Aus der Universitätsklinik für Urologie Tübingen
Ärztlicher Direktor: Professor Dr. A. Stenzl

Immunhistochemische Analyse prognostischer Faktoren von Hyaluronsäure und Hyaluronidase unter Verwendung der Tissue Microarray Technik beim Harnblasenkarzinom

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Mario Wolfgang Kramer
aus Nagold

2011

Dekan:	Professor Dr. I. B. Autenrieth
1. Berichterstatter:	Professor Dr. A. Stenzl
2. Berichterstatter:	Professor Dr. B. Sipos
3. Berichterstatter:	Professor Dr. A. Haferkamp

Meinen Eltern und meinen Geschwistern

INHALTSVERZEICHNIS

Seite

1 EINLEITUNG 6

1.1 DAS HARNBLASENKARZINOM 6
1.1.1 Epidemiologie und Ätiologie 6
1.1.2 Klinik 7
1.1.3 Pathologie 8
1.1.4 Staging 9
1.1.5 Grading 10
1.1.6 Rezidiv- und Progressionsverhalten 12
1.1.7 Diagnostik 14
1.1.8 Therapie 15
1.2 HYALURONSÄURE UND HYALURONIDASEN 17
1.2.1 Hyaluronsäure (HA) 17
1.2.2 Hyaluronidasen (HAase) 20
1.3 FRAGESTELLUNG DER VORLIEGENDEN ARBEIT 22

2 MATERIAL UND METHODIK 23

2.1 DATENERHEBUNG DES PATIENTENKOLLEKTIVS 23
2.2 UNTERSUCHUNGSMATERIAL UND TMA HERSTELLUNG 24
2.3 IMMUNHISTOCHEMIE 27
2.4 INTERPRETATION DER HISTOLOGISCHEN BEFUNDE 29
2.5 TESTVERFAHREN UND COMPUTERPROGRAMME 31
2.6 SENSITIVITÄT UND SPEZIFITÄT 32

3 ERGEBNISSE 34

3.1 PATIENTENKOLLEKTIV, TUMORCHARAKTERISTIKA UND FOLLOW-UP DATEN 34
3.2 EXPRESSSIONSEVALUATION IN KORRELATION KLINISCH-PATHOLOGISCHER PARAMETER 36
3.2.1 Hyaluronsäure 36
3.2.2 Hyaluronidase 1 38
3.2.3 Splicevariante 1 der Hyaluronidase 1 (HYAL1-v1) 40
3.3 EVALUATION PROGNOSTISCHER PARAMETER IN KORRELATION ZUM EXPRESSIONSNIVEAU 43
3.3.1 Hyaluronsäure 43
3.3.2 Hyaluronsäure 1 45
3.3.3 Kombination HA-HYAL1 48
3.3.4 HYAL1-v1 49
3.4 TABELLEN 51
3.4.1 Chi-Quadrat Analyse: Rezidiv 51
3.4.2 Chi-Quadrat Analyse: Tumorprogression 52
3.4.3 ROC Analyse: Rezidiv 53
3.4.4 ROC Analyse: Tumorprogression 53

3.4.5 Multivariate Analysen unter Verwendung von HA/HYAL1 ..... *54*
3.4.6 Multivariate Analyse unter Verwendung von HYAL1-v1..... *55*

4 DISKUSSION 56

4.1 ALLGEMEINES..... 56
4.2 HYALURONSÄURE: BEWERTUNG – BEDEUTUNG 57
4.3 HYALURONIDASE 1: BEWERTUNG – BEDEUTUNG..... 60
4.4 HA/HYAL1 – KOMBINATION: WERTUNG – BEDEUTUNG 63
4.5 HYAL1-V1: BEWERTUNG – BEDEUTUNG 64
4.6 SCHLUSSFOLGERUNG 66

5 ZUSAMMENFASSUNG 68

6 ABKÜRZUNGEN..... 70

7 TABELLEN UND ABBILDUNGEN 72

8 LITERATURVERZEICHNIS..... 74

9 DANKSAGUNG 86

10 LEBENSLAUF 87

1 EINLEITUNG

1.1 Das Harnblasenkarzinom

1.1.1 Epidemiologie und Ätiologie

Das Harnblasenkarzinom stellt den zweithäufigsten malignen urologischen Tumor dar. Nach Prostata-, Lungen- bzw. Bronchial- und kolorektalem Karzinom steht es bei Männern an vierter Stelle. Wurde das Harnblasenkarzinom bei Frauen im Jahre 2006 noch an 9. Stelle geführt, tauchte es 2007 nicht mehr unter den häufigsten 10 Tumorarten auf [1, 2]. Geschätzte 67'000 Harnblasenkarzinome waren für 2007 in den USA prognostiziert worden [2]. In Deutschland erkranken ca. 15'000 Menschen jährlich [3]. Männer sind ca. 3-mal so häufig betroffen wie Frauen, wobei der Unterschied mit ansteigendem Alter zunimmt [4]. Das mittlere Erkrankungsalter liegt zwischen dem 65. und 70. Lebensjahr. Das Harnblasenkarzinom kann in jedem Alter auftreten. Jedoch ist seine Inzidenz alterabhängig. Sind es in der 5. Lebensdekade ca. 3 Erkrankungen pro 100`000 Einwohner, steigt es bei über 80-jährigen auf ca. 200 Erkrankungen pro 100`000 Einwohner an [5].

Raucher haben ein 2- bis 4-fach erhöhtes relatives Risiko, an einem Harnblasenkarzinom zu erkranken [6, 7]. Es ist zu vermuten, dass bis zu 50% der auftretenden Harnblasenkarzinome durch das Rauchen verursacht werden [8]. Daneben ist die Entstehung des Harnblasenkarzinoms eng gekoppelt an die Exposition mit umweltbedingten Karzinogenen wie Naphthylamin und aromatischen Aminen [9-13]. Des Weiteren gelten einige Medikamente wie Chlornaphazin, Phenacetin und Cyclophoshamid als Auslöser. Beide erstgenannten Arzneimittel wurden bereits 1963 bzw. 1986 vom Markt genommen. Seit der Einführung der Cystitisprophylaxe durch Uromitexan ist das durch Cyclophosphamid einhergehende Karzinomrisiko zu vernachlässigen. Die Bilharziose - Erreger Schistosoma haematobium - gilt in weiten Teilen Afrikas, v.a. Ägypten, und in den arabischen Ländern als Hauptursache für die Entstehung von Harnblasenkarzinomen. Die mechanische

Irritation der Schistosomaeier, die zur Plattenepithelmetaplasie führt, wie auch der meist damit einhergehenden Nachweis von Nitrosaminen gelten als Karzinom fördernd [14, 15]. Einen Zusammenhang zwischen chronisch rezidivierenden Harnwegsinfekten und der Ausbildung von Blasenkarzinomen gilt ebenfalls als gesichert [16, 17]. Hierbei gilt die zusätzliche Exposition von Zigarettenrauch und anderen Karzinogenen wie beispielsweise Phenacetin Risiko steigernd [18, 19].

1.1.2 Klinik

80% der Patienten mit einem Harnblasenkarzinom werden aufgrund einer Mikro- bzw. Makrohämaturie diagnostiziert. 15% der Patienten mit einer Makrohämaturie und 2-22% der Patienten mit einer Mikrohämaturie haben ein Harnblasenkarzinom [20]. Beide Symptome kommen intermittierend vor, was die Diagnostik bei einer Hämaturie erschwert. Einen Zusammenhang zwischen der Ausprägung der Hämaturie und dem Ausmaß der Tumorerkrankung besteht nicht. In manchen Fällen finden sich zystische Beschwerden wie Dysurie, Pollakisurie oder eine Urge-Symptomatik. Ebenso kann eine obstruktive Harnsymptomatik das klinische Bild prägen.

In Fällen eines fortgeschrittenen Karzinoms imponieren teilweise Flankenschmerzen aufgrund einer Hydronephrose, hervorgerufen durch eine uni- bzw. bilaterale Obstruktion des Ureterostiums. In schweren Fällen führt dies zur Pyelonephritis und zu Fieber.

Sind bereits hämatogene Metastasierungherde vorhanden, können Knochenschmerzen bei ossärer Infiltration bzw. Husten bei bronchialen Metastasen auftreten. Leberherde führen teilweise zu Veränderungen der Leberenzyme.

Bei einer lokalen Infiltration des Rektums bestehen Beschwerden beim Stuhlgang in Form von Diarrhöen und Obstruktionen.

1.1.3 Pathologie

Histologisch stellt die Schleimhaut des Nierenbeckens, der Ureteren, der Harnblase und des proximalen Anteils der Urethra eine Einheit dar. Sie ist ausgekleidet mit einem Übergangsepithel (Urothel). Maligne Tumoren in diesen Bereichen dominieren mit über 90% als Übergangsepithelkarzinome (Urothelkarzinome). Plattenepithelkarzinome kommen in ca. 7% und Adenokarzinome in ca. 1% vor [10]. Innerhalb der Blase treten 70% der Urothelkarzinome an der Hinter- bzw. Seitenwand auf. Im Trigonum/Blasenhalsbereich sind 20% lokalisiert. Am Blasendach wachsen 10% der Karzinome.

Die Mehrzahl der Urothelkarzinome wird als oberflächliche, lokalisierte Tumoren diagnostiziert. Nach der TNM-Klassifikation zählen hierzu Ta und T1 Tumoren und das Carcinoma in situ (Tis, CIS). Ta Tumoren sind auf das Urothel beschränkt, haben einen exophytischen, papillären Aufbau und penetrieren nicht die Lamina propria bzw. den Detrusormuskel. Im Gegensatz dazu penetrieren T1 Tumoren die Lamina propria und wachsen somit invasiv. Wächst das Urothelkarzinom in tiefere Schichten und penetriert Muskelanteile spricht man von ≥T2 Tumoren. Das Carcinoma in situ ist ein niedrig differenziertes Karzinom des Urothels, jedoch mit einem flachen, nicht-papillären Aufbau. Es kann lokalisiert oder diffus wachsen und geht in der Mehrzahl der Fälle mit papillären Tumoren einher. Im Gegensatz zu papillär wachsenden Tumoren erscheint die Mukosa des Tis gerötet und samtartig, kann jedoch in manchen Fällen von der restlichen gesunden Schleimhaut nicht zu unterscheiden sein.

Neben epithelialen Tumoren treten in seltenen Fällen mesenchymale Tumoren auf. Diese können sowohl in benigner (Fibrom, Myxom, Leiomyom, Hämangiom, Neurofibrom, Neurinom), als auch maligner Form (Leiomyosarkom, Fibrosarkom, Rhabdomyosarkom, retikuloendotheliale Tumoren) vorkommen. Sie sind äußerst selten.

Ebenso können sekundäre Tumoren durch Infiltration aus anderen Organen (Prostata, Kolon, weibliche Genitale) oder auch durch Metastasierung in der Harnblase zu finden sein.

1.1.4 Staging

Für das Harnblasenkarzinom existiert, wie für die meisten humanen Malignome, eine einheitliche und genaue Definition durch die Union Internationale Contre le Cancer (UICC) anhand der pTNM-Klassifikation von 2002. Sie beruht auf der pathologischen Beurteilung von drei Komponenten: a) die histologische/makroskopische Ausdehnung des Primärtumors, b) die histologische Untersuchung von ≥8 regionären Lymphknoten sowie c) dem histologischen bzw. zytologischen Nachweis von Fernmetastasen. Die regionären Lymphknoten werden vom kleinen Becken entlang der Aa. Iliacae internae und externae, des N. obturatorius sowie perivesikal entnommen. Die häufigsten Lokalisationen von Fernmetastasen sind Lunge, Skelett und Leber. Fakultativ kann das Vorliegen bzw. Fehlen einer Lymphangiosis carcinomatosa (pL0 vs. pL1) oder einer Hämangiosis carcinomatosa (pV0 vs. pV1) angegeben werden. Eine genaue Gliederung des pTNM-Systems ist in Tabelle 1 gezeigt.

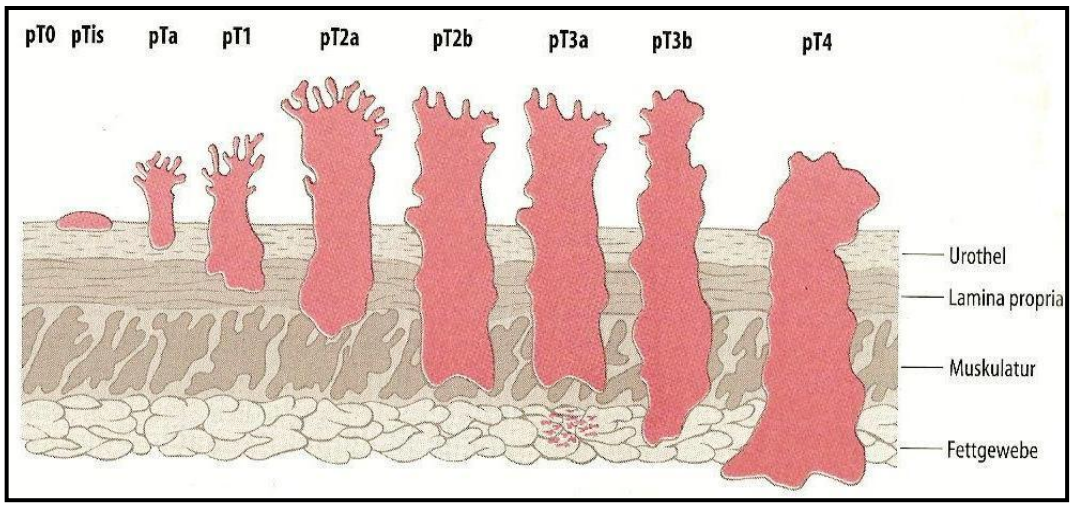

Abbildung 1: Wachstumsmuster TCC

Schematische Darstellung des Tumorwachstums beim Harnblasenkarzinom (aus Hautmann, Huland, Urologie, 2004, p. 204).

pT	Primärtumor
pTX	Primärtumor nicht beurteilbar
pT0	Kein Anhalt für ein Karzinom
pTa	Nichtinvasives papilläres Karzinom
pTis	Carcinoma in situ
pT1	Invasion der Lamina propria
pT2	Invasion der Detrusormuskulatur
pT2a	Innere Muskelhälfte
pT2b	Äußere Muskelhälfte
pT3	Invasion von perivesikalem Gewebe
pT3a	Mikroskopische Invasion
pT3b	Makroskopische Invasion
pT4	Invasion angrenzender Organe
pT4a	Prostata, Uterus, Vagina, Rektum
pT4b	Becken- oder Bauchwand
pN	**Regionäre Lymphknoten**
pNX	Regionäre Lymphknotenmetastasen nicht beurteilbar
pN0	Keine regionären Lymphknotenmetastasen
pN1	Solitäre Lymphknotenmetastasen ≤2 cm
pN2	Solitäre oder multiple LK-Metastasen >2 cm und ≤5 cm
pN3	LK-Metastasen >5 cm
pM	**Fernmetastasen**
pMX	Fernmetastasen nicht beurteilbar
pM0	Keine Fernmetastasen
pM1	Fernmetastasen

Tabelle 1: TNM-Klassifikation für Harnblasenkarzinome (2002).

1.1.5 Grading

Unter Grading versteht man den Differenzierungsgrad eines Tumors. Im Allgemeinen werden Tumoren als „hoch-, mäßig-, niedrig- und entdifferenziert“ eingestuft. Grundlage der mikroskopischen Begutachtung bildet eine Vielzahl von Kriterien. Hierzu zählen beispielsweise die Mitosenrate, die Kern-Plasma Relation, die Kerngröße und –polymorphie, die Architektur usw.

Das Grading System urothelialer Tumoren wird von der WHO (World Health Organisation) bestimmt und war bei urothelialen Tumoren in den letzten Jahren einem steten Wandel unterworfen. Das langjährige Grading-System der WHO

von 1973 [21] wurde 1998 [22, 23] durch ein neues System, herausgegeben von der WHO und der ISUP (International Society of Urological Pathology), ersetzt. Als Folge der mangelnden Akzeptanz wurde das neu eingeführte System durch die WHO im Jahre 2004 [24] modifiziert. Das Grading bei Urothelkarzinomen gilt hauptsächlich für oberflächliche Harnblasenkarzinome, da es ein wichtiges Kriterium für die Therapie und bei der Prognoseabschätzung darstellt. Invasive Harnblasenkarzinome gelten prinzipiell als niedrig differenziert. Das neue System soll die Diagnose hinsichtlich des Risikoprofils vereinheitlichen. Jedoch regt die *European Association of Urology* (EAU) in ihren Richtlinien von 2007 an, sowohl die Nomenklatur von 1973 als auch die von 2004 gemeinsam zu verwenden bis genügend valide Daten anhand des neuen Grading-Systems gesammelt und vorgestellt sind. Aus diesem Grund werden beide Differenzierungssysteme hier vorgestellt (Tabelle 2 und 3). Diese Dissertation bezieht sich auf das WHO Grading von 1973, da alle Tumoren durch Pathologen anhand dieser Kriterien beurteilt wurden.

Flache Läsionen	Hyperplasie (auch papillär)[a] Reaktive Atypie[a] Atypie unklarer Signifikanz[a] Dysplasie[b] Carcinoma in situ[c]
Papilläre Läsionen	Papillom[a] Papillom vom invertierten Typ[a] PUNLMP (papillary urothelial neoplasm of low malignant potential)[c] Gut differenziertes papilläres Karzinom[c] Schlecht differenziertes papilläres Karzinom[c]
[a] Benigne Läsion [b] Präneoplastische Veränderung [c] Maligne Läsion	

Tabelle 2: Klassifikation nicht invasiver urothelialer Tumoren (WHO 2004) [24].

G0	Papillom
G1	gut differenziert
G2	mäßig differenziert
G3	wenig differenziert

Tabelle 3: Klassifikation der Tumordifferenzierung bei Urothelkarzinomen (WHO 1973) [21].

1.1.6 Rezidiv- und Progressionsverhalten

Die Mehrzahl der Patienten, ca. 70-80%, zeigt bei Diagnosestellung oberflächliche Tumoren der Stadien pTa, pT1 oder Tis. Die Wahrscheinlichkeit einer histologischen Fehlinterpretation bei Tumoren der Stadien Ta/T1 G3 und dem damit verbundenen Vorliegen eines bereits muskelinvasiven Tumors liegt bei 10% [25, 26]. Dies ist von Bedeutung, da sich Prognose und Therapie muskelinvasiver von nicht muskelinvasiven Tumoren beträchtlich unterscheiden.

Charakteristisch für oberflächliche Harnblasenkarzinome sind das hohe Rezidiv- und Progressionsrisiko. So rezidivieren ca. 35% der PUNLMP (papillary urothelial neoplasm of low malignant potential, Tabelle 2) und 50% der gut differenzierten papillären Karzinome. Das Progressionrisiko liegt bei knapp 4% bzw. 10% [27]. Andere Autoren beschreiben ein Rezdivrisiko von bis zu 70% und ein Progressionsverhalten von bis zu 25% [28]. Tatsächlich hängt das Risikoprofil von verschiedenen Faktoren ab. Um unabhängig voneinander das Kurzzeit- bzw. Langzeitrisiko für die Rezidivneigung bzw. dem Progressionsrisiko zu ermitteln, hat die *European Organisation for Research und Treatment of Cancer* (EORTC) einen Evaluationsbogen entwickelt. Dieser basiert auf prognoseempfindlichen Parametern [29] (Tabelle 4). Die dazugehörige Risikotabelle zeigt Tabelle 5.

Parameter	Rezidiv	Progression
Anzahl der gefunden Tumoren		
Einer	0	0
2 bis 7	3	3
≥ 8	6	3
Tumordurchmesser		
< 3 cm	0	0
≥ 3 cm	3	3
Vorhergehende Rezidivrate		
Ersttumor	0	0
≤ 1 Rezidiv / Jahr	2	2
> 1 Rezidiv / Jahr	4	2
pT-Stadium		
Ta	0	0
T1	1	4
Carcinoma in situ vorhanden		
Nein	0	0
Ja	1	6
Tumor-Grading (WHO 1973)		
G1	0	0
G2	1	0
G3	2	5
Gesamtzahl	0 - 17	0 - 23

Tabelle 4: EORTC Fragebogen zur Evaluation des Rezidiv- bzw. Progressionsrisikos [29].

Punktzahl – Rezidiv	1-Jahres Risiko	5-Jahresrisiko
0	15%	31%
1-4	24%	46%
5-9	38%	62%
10-17	61%	78%
Punktzahl – Progression	**1-Jahres Risiko**	**5-Jahres Risiko**
0	0.2%	0.8%
2-6	1%	6%
7-13	5%	17%
14-23	17%	45%

Tabelle 5: Wahrscheinlichkeiten des Auftretens von Rezidiven bzw. einer Tumorprogression anhand der EORTC Evaluationstabelle [29].

1.1.7 Diagnostik

Die Zystoskopie und Urinzytologie stellen heute den „Goldstandard“ zum Nachweis eine Harnblasenkarzinoms dar [30]. Die Blasenspiegelung dient sowohl der Inspektion als auch der Resektion tumoröser Läsionen. Sie stellt somit einerseits ein diagnostisches Hilfsmittel als auch eine therapeutische Option dar. Relativ neu ist die Kombination aus Zystoskopie und Fluoreszenzdiagnostik. Unter anderem wird hierbei die 5-Aminolävulinsäure (5-ALA) in Kombination mit Blaulicht verwendet. Diese Methodik hebt, im Gegensatz zu der reinen Verwendung von Weißlicht, tumoröse Areale, insbesondere flache Läsionen und das Carcinoma in situ farbig hervor. Zwei multizentrische, randomisierte Phase-III-Studien beschrieben eine signifikante Reduktion der Residualtumorrate nach transurethraler Resektion (TUR) unter Verwendung der Fluoreszenzdiagnostik gegenüber der Resektion unter Weißlicht [31, 32].

Zweiter wichtiger Eckpfeiler beim Tumornachweis ist die Urinzytologie. Die hierbei verwendeten Zellen werden entweder durch Spontanurin oder mit Hilfe einer Blasenspülprobe gewonnen. Anschließend wird die Probe unter dem Mikroskop begutachtet. Ihr wird zwar eine gute Spezifität zugesprochen, zeigt jedoch Mängel in der Sensitivität, besonders beim Nachweis hoch differenzierter Tumoren [33].

Bildgebende Verfahren spielen im Nachweis von Harnblasenkarzinomen eine weniger entscheidende Rolle. Angewendet werden Ultraschall, i.v.-Pyelographie, Computertomographie (CT) und Magnetresonanztomographie (MRT). Der Ultraschall ist das am häufigsten angewandte Verfahren. Es vermittelt einen orientierenden Blick auf Nieren und Harnblase. Die i.v.-Pyelographie kommt vor allem dann zum Einsatz, wenn Tumoren des Harntraktes oberhalb der Blase vermutet werden. CT und MRT kommen bei fortgeschrittenen Harnblasentumoren zum Nachweis von Metastasen und als Verlaufskontrollen zum Einsatz. Sowohl CT als auch MRT erkennen eine mikroskopische Infiltration von regionären Lymphknoten in ca. 70% der Fälle nicht [34-36]. Somit unterscheidet sich die Genauigkeit beider Methoden beim

Lymphknoten-Staging nicht wesentlich [36, 37]. Die einzige Methode zum sicheren Ausschluss einer Lymphknoteninfiltration ist die operative Lymphadenektomie.

1.1.8 Therapie

Die Behandlungsoptionen beim Harnblasenkarzinom hängen primär von dessen Stadium ab. Die hier vorgestellten Therapieempfehlungen orientieren sich an den EAU-Richtlinien.
Das Ziel der Behandlung bei oberflächlichen Harnblasenkarzinomen ist das tumorfreie Langzeitüberleben und die Erhaltung einer funktionsfähigen Blase. Primäre Behandlungsoption ist die transurethrale Resektion (TUR) mit Kaltbiopsie des Tumors und mindestens 4 randomisierte Biopsien aus makroskopisch nicht tumorbefallenen Arealen. Unmittelbar postoperativ wird die Instillation mit einem Chemotherapeutikum (Mitomycin, Epirubicin oder Doxorubicin) empfohlen [38, 39]. Ob der Patient anschließend einer Rezidivprophylaxe zugeführt wird hängt von dessen tumorbedingten Risikofaktoren ab. Diese können mit Hilfe des EORTC Evaluationsbogens (siehe Kapitel 1.3.5) abgeschätzt werden. Zur Rezidivprophylaxe bzw. Progressionsverhinderung stehen sowohl oben genannte Chemotherapeutika, als auch das Immuntherapeutikum BCG (Bacillus Calmette-Guérin), welches ebenfalls als Tuberkuloseimpfstoff dient, zur Verfügung. Sie werden als sog. Instillationstherapeutika direkt in die Blase appliziert. Indiziert sind sie vorrangig bei niedrig differenzierten Tumoren (G3, Tis). Ebenfalls wird bei diesen Tumoren eine transurethrale Nachresektion 4-6 Wochen nach initialer Therapie empfohlen. Optional kann die Durchführung einer Zystektomie diskutiert werden. Ob nach der Diagnose eines pT1G3 Tumors eine sofortige Zystektomie eingeleitet werden soll oder ob man sich für die anschließende Immuntherapie entscheidet ist Grundlage einer kontrovers geführten Diskussion und bleibt letztlich dem behandelnden Arzt überlassen. Das Carcinoma in situ ist gekennzeichnet durch seine hohe Progressionsrate von ca. 75% [10]. Es tritt häufig als Begleiterscheinung bei papillären Tumoren auf, selten als

Primärtumor. Nach Abtragung durch TUR schließt sich obligat eine Rezidivprophylaxe durch BCG Applikation an. Erweist sich das CIS als therapierefraktär oder kommt es unter der Therapie zum Rezidiv, sollte eine Zystektomie in Erwägung gezogen werden.

Etwa 20% - 30% der Patienten mit der Diagnose eines Urothelkarzinoms der Harnblase präsentieren sich mit einem muskelinfiltrierenden Wachstum. Dabei weisen diese Tumoren keine hoch differenzierten Anteile mehr auf. Somit spielt dieses, bei oberflächlichen Harnblasenkarzinomen wichtige Kriterium, für die Therapie und Prognose keine Rolle. „Goldstandard“ beim muskelinvasiven Harnblasenkarzinom (pT2-4, N0-X, M0) ist die radikale Zystektomie. Bei dieser Operation werden neben der Harnblase die vordere Vaginalwand, die Adnexe, die Gebärmutter und ggf. die Urethra bei der Frau entfernt. Beim Mann werden zusätzlich die Prostata und die Samenblasen entfernt. Sollte der Tumor in die Urethra eingewachsen sein, müssen auch hierbei Teile der Harnröhre reseziert werden [10, 40]. Neben der Entfernung der Harnblase kommt der obligatorisch durchgeführten Lymphadenektomie eine besondere Bedeutung zu. Durch sie kann einerseits eine prognostische Beuteilung der Erkrankung besser vorgenommen werde, bildgebende Verfahren haben eine beschränkte Aussagekraft, andererseits besitzt sie einen kurativen Charakter bzw. verbessert sie die Prognose [41, 42]. Neben der radikalen Zystektomie werden weitere Optionen diskutiert. So gilt nach den EAU-Richtlinien die alleinige Strahlentherapie beim pT2-3N0M0 Tumor ebenfalls als kurativer Ansatz. Des Weiteren profitieren Patienten von einer adjuvanten Chemotherapie, sofern ein extravesikales Tumorwachstum vorliegt. Die Blasenteilresektion wird nur in wenigen Fällen durchgeführt. Ihr Einsatz beschränkt sich auf wenige Indikationen[20].

Das metastasierte Harnblasenkarzinom galt lange Zeit als inkurabel. Komplette Remissionen waren die Ausnahme. Durch die Einführung chemotherapeutischer Kombinationen konnte die Prognose erheblich verbessert werden. MVAC (Methotrexat, Vinblastin, Doxorubicin, Cisplatin) und CMV (Cisplatin, Methotrexat, Vinblastin) galten lange Zeit als Standardtherapie. Die Gesamtansprechrate, d.h. eine Reduktion der Tumorlast um mindestens

50%, liegt zwischen 50-70%. Komplette Remissionen treten bei 15-25% auf [43-45]. Jedoch darf nicht unerwähnt bleiben, dass die Mehrzahl der Patienten noch innerhalb des ersten Jahres ein Rezidiv erleidet. Das mediane Überleben beträgt 12 Monate. Die Überlebensrate nach 6 Jahren beträgt nur 3,7% [46]. In einer weltweit durchgeführten, prospektiven und randomisierten Studie wurde das etablierte MVAC-Schema dem aussichtsreichen GC-Schema (Gemcitabine, Cisplatin) gegenübergestellt [47]. Hierbei zeigte sich kein signifikanter Unterschied bezüglich der Gesamtüberlebenszeit und des tumorprogressionsfreien Überlebens. Jedoch zeigte Gemcitabine/Cisplatin eine bessere Verträglichkeit. Aufgrund der Vorteile im Toxizitätsprofil bei gleicher Wirksamkeit gegenüber MVAC hat es sich als die neue Standardkombination etabliert.

1.2 Hyaluronsäure und Hyaluronidasen

1.2.1 Hyaluronsäure (HA)

Das Glykosaminoglykan (GAG) Hyaluronsäure wurde zuerst von Meyer und Palmer im Jahre 1934 aus dem Glaskörper des Auges isoliert [48]. GAGs werden durch lineare Verbindung von Disacchariden aufgebaut. Die Hyaluronsäure besteht aus zwei Glukosederivaten, der D-Glucuronsäure und dem N-Acetyl-D-glucosamin, verbunden durch β-glykosidische Bindungen. HA liegt als amphipathische Helix vor und ist als einziges GAG nicht an ein Proteinzentralfilament gebunden. Die HA-Polymere, welche typischerweise länger sind als die anderer Glykosaminoglykane (Heparin, Chondroitinsulfat, Keratansulfat) schwanken in ihrer Größe zwischen 10^3 und 10^7 Da [49, 50].
Im Gegensatz zu anderen Glykosaminoglykanen wird die Hyaluronsäure nicht im Golgi-Apparat, sondern an der zytoplasmatischen Oberfläche der Plasmamembran mit Hilfe von 3 verschiedenen Hyaluronsäure-Synthetasen (HAS1,2&3) aufgebaut [51]. Bereits während des Syntheseprozesses wird das entstehende Molekül in aktiver Weise durch ein MDR-Transport System (multi-drug resistance) in den Extrazellulärraum transportiert [52]. Umgekehrt wird das

HA-Molekül über drei unterschiedliche Mechanismen abgebaut. Entscheidender Mechanismus ist dabei die zelluläre Einverleibung der HA-Moleküle, vermittelt durch zelluläre Oberflächenrezeptoren (CD44 & RHAMM) und dem daraufhin aktiv werdenden Enzym Hyaluronidase, welches die Hyaluronsäure in Stücke schneidet [53-55].

Größe, Lokalisation, Konzentration und die Interaktion mit anderen Proteinen sind in Bezug auf die funktionellen Aspekte der Hyaluronsäure entscheidend [56]. Große HA-Polymere werden vorwiegend im Extrazellulärraum (EZR) als strukturbildende Elemente vorgefunden. Sie können mittels Hydratisierung eine Raumbeanspruchung einnehmen, welche in Relation mit dem ursprünglichen Volumen des Moleküls um ein Vielfaches gesteigert ist. Selbst bei niedrigen Konzentrationen bildet sich dadurch ein visköses Gel. Es dient als biologisches Schmiermittel in Gelenken, in der Nabelschnur und im Glaskörper des Auges. Kleinere HA-Polymere sind vorwiegend im Zytoplasma der Zellen zu finden. Sie sind involviert in die intrazelluläre Nachrichtenübermittlung bei Immunstimulationsprozessen, Entzündungsgeschehen und in der Angiogenese [53, 57, 58]. Neben der Tatsache, dass die Hyaluronsäure Bestandteil der peri- und extrazellulären Matrix ist, wird sie eingebunden in die Regulation von Zellproliferation, -migration und –adhäsion. Unter diesen Gesichtspunkten nimmt sie eine wichtige Funktion in der embryonalen Entwicklung ein. Die Überproduktion von HA kann zur epithelial-mesenchymalen Transition (EMT) unter Aneignung transformierter Eigenschaften in phänotypisch normalen epithelialen Zellen führen [59, 60]. Unter der EMT versteht man ein Entwicklungsprogramm biologischer Zellen, das charakterisiert ist als Verlust von Zelladhäsion, Hemmung der E-Cadherin Expression und einer verstärkten Zellmobilität. Die EMT ist Grundlage zahlreicher Entwicklungsprozesse wie beispielsweise der Formierung von Mesoderm oder der Neuralleiste.

Die Vielzahl von Interaktionsmöglichkeiten der Hyaluronsäure basiert auf der großen Anzahl von Proteinen, die mit ihr eine Verbindung herstellen können. Sie sind sowohl extra- als auch intrazellulär zu finden und werden Hyaladherine genannt. Die wichtigsten Vertreter von Hyaladherinen sind der CD44 und der RHAMM Rezeptor (receptor for hyaluronic acid mediated motility) [49, 61]. Erst

genannter ist beteiligt an Zelladhäsion, Zellproliferation, Migration und Angiogenese [55, 62, 63]. Er ist zellmembrangebunden und kommt in vielen verschiedenen Varianten vor. Wird er glykolysiert, vermittelt er der Zelle eine Vielzahl an Funktionen [64]. RHAMM ist hauptsächlich in Prozesse der Signalübertragung zwischen Zellen involviert. Er wird ubiquitär im Nukleus, Zytosol und an der Membran von Zellen gefunden. Daneben kommt er auch extrazellulär vor [65]. Ein weiteres Hyaladherin ist ICAM-1 (intracellular adhesion molecule - 1). Es ist ein IgG-artiges Adhäsionsmolekül, welches in verschiedenen Zelltypen gefunden wird und im Zusammenhang mit Entzündungsprozessen steht [66]. Interessanterweise wurde eine aberrierte Expression von CD44, RHAMM und ICAM-1 in direkter Assoziation mit dem malignen Potential verschiedener Tumorentitäten, insbesondere das des Harnblasenkarzinoms, gefunden [67-69]. Andere Hyaladherine wie Aggrecan, Versican, Brevican, Fibrinogen, Neurogen und Hyaluronectin sind extrazelluläre Gerüstproteine, verantwortlich für die Aufrechterhaltung der Matrixintegrität über Interaktionen mit dem HA-Molekül. Erhöhte Hyaluronectin Werte im Gewebe wurden darüber hinaus im Bronchial-, Mamma- und Kolonkarzinom gefunden [70-73]. Dies impliziert einen Zusammenhang zwischen der Abhängigkeit der Hyaluronsäure und der Übertragung verschiedenster Funktionen an die HA-gebundenen Proteine während der Tumorgenese.

Tumorinfiltration, Metastasierung und die Bildung neuer Gefäße abhängig vom HA-Expressionslevel konnten in zahlreichen Geweben wie Kolon-, Ovarial-, Mamma-, Uterus-, Harnblasen- und Prostatakarzinomen nachgewiesen werden [74-77]. Unsere Arbeitsgruppe konnte darüber hinaus zeigen, dass kleine HA-Fragmente (Disccharaid-Einheiten von 3-25 Länge) eine entscheidende Rolle spielen. Sie fördern die endotheliale Zellproliferation und –adhäsion und somit die Neubildung von Gefäßen [78]. Ebenso zeigte sich, dass die Überexprimierung der Hyaluronsäure zur Entwicklung der EMT führt und dadurch die Transition von niedrig zu hoch differenzierten Harnblasenkarzinomen fördert. Ähnliches ließ sich ebenfalls in Prostatakarzinomen beobachten [79, 80]. Erhöhtes Auftreten von HA im Tumorgewebe fördert die Proliferation, Migration und Tumoradhäsion.

Gleichzeitig vermindert es die Kontaktinhibition von Zellen sowie die immunologische Kontrolle [79, 81-83].

1.2.2 Hyaluronidasen (HAase)

Die Hydrolyse der Hyaluronsäure wird von einer Gruppe von Enzymen katalysiert, die als Hyaluronidasen bezeichnet werden. Diese Endoglykosidasen kommen in einer Vielzahl von Geweben vor (Milz, Haut, Auge, usw.). Sie sind u.a. Bestanteil von Lysosomen, bakteriellen Toxinen, sowie des Schlangen- und Bienengifts [84]. Im menschlichen Erbgut wurden bislang 6 verschiedene Hyaluronidasen isoliert. Interessanterweise sind sie in 2 Gengruppen angeordnet. Die HYAL1-, HYAL2- und HYAL3-Gene werden auf Chromosom 3 (3p21.3) gefunden. Dahingegen sind HYAL4, HYALP1 und PH20 auf Chromosom 7 (7q31.3) lokalisiert [85]. Von den 6 Vertretern der Hyaluronidasen sind insbesondere HYAL1 und HYAL2 beim Harnblasenkarzinom von Bedeutung. Sie sind in überwiegendem Maße in somatischen Geweben vorzufinden und im speziellen für die Spaltung der β1-4 glykosidischen Bindungen in der Hyaluronsäure verantwortlich [86]. Die Spaltungsvorgänge durch die beiden Hauptvertreter der Hyaluronsäuren HYAL1 und HYAL2 erfolgen in einer schnellen Sequenz bis die Hyaluronsäure eine Länge von ca. 20 kDa erreicht (ca. 50 Saccharide). Dann nimmt die Affinität beide Enzyme zum HA-Molekül ab. Im Gegensatz zu HYAL2 behält das HYAL1 Enzym eine genügend hohe Bindungsaffinität, um die restlichen HA-Fragmente bis auf Tetrasacchariden zu verkleinern [86, 87].
Ähnlich der Hyaluronsäure konnte man in diversen Studien eine erhöhte Expression der Hyaluronidase in Embryonal- sowie Regenerations- bzw. Wundgewebe nachweisen. Des Weiteren tritt sie in verstärktem Maße bei Vaskulitiden und in Tumoren auf [76, 80, 84, 88-95]. Der sie umgebende pH-Wert spielt eine wichtige Rolle in der Aktivität der Hyaluronidasen. Aufgrund dessen werden sie zwei Gruppen zugeordnet, einer sauren und einer neutralen. HYAL1 gehört zur sauren Gruppe. Ihr pH-Wert Optimum liegt zwischen 4,0 und

4,3. Schon bei einem pH-Wert von 4,5 verliert sie ca. 20% an Aktivität, bei einem pH-Wert von 5,0 ca. 50% [96].

Die Rolle der Hyaluronidasen in der Tumorentstehung ist unklar und wird kontrovers diskutiert. Lange Zeit galten sie als reine Tumorsuppressorgene. Belege dafür lieferten zahlreiche Veröffentlichungen [97-99]. Erst 1996 erschienen erste Studien, welche die Hyaluronidasen als Onkogene postulierten. Lokeshwar *et al.* konnten beispielsweise 3- bis 10-fach erhöhte HAase Werte in Prostatakarzinomgewebe nachweisen. Die dabei gemessenen Werte korrelierten mit dem Tumorgrad [100]. Im selben Jahr postulierten Liu *et al.* nach *in vivo* Experimenten mit verschiedenen Zelllinien, dass die verstärkte Expression von Hyaluronidase, Zellen zur Angiogenese und somit zur verstärkten Ausdehnung befähigen konnten [101]. In der Zwischenzeit ist eine beachtliche Literatur entstanden, die belegt, dass die erhöhte Expression von HYAL1 mit einem aggressiven Tumorwachstum und einer schlechten Prognose verbunden ist. Interessanterweise findet man in der Literatur diese Charakteristika auch für Tumoren, bei denen die Hyaluronidase bereits vorher als Tumorsuppressor postuliert wurde, so beispielsweise für das Mammakarzinom und Gehirntumoren [102, 103].

Durch alternatives Splicing bei der Transkription können aus demselben DNA Abschnitt unterschiedliche mRNA Moleküle entstehen. Bisher wurden 5 Varianten des originalen HYAL1-Gens isoliert. Welche Bedeutung sie haben und welche Funktionen sie übernehmen ist bisher weitgehend unklar. In einer ersten Studie wurde die Splice-Variante 1 des HYAL1-Gens (HYAL1-v1) untersucht. Es ist von Interesse, da es sich lediglich um 30 Aminosäuren vom originalen HYAL1 unterscheidet. Ebenso wird es im Bienengift vorgefunden. Eingeschleust in Blasenkarzinomzellen führt es zu deren verringerter Proliferation durch Stopp des Zellzyklus. Des Weiteren konnte eine vermehrte Apoptose beobachtet werden. Als Fremdtransplantat in Mäusen wuchsen HYAL1-v1 Zellen langsamer. Gleichzeitig waren die entstandenen Tumoren weniger invasiv und hatten ein geringeres angiogenetisches Potential [104].

1.3 Fragestellung der vorliegenden Arbeit

Wie bereits beschrieben stellt das Harnblasenkarzinom eine häufige Diagnose dar. Alleine in Deutschland erkranken jährlich 15´000 Menschen daran [3]. Obwohl die meisten Patienten in lokalisierten Stadien erkannt werden und eine gute Überlebensprognose haben, besteht immer ein individuell nicht abzuschätzendes Rezidiv- und Progressionsrisiko. Gerade die hohe Rezidivneigung macht diesen Tumor zu einer für die Patienten unberechenbaren, langwierigen und intensiven Erkrankung. Lange Nachsorgezeiträume mit immer wieder durchzuführenden Zystoskopien sind für die Patienten physisch und psychisch belastend. Durch die teilweise sehr intensive Nachsorge mit ständigen Kontrollen macht sich das Harnblasenkarzinom sozialökonomisch bemerkbar. 2,9 Milliarden Dollar verschlingt es jährlich in den USA [105]. Es ist daher von großem Interesse Tumormarker zu finden, welche erlauben die Krebsgeschwüre in einem sehr frühen Stadium zu erkennen. Damit könnten lange Nachsorgephasen verhindert werden. Ebenfalls wäre es wünschenswert Tumormarker an der Hand zu haben, die wie das PSA beim Prostatakarzinom, ein mögliches Rezidiv anzeigen können. Somit wäre es möglich, die Anzahl teurer und invasiver Blasenspiegelungen auf ein Minimum zu reduzieren.

Ein vielversprechender Tumormarker ist die Hyaluronsäure und dessen auf- und abbauende Enzyme. Voruntersuchungen haben bereits gezeigt, dass die Hyaluronsäure, die Hyaluronidase, hier in besonderem Maße HYAL1, im Harnblasengewebe erhöhte sind. Ziel der hiesigen Arbeit war, zu untersuchen, ob sich anhand immunhistologischer Kriterien eines oder mehrere dieser Moleküle eignen, um prognostische Aussagen treffen zu können. Unter Verwendung der Tissue-microarray-Technik wurde an einem großen Patientenkollektiv mit langer Nachsorgezeit retrospektiv untersucht, welchen Wert HA und HYAL1 in Bezug auf Rezidiv- bzw. Progressionsrisiko haben. Ebenfalls untersucht wurde HYAL1-v1, eine Splicingvariante der Hyaluronidase 1. Es ist die erste immunhistochemische Untersuchung dieses Tumormarkers an Harnblasenkarzinomgewebe.

2 MATERIAL UND METHODIK

Die vorliegende Studie erfolgte im Rahmen einer transatlantischen Kooperation zwischen den urologischen Kliniken der Universität Tübingen in Deutschland und der Miller School of Medicine in Miami, Florida, USA. Die wissenschaftliche Betreuung in den USA erfolgte durch Prof. Vinata Lokeshwar, PhD.

2.1 Datenerhebung des Patientenkollektivs

Eingeschlossen wurden Patienten, die zwischen 1993 und 2001 mit einer transurethralen Resektion der Harnblase (TUR-B) bzw. einer Zystektomie in der urologischen Klinik der Universität Tübingen bezüglich eines Harnblasenkarzinoms behandelt wurden. Die in die Studie eingeschlossenen Patienten wurden nach der Verfügbarkeit der Paraffinblöcke bzw. deren Eignung zur Herstellung von TMAs ausgewählt. Von ursprünglich 245 ausgewählten Patienten konnten aufgrund unvollständiger Informationen der Patienten- und Tumorcharakteristika sowie der mangels Follow-up Informationen 178 Patienten evaluiert werden.
Die Datenerhebung zur Komplettierung des Follow-ups erfolgte in Zusammenarbeit mit den nachsorgenden Hausärzten und Urologen anhand eines für diese Studie entwickelten Fragebogens. Die Untersuchung erfolgte nach den Richtlinien und mit Zustimmung der Ethikkommission der Universität Tübingen und der Miller School of Medicine der University of Miami (IRB = Institutional Review Board).
Die Ergebnisse wurden in einer *Microsoft Excel 2003*® Datenbank erfasst. Für die Erhebung des Follow-ups wurden folgende Patienten- bzw. Tumorcharakteristika ermittelt:

- Name, Vorname, Geburtsdatum, Geschlecht und Anschrift des Patienten
- Name und Anschrift des behandelnden Hausarztes und Urologen
- Operationszeitpunkt
- Postoperative histo-pathologische Tumorklassifikation (TNM)

- Differenzierungsgrad des Tumors (G)
- Anzahl der tumorösen Läsionen bei initialer TUR-B
- Vorliegen eines begleitenden Carcinoma in situ
- Angaben zur postoperativen Instillationstherapie
- Erfassung von Rezidiven
- Erfassung der Tumorprogressionen
- Ermittlung der Gesamtdauer des Follow-ups

Es wurde versucht, die Größe der Tumoren zu ermitteln. Dies scheiterte an der fehlenden Dokumentation bzw. an der Tatsache, dass häufig nur Gewebespäne bei einer TUR-B entnommen und histologisch aufgearbeitet werden.

2.2 Untersuchungsmaterial und TMA Herstellung

Die Gewebeproben in Form von Paraffinblöcken wurden uns freundlicherweise vom Institut für Pathologie der Universität Tübingen zur Verfügung gestellt. Anschließend wurde von jedem Block eine Hämatoxylin-Eosin Färbung (H&E) nach standardisierten Bedingungen angefertigt. Nach Begutachtung dergleichen wurden die geeigneten Blöcke zur manuellen Konstruktion von „Tissue Microarrays“ (TMA; Abbildung 2) ausgewählt.
Die Methode der Gewebeaufarbeitung mittels TMA bildet im Vergleich zur konventionellen Immunhistochemie die Basis für ein deutlich schnelleres und effizienteres Screening dar. TMAs wurden erstmals im Jahre 1998 beschrieben, als Kononen *et al.* bis zu 1000 Gewebeproben in einen einzigen Paraffinblock stanzten und davon 200 Schnitte anfertigten [106]. Bei der TMA Technik muss die manuelle von der automatischen Applikationen unterschieden werden. Mittels automatisierter Technik können bis zu 1000 Gewebeproben eingebracht werden, wohingegen die manuelle Applikation das Einbringen von bis zu 120 Proben erlaubt [107]. Die TMA-Technik ermöglicht die simultane Untersuchung einzelner Proteine in einer großen Anzahl verschiedener Gewebeproben. Somit werden Störgrößen, die durch die Färbung an verschiedenen Tagen auftreten, minimiert. Zudem können große Patientenkollektive schnell evaluiert werden,

was insbesondere für die Determinierung des prognostischen Werts biologischer Variablen valide Aussagen ermöglicht.

Abbildung 2: Tissue Microarray

Abbildung eines Tissue Microarrays nach Fertigstellung. Insgesamt wurden max. 120 Stanzen gesetzt, pro Patient minimal 3 und maximal 5.

Die in dieser Studie verwendeten Tissue Microarrays sind mit dem manuellen Tissue Arrayer (Beecher Instruments, Silver Springs, MD; Abbildung 4) angefertigt worden. Dabei wurden zunächst Stanzen von 0,6 mm Durchmesser in Abständen von 1,8 mm in einen reinen Paraffinblock (recipient block) gesetzt. Anschließend entnahm man mindestens 3 Gewebeproben vom Paraffinblock eines Patienten (donor block), um sie in die freien Stanzzylinder des „recipient block“ einzubringen. Zur besseren Orientierung wurden in gewissen Abständen Schweinemuskelproben eingebracht. Diese werden nach Anfärbung auf den Objektträgern zu Orientierungshilfen (Abbildung 3).

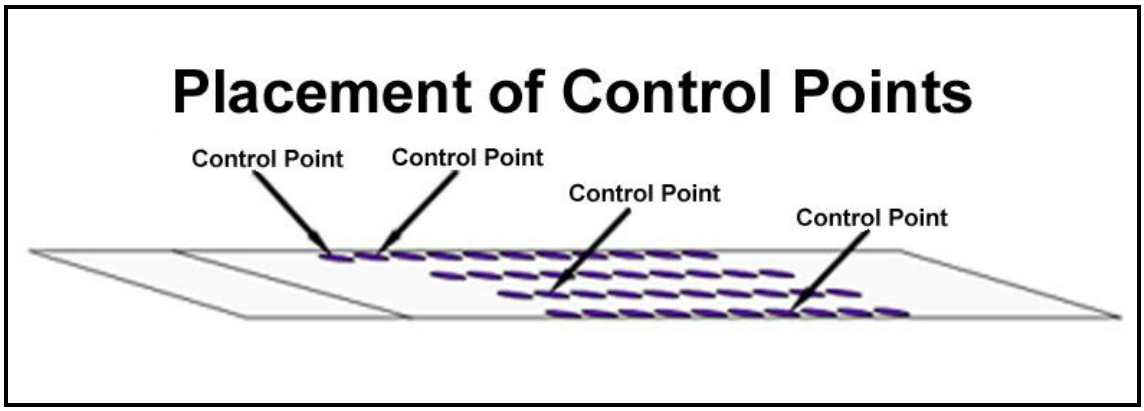

Abbildung 3: Placement of Control Points

Die in diesem Schema dargstellten „Control Points“ repräsentieren Stanzen aus Schweinemuskel. Sie werden eingefügt, um beim Ablesen der TMAs Orientierungshilfen zu haben.

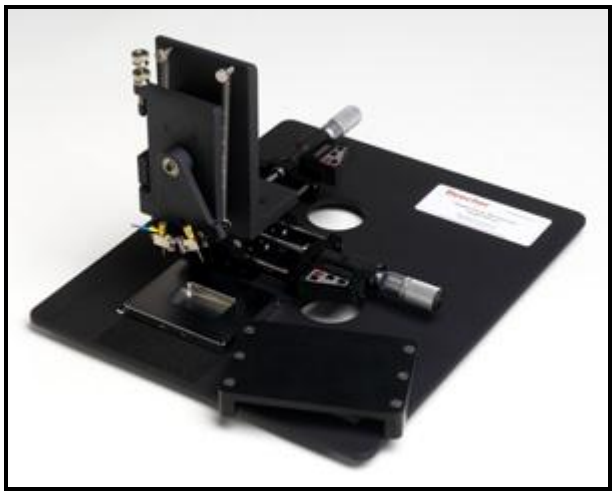

Abbildung 4: Microarrayer

Tissue Microarrayer (MTA I), Beecher Instruments, Inc., 686 Progress Way, Sun Prairie, WI, 53590, U.S.A.

Nach Anfertigung aller TMA-Paraffinblöcke wurden sie mittels Mikrotom (Rotationsmikrotom 1512, Leitz, Wetzlar) in 4 µm dicke Scheiben geschnitten. Nach erfolgter Glättung im Wasserbad (TFB 45, Medite GmbH, Burgdorf) bei 48°C wurden die Schnitte auf Superfrost-Plus-Objektträger (VWR, Cat.-No.:

48311-703) aufgebracht. Anschließend konnten sie der Trocknung in einem Wärmeschrank (ED 35, WTB Binder/Tuttlingen) bei 56°C für 30 Minuten zugeführt werden.

2.3 Immunhistochemie

Zur immunhistochemischen Analyse wurde in dieser Studie ein indirektes Nachweisverfahren, das der ABC-Methode (Avidin-Biotin-Complex), angewendet. Dabei bindet ein erster Antikörper (Primärantikörper) spezifisch, aber unkonjugiert an das zu erkennende Antigen. Im Folgeschritt bindet ein zweiter Antikörper (Sekundärantikörper) an den Primärantikörper. Der Sekundärantikörper, auch Brückenantikörper genannt, kann entweder mit Biotin bereits beladen sein (biotinyliert) oder muss in einem weiteren Schritt beladen werden. Bei Biotin handelt es sich um ein wasserlösliches Vitamin. Anschließend bindet sich Avidin an das Biotin. Avidin ist ein aus Hühnereiweiß gewonnenes Glykoprotein mit vier Bindungsstellen für Biotin. Ein verbessertes Avidin ist das Streptavidin, welches in dieser Studie eingesetzt wurde. Es wird aus dem Bakterium Streptomyces avidinii isoliert und ist in seiner Reaktion zum Biotin spezifischer. In dieser Studie wurde ein sog. Multi-Link-Antikörper als Sekundärantikörper verwendet. Dabei handelt es sich um eine Lösung, die sich aus Brückenantikörpern verschiedener Tierspezies (Maus, Kaninchen, usw.) zusammensetzt. Im letzten Schritt werden die Antikörperverbindungen durch die Zugabe von DAB (3,3'-Diaminobenzidin) kenntlich gemacht. Das DAB geht dabei mit dem Avidin-Biotin-Komplex eine enzymatische Reaktion ein, welche zur Farbreaktion führt. Die so entstehende bräunliche Färbung korreliert mit dem Vorhandensein des Produktes.

Die in dieser Studie verwendeten primären Antikörper waren HA (Hyaluronsäure), HYAL1 (Hyaluronidase 1) und HYAL1-v1 (Splicingvariante 1 der Hyaluronidase 1). Dabei stellte das HA kein Antikörper im eigentlichen Sinne dar. Es handelte sich hierbei um ein aus Nasenknorpel des Rindes isoliertes und biotinyliertes HA-Bindeprotein (1 µg/ml) [108]. HYAL1 (1 µg/ml) und HYAL1-v1 (1 µg/ml) wurden durch polyklonale Kaninchen-Antikörper der

Klasse IgG detektiert [79, 96, 104]. Alle eingesetzten Detektionsproteine wurden im Labor Dr. Vinata Lokeshwar (Miller School of Medicine, University of Miami, Florida, USA) hergestellt, geprüft und bereits in vorhergehenden Studien verwendet. In den immunhistochemischen Untersuchungen wurden entsprechende Negativ-Kontrollen ohne Primärantikörper, sowie Positiv-Kontrolle mit antigentragendem Gewebe inkubiert. Die Positiv-Kontrollen zeigten eine angemessene Immunreaktivität, während die Negativ-Kontrollen keine immunhistochemischen Reaktionen zeigten.

Die 4 µm Dicken Schnitte wurden zunächst für 3 Minuten bei 60°C angewärmt und anschließend für 15 Minuten in Xylol deparaffinisiert. Über eine absteigende Alkoholreihe (2 x 3 Minuten 100%, 2 x 3 Minuten 95%, 1 x 3 Minuten 90%) erfolgte die Rehydrierung des Gewebes. Nach einem kurzen Waschgang (1 Minute) in unbehandeltem Wasser (H_2O) erfolgte die Blockung der endogenen Peroxidaseaktivität durch 3%-iges Wasserstoffperoxid (10 Minuten). Danach wurden die Schnitte erneut in H_2O gewaschen (2 Minuten). Die Antigenmaskierung erfolgte bei 100°C für 23 Minuten in 10%-iger TRS (Target Retrieval Solution, 10x, DakoCytomation, S1699) unter Verwendung eines Dampfkochtopf.

Nach 20-minütiger Abkühlungsphase folgte die Blockung der endogenen Biotinaktivität. Um unspezifische Antikörperbindungen zu verhindern, wurden die Präparate mit einem Avidin-Biotin Blocking Kit (SP 2002, Vector Laboratories, Burlingame) behandelt. Hierzu wurden die Präparate zuerst 15 Minuten mit StreptAvidin D-Lösung behandelt und danach 1 x 5 Minuten in PBS (Phosphate buffered saline) gewaschen. Danach wurde für 15 Minuten die Biotinlösung aufgetragen und im Anschluss nochmals 1 x 5 Minuten in PBS gewaschen.

Es folgte das Auftragen des Primärantikörpers zur nächtlichen Inkubation (ca. 12 Stunden). Folgende Verdünnungen fanden Verwendung: HA – 1:2000; HYAL1 – 1:1250; HYAL1-v1 – 1:1250. Zur Antikörperverdünnung wurde ein kommerziell erworbenes und unspezifische Reaktionen verminderndes Medium verwendet (DAKO S3022 Antibody diluent with background reducing components). Die Inkubation erfolgte bei 4°C in einer feuchten Kammer. Das

HA-Bindeprotein wurde nicht über Nacht inkubiert. In diesem Fall wurden die Proben bis zum nächsten Morgen in PBS aufbewahrt und anschließend für 2 Stunden bei Raumtemperatur (ca. 21°C) inkubiert.
Nach erfolgter Inkubation wurden die Proben gründlich in PBS + 0,05%-igem Tween gewaschen. Anschließend wurden sie mit einem biotinyliertem Multi-Link-Antikörper (LSAB + System-HRP, DakoCytomation, K0690) für 30 Minuten inkubiert. Da es sich im Falle des HA-Bindeproteins um ein biotinyliertes Protein handelte, wurde dieser Schritt übersprungen. Nach erneutem gründlichem Waschgang mit PBS + 0,05%-igem Tween erfolgte die Inkubation mit Streptavidin (LSAB + System-HRP, DakoCytomation, K0690) für 30 Minuten. Diese Reaktion wurde durch einen letzten Waschgang mit PBS + 0,05%-igem Tween unterbrochen. Die nun hergestellte Streptavidin-Biotin Bindung wurde indirekt in einer enzymkatalysierten Substrat-Chromogen-Reaktion (Liquid DAB + Substrate Chromogen System, DakoCytomation, K3468) sichtbar gemacht. Folgende Inkubationszeiten fanden hierbei Verwendung: HA – 3 Minuten; HYAL1 – 2.30 Minuten; HYAL1-v1 – 2.30 Minuten. Im Anschluss wurden die Präparate in unbehandeltem Wasser gewaschen (4 Minuten). Anschließend wurden sie für 20 Sekunden mit Hämatoxylin (Surgipath, Harris Formula) zur Kontrastverstärkung gegen gefärbt und schließlich in unbehandeltem Wasser gewaschen (3 Minuten). Danach folgte die Dehydrierung mittels aufsteigender Alkoholreihe und Xylolbehandlung (1 x 3 Minuten 90%, 2 x 3 Minuten 95%, 3 x 5 Minuten 100%, 3 x 5 Minuten Xylol). Abschließend wurden die Objektträger mit Eukit (Kindler GmbH & Co, Freiburg) und einem Deckglas versehen.

2.4 Interpretation der histologischen Befunde

Die immunhistochemischen Ergebnisse wurden unabhängig und ohne Kenntnis der Patientendaten und der Ergebnisse der Follow-up Untersuchung ausgewertet. Lichtquelle und Blende wurden zu Beginn der Evaluation eingestellt und nicht verändert. Die Auswertung erfolgte unabhängig von drei Untersuchern (Mario Kramer, Roozbeh Golshani, Vinata Lokeshwar). Mit 89% Übereinstimmung waren die individuell ermittelten Ergebnisse sehr ähnlich.

Die Auswertung eines Patienten erfolgte anhand aller zu evaluierenden Stanzen. Waren alle drei oder zwei Stanzen auswertbar wurde der Mittelwert gebildet. War nur eine Stanze evaluierbar, wurde sie als repräsentativ angenommen. Für die Auswertung der jeweiligen Tumormarker wurde die Färbeintensität anhand einer semiquantitativen Skala in Stufen eingeteilt. Die verschiedenen Färbeintensitäten sind beispielhaft in Abbildung 5 dargestellt. Die semiquantitative Bewertung der Färbeintensität wurde mit Hilfe repräsentativer Vergleichsfärbungen ermittelt. Für die Referenzbilder wurde eine 160-fache Vergrößerung verwendet. Zur besseren Unterscheidung wurden jeweils auch Bilder mit 400-facher Vergrößerung herangezogen. Die Färbeintensität (0 bis +3) wurde anschließend zusammen mit dem relativen Anteil positiv für den jeweiligen Antikörper reagierender Zellen (Einteilung 0-100%) in einem Färbeindex (0-300) zusammengefasst (Abbildung 6) [107, 109].

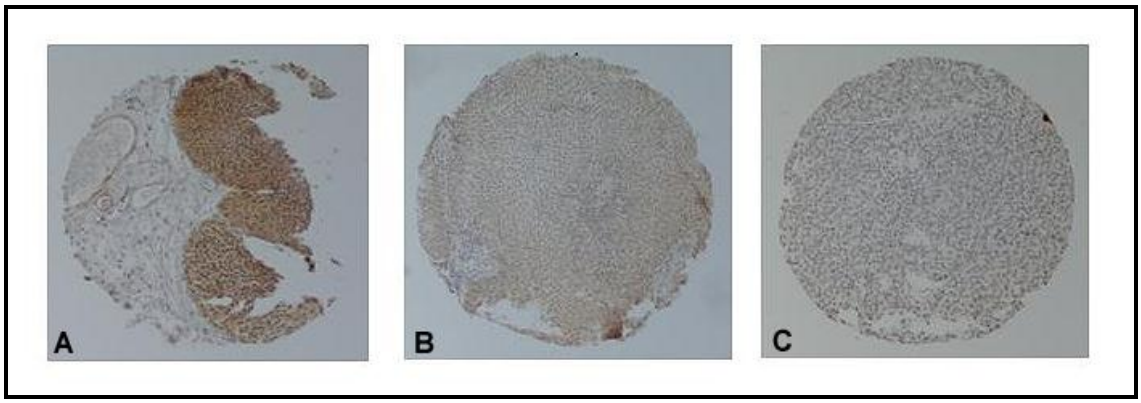

Abbildung 5: Farbintensitäten

Beispielhafte Darstellung verschiedener Farbintensitäten.
Beispiel A: 3+, B: 2+, C: 1+.

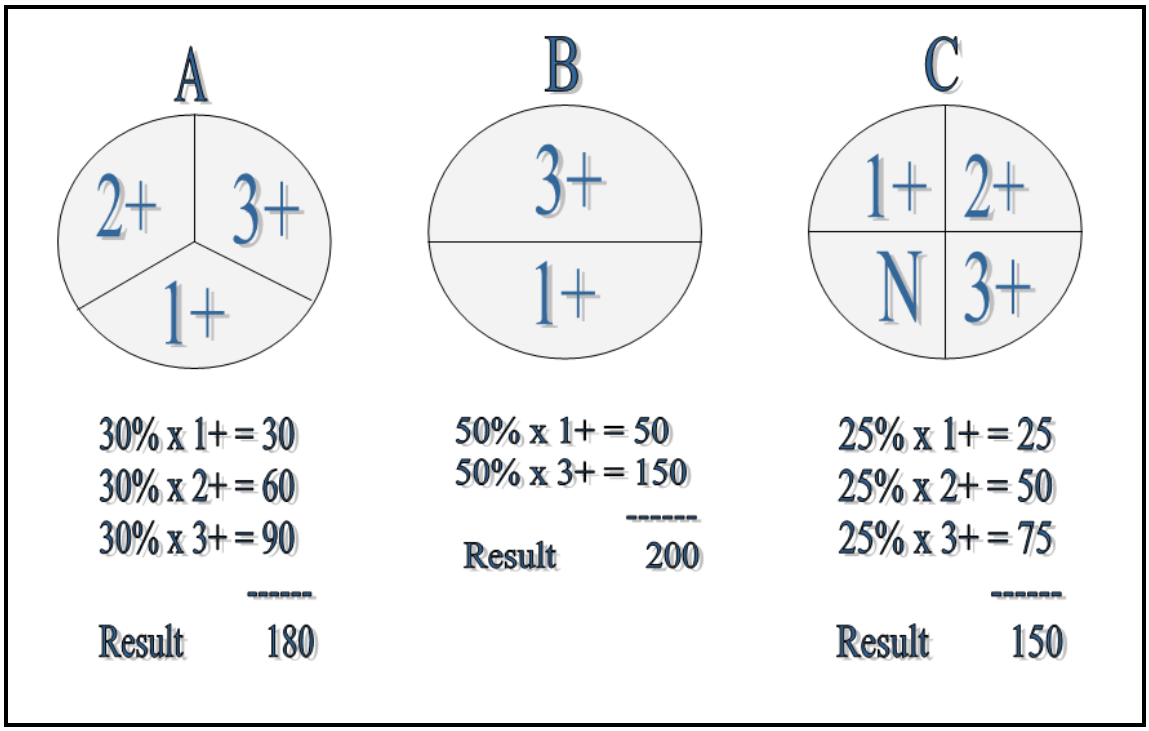

Abbildung 6: Kalkulation der Farbintensitäten

Beispiel zur Kalkulation der Farbintensitäten unter Einbeziehung des relativen Anteils gefärbter Tumorzellen. „A“ repräsentiert einen Tumor mit insgesamt 90% gefärbten Tumorzellen. Jeweils 30 sind mit 1+, 2+ und 3+ gefärbt. Im Ergebnis ergibt dies einen Färbeindex von 180. „N“ steht für nicht gefärbt.

2.5 Testverfahren und Computerprogramme

Die in Microsoft Excel 2003® erfassten Daten wurden in JMP 5.1 für Windows 95® und GraphPad Prism 5® exportiert. Zur Erfassung, ob sich die Daten parametrisch bzw. nicht-parametrisch verteilten, wurden die D’Agostino & Peason Omnibus Normality Tests durchgeführt. Da sich alle Daten als normalverteilt darstellten, kamen zur Chi-square Analyse vorrangig der Student’s t-test und das Oneway ANOVA Verfahren zu Anwendung. Bei der Analyse von Follow-up Informationen wie beispielsweise Rezidivneigung und Progressionsrisiko wurde die Kaplan-Meier Methode verwendet. Die Darstellung dieser Ergebnisse erfolgte mittels Mantel-Cox „Log-Rank-Test“. Des Weiteren wurden Lineare Cox-Regressionsanalysen im Rahmen der

Multivarianzanalysen angewandt, um die immunhistochemisch detektierten Reaktionen mit verschiedenen Tumorcharakteristika und der klinischen Prognose der Patienten zu korrelieren, um so die unabhängige prognostische Bedeutung der untersuchten Variablen zu determinieren.
Folgende Parameter wurden bei den Analysen erfasst: TNM – Klassifikationen, Differenzierungsgrad des Tumors (G), Anzahl der Tumoren, Carcinoma in situ als Begleitläsion, Therapieversagen nach Instillationstherapie, Alter, Geschlecht, sowie Rezidivneigung und Progressionsrisiko. Als statistisch signifikant galt jeweils eine Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0,05$.

2.6 Sensitivität und Spezifität

Die in dieser Arbeit häufig verwendeten Begriffe Sensitivität und Spezifität sollen hier näher erläutert werden.
Da die hier ermittelten Daten kontinuierlich waren, mussten sie über die Ermittlung des jeweils besten „Cut-off“ Wertes in Expressionsgruppen eingeteilt werden. Diese wurden durch die Anwendung einer ROC-Analyse (receiver operating curve) ermittelt.
Die Sensitivität (Richtigpositiv-Rate, Empfindlichkeit) ist einer der wichtigsten Qualitäten eines Labortests. Sie bezeichnet die Wahrscheinlichkeit, einen tatsächlich positiven Sachverhalt durch ein positives Testergebnis zu erkennen. Je höher also die Sensitivität, desto größer die Wahrscheinlichkeit, dass richtig positive Sachverhalte aus der Gesamtheit erkannt werden. Sie wird nach folgender Formel berechnet:

$$\text{Sensitivität} = \frac{\text{Anzahl der richtig positiven}}{\text{Anzahl der richtig positiven + Anzahl der falsch negativen}}$$

Die Qualität eines Tests, bei negativem Ausfall auch eine negative Diagnose vorauszusagen, nennt man Spezifität (Richtignegativ-Rate). Sie spiegelt also die Wahrscheinlich wider, dass ein tatsächlich negativer Sachverhalt durch ein

negatives Testergebnis als solcher erkannt wird. Sie wird nach folgender Formel berechnet:

$$\text{Spezifität} = \frac{\text{Anzahl der richtig negativen}}{\text{Anzahl der richtig negativen + Anzahl der falsch positiven}}$$

3 ERGEBNISSE

3.1 Patientenkollektiv, Tumorcharakteristika und Follow-up Daten

In dieser Studie wurden Gewebeproben von insgesamt 178 Patienten immunhistochemisch und unter Verwendung der TMA Technik analysiert. Die im Folgenden vorgestellten Patienten- und Tumorcharakteristika sind in Tabelle 6 aufgelistet. 132 (74%) Patienten waren männlich, 46 (26%) weiblich. Das durchschnittliche Alter bei Operation betrug 67,7 Jahre (Median 69 Jahre). Die Patientenverteilung anhand des T-Stadiums war wie folgt: Ta, n=82 (46%), T1, n=62 (35%), T2, n=18 (10%), T3, n=13 (7%) und T4, n=3 (2%). Insgesamt wurden 144 (81%) Patienten mit der Diagnose eines oberflächlichen Tumorstadiums (pTa / pT1) und 34 (19%) Patienten eines muskelinvasiven Stadiums (pT2-4) in die Studie eingeschlossen. Die Differenzierung der Tumoren war im Einzelnen: G1, n=51 (29%), G2, n=89 (50%), G3, n=38 (21%) nach der Tumorklassifikation der WHO von 1973 [21]. Die Erfassung des Lymphknotenstatus (N) war nur für muskelinvasive Tumoren möglich, die Erfassung der Metastasierung (M) war unvollständig. Bei der Therapie oberflächlicher Tumoren mittels TUR-B, wird keine Lymphadenektomie durchgeführt. Aufgrund mangelnder Daten flossen diese beiden Parameter nicht in die Analysen mit ein. 66 (37.0%) Patienten zeigten multiple Tumorläsionen bei initialer TUR. 8 (4,5%) Patienten wiesen ein Carcinoma in situ als Begleiterkrankung zum Urothelkarzinom auf.

Von 117 (81,3%) der 144 Patienten mit oberflächlichen Tumorstadien konnte ein ausreichendes Follow-up erhoben werden. Patienten mit einem Follow-up von weniger als 3 Jahren wurden in der Evaluation der Prognoseparameter Rezidiv und Tumorprogression nicht berücksichtigt. Die durchschnittliche Follow-up Zeit lag bei 74,2 Monaten (Median 64 Monate). Insgesamt wurden postoperativ 56 (47,9%) Patienten mit einem Rezidiv diagnostiziert. 28 (23,9%) Patienten erlitten eine Tumorprogression. Dieser war definiert als Muskelinfiltration nach initial oberflächlichem Stadium. Die durchschnittliche Zeit zwischen initialer Behandlung und Rezidiv betrug 15,9 Monate (Median 10

Monate). Die durchschnittliche Zeit zwischen initialer Behandlung und Tumorprogression betrug 23,9 Monate (Median 12 Monate).

Von 53 (45,3%) Patienten mit einem 3-Jahres Follow-up war eine postoperative Rezidivprophylaxe im Sinne einer Instillationstherapie dokumentiert und somit erfasst worden. Bei 21 (39,6%) Patienten konnte trotz Instillationstherapie ein erneutes Auftreten des Tumors nicht verhindert werden (non-responder).

N = 178		
Parameter	**Anzahl**	**%**
Männlich	132	74.2%
Weiblich	46	25.8%
Alter	Mean: 67.7 Jahre	Median: 69 Jahre
Ta	82	46.1%
T1	62	34.8%
T2	18	10.1%
T3	13	7.3%
T4	3	1.7%
G1	51	28.7%
G2	89	50.0%
G3	38	21.3%
Multiple Läsionen +	66	37.0%
Carcinoma in situ +	8	4.5%
Lymphknoten* +	21	61.7%
Follow-up nicht muskelinvasive	Mean: 75.3 Monate	Median: 64 Monