erkrankender.

<http://www.rki.de/CHRON/KREBS/DACHDOK/ERGEBNIS/GESAMT95.HTM>

Rosen EM, Joseph A, Jin L, Yao Y, Chau MH, Fuchs A, Gomella L, Hastings H, Goldberg ID, Weiss GH (1997)

Urinary and tissue levels of scatter factor in transitional cell carcinoma of bladder.

J Urol **157**: 72-78

Rübben H, Otto T (1997)

Harnblasenkarzinom.

In: Rübben H (Hrsg)

Uroonkologie.

Springer, Berlin Heidelberg New York

Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA (1988)

Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase.

Science **239**: 487-491

Saiki RK, Scharf SJ, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, Arnheim N (1985)

Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia.

Science **230**: 1350-1354

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989)

Molecular Cloning. A Laboratory Manual, 2.Aufl.

Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor

Sandberg AA (1986)

Chromosome changes in bladder cancer: Clinical and other correlations.

Cancer Genet Cytogenet **19**: 163-175

Sandberg AA (1990)

The Chromosomes in Human Cancer and Leukemia.

2. Aufl. Elsevier, New York

Sandberg AA, Berger CS (1994)

Review of chromosome studies in urological tumors. II. Cytogenetics and molecular genetics of bladder cancer.

J Urol **151**: 545-560

- Sawchuk DJ, Weis-Garcia F, Malik S, Besmer E, Bustin M, Nussenzweig MC, Cortes P (1997)
V(D)J recombination: Modulation of RAG1 and RAG2 cleavage activity on 12/23 substrates by whole cell extracts and DNA-bending proteins.
J Exp Med **185**: 2025-2032
- Schmitz-Drager BJ, Schulz WA, Jurgens B, Gerharz CD, van Roeyen CR, Bultel H, Ebert T, Ackermann R (1997)
c-myc in Bladder Cancer. Clinical Findings and Analysis of Mechanism
Urol Res **25** Suppl 1: S45-S49
- Serrano M, Hannon GJ, Beach D (1993)
A new regulatory motif in cell-cycle control causing specific inhibition of cyclin D/CDK4.
Nature **366**: 704-707
- Sheinfeld J, Reuter VE, Melamed MR, Fair WR, Morse M, Sogani PC, Herr HW, Whitmore WF, Cordon-Cardo C (1990)
Enhanced bladder cancer detection with the Lewis X antigen as a marker of neoplastic transformation.
J Urol **143**: 285-288
- Sidransky D (1997)
Nucleic acid-based methods for the detection of cancer.
Science **278**: 1054-1059
- Sidransky D, von Eschenbach A, Tsai YC, Jones P, Summerhayes I, Marshall F, Paul M, Green P, Hamilton SR, Frost P, Vogelstein B (1991)
Identification of p53 gene mutations in bladder cancer and urine samples.
Science **252**: 706-709
- Sidransky D, Frost P, von Eschenbach A, Oyasu R, Preisinger AC, Vogelstein B (1992)
Clonal origin of bladder cancer.
N Engl J Med **326**: 737-740
- Smith DJ, Evans HJ, Newman J, Chapple CR (1994)
Ectopic human chorionic gonadotrophin (HCG) production: is the detection by serum analysis of HCG of clinical relevance in transitional cell carcinoma of the bladder ?
Br J Urol **73**: 409-412

- Soloway MS, Briggman JV, Carpenito GA, Chodak GW, Church PA, Lamm DL, Lange P, Messing E, Pasciak RM, Reservitz GB, Rukstalis DB, Sarosdy MF, Stadler WM, Thiel RP, Hayden CL (1996)
Use of a new tumor marker, urinary NMP22, in the detection of occult or rapidly recurring transitional cell carcinoma of the urinary tract following surgical treatment.
J Urol **156**: 363-367
- Southgate J, Hutton KAR, Thomas DFM, Treijdosiewicz LK (1994)
Normal human urothelial cells in vitro: proliferation and induction of stratification.
Lab Invest **71**: 583-594
- Stein JP, Grossfeld GD, Ginsberg DA, Esrig D, Freeman JA, Figueroa AJ, Skinner DG, Cote RJ (1998)
Prognostic Markers in Bladder Cancer: A Contemporary Review of the Literature.
J Urol **160**: 645-659
- SteinbergMS, Foty RA (1997)
Intercellular Adhesions as determinants of tissue assembly and malignant invasion.
J Cell Physiol **173**: 135-139
- Steiner G, Schoenberg MP, Linn JF, Mao L, Sidransky D (1997)
Detection of bladder cancer recurrence by microsatellite analysis of urine.
Nat Med **3**: 621-624
- Strausberg R (1997)
NCI-CGAP <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ncicgap>
National Cancer Institute, Cancer Genome Anatomy Project (CGAP), Tumor Gene Index Accession:
AA513520 GenBank <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>
- Swanson PE, Frierson HF Jr, Wick MR (1992)
c-srbB-2 (HER-2/neu) oncopeptide immunoreactivity in localized, high-grade transitional cell carcinoma of the bladder.
Modern Pathol **5**: 531-536
- Taher EI, Smit L, Griffioen AW, Schilder-Tol EJM, Borst J, Pals ST (1996)
Signaling through CD44 is mediated by tyrosine kinases.
J Biol Chem **271**: 2863-2867

- Takemoto M, Shirahama T, Miyauchi T, Matsusako T, Kaneda N, Muramatsu H, Ozawa M, Ohi Y, Muramatsu T (1997)
Metanestin, a glycoprotein with metastasis-associated expression in transitional cell carcinoma of the urinary bladder.
Int J Cancer **74**: 7-14
- Tang DJ, Fan XY, Huang XB, Chen PH, Liang Y, Lang YM (1989)
Clinical significance of urine ferritin determination in urologic malignancies.
Chin Med J **102**: 356-360
- Tatu CA, Orem WH, Finkelman RB, Feder GL (1998)
The etiology of Balkan endemic nephropathy: still more questions than answers.
Environ Health Perspect **106**: 689-700
- Tremethick DJ, Molloy PL (1986)
High mobility group proteins 1 and 2 stimulate transcription *in vitro* by RNA polymerase II and III.
J Biol Chem **261**: 6986-6992
- Turchi JJ, Li M, Henkels KM (1996)
Cisplatin-DNA binding specificity of calf high-mobility group 1 protein.
Biochemistry **35**: 2992-3000
- Verrier CS, Roodi N, Yee CJ, Bailey LR, Jensen RA, Bustin M, Parl FF (1997)
High-mobility group (HMG) protein and TATA-binding protein-associated factor TAF (II)30 affect estrogen receptor-mediated transcriptional activation.
Mol Endocrinol **11**: 1009-1019
- Vet JA, van Moorselaar RJ, Debruyne FM, Schalken JA (1997)
Differential expression of ferritin heavy chain in a rat transitional cell carcinoma progression model.
Biochim Biophys Acta **1360**: 39-44
- Vogelstein B, Kinzler KW (1998)
The Genetic Basis of Human Cancer.
McGraw-Hill, New York St. Louis San Francisco
- Xiang Y-Y, Wang D-Y, Tanaka M, Suzuki M, Kiyokawa E, Igarashi H, Naito Y, Shen Q, Sugimura H (1997)
Expression of high-mobility group-1 mRNA in human gastrointestinal adenocarcinoma and corresponding non-cancerous mucosa.
Int J Cancer **74**: 1-6

- Wu XR, Lin JH, Walz T, Häner M, Yu J, Aebi U, Sun TT (1994)
Mammalian uroplakins. A group of highly conserved urothelial differentiation-related membrane proteins.
J Biol Chem **18**: 13716-13724
- Wu XR, Sun TT (1993)
Molecular cloning of a 47 kDa tissue-specific and differentiation-dependent urothelial cell surface glycoprotein.
J Cell Sci **106**: 31-43
- Wu XR, Sun TT, Medina JJ (1996)
In vitro binding of type 1-fimbriated Escherichia coli to uroplakins Ia and Ib: relation to urinary tract infections.
Proc Natl Acad Sci U S A **93**: 9630-9635
- Yang GP, Ross DT, Kuang WW, Brown PO, Weigel RJ (1999)
Combining SSH and cDNA microarrays for rapid identification of differentially expressed genes.
Nucleic Acids Res **27**: 1517-1523
- Yoshida K, Sugino T, Tahara H, Woodman A, Bolodeoku J, Nargund V, Fellows G, Goodison S, Tahara E, Tarin D (1997)
Telomerase activity in bladder carcinoma and its implication for noninvasive diagnosis by detection of exfoliated cancer cells in urine.
Cancer **79**: 362-369
- Yu J, Lin JH, Wu XR, Sun TT (1994)
Uroplakins Ia and Ib, two major differentiation products of bladder epithelium, belong to a family of four transmembrane domain (4TM) proteins.
J Cell Biol **125**: 171-182
- Yuasa T, Yoshiki T, Tanaka T, Kim CJ, Isono T, Okada Y (1998)
Expression of uroplakin Ib and uroplakin III genes in tissues and peripheral blood of patients with transitional cell carcinoma.
Jpn J Cancer Res **89**: 879-882
- Zappavigna V, Falciola L, Citterich M, Mavilio F, Bianchi ME (1996)
HMG-1 interacts with HOX-proteins and enhances their DNA binding and transcriptional activation.
EMBO J **15**: 4981-4991
- Zlatanova J, van Holde K (1998)
Linker Histones versus HMG1/2: a struggle for dominance ?
Bioessays **20**: 584-588

Zlatanova J, Yaneva J, Leuba SH (1998)

Proteins that specifically recognize cisplatin-damaged DNA: a clue to anticancer activity of cisplatin.

FASEB J **12**: 791-799

Zwilling S, König H, Wirth T (1995)

High mobility group protein 2 functionally interacts with the POU domains of octamer transcription factors.

EMBO J **14**: 1198-1208

Eigene Veröffentlichung zum Thema

Bade S, Kahla-Witzsch HA, Schuldes H, Jonas D (1997)

Uroplakin RT-PCR: specific and sensitive detection of bladder cells.

Br J Urol **80** (Suppl. 2): 24

DANKSAGUNG

Dem Chef der Klinik für Urologie und Kinderurologie am Klinikum der Johann Wolfgang Goethe-Universität in Frankfurt am Main, Herrn Prof. Dr. med. Jonas danke ich für die Bereitstellung des urologischen Forschungslabors für die Durchführung meiner Forschungsarbeit.

Herrn PD Dr. med. H. Schuldes, Oberarzt der Klinik für Urologie und Kinderurologie am Universitätsklinikum in Frankfurt am Main, danke ich für die freundliche Unterstützung meiner Arbeit.

Dem Medizinstudenten und Doktoranden im urologischen Forschungslabor, Herrn Stephan Kaspar, sei für die weiterführende Anwendung der von mir entwickelten Uroplakin RT-PCR und für seinen unermüdlichen Einsatz beim Sammeln von Gewebeproben und pathologischen Befunden herzlichst gedankt.

Den technischen Assistentinnen der chirurgischen Labors, Frau E. Oppermann, Frau K. Willems und Frau R. Schröder sei freundlichst für die logistische Unterstützung gedankt.

Den Molekularbiologen Frank Wempe, Irmgard Thorey und der Technischen Assistentin aus der Forschergruppe „Molekulare Hämatologie“ am Universitätsklinikum in Frankfurt am Main, sei herzlich für die freundliche Unterstützung bei den Sequenzierungen auf dem ABI PRISM Sequencer gedankt.

Den Chirurgen und Pflegern aus dem OP möchte ich dafür danken, daß sie daran gedacht haben, frisch entnommene Organe, Gewebe und Blutproben für das Forschungslabor zu reservieren, noch bevor alles routinemäßig in Formalin fixiert und in die Pathologie geschickt wurde.

Dem Pathologen Dr. Berger danke ich für seine Hilfe bei den Entnahmen von Gewebeproben aus Organen, die für die Pathologie bestimmt waren.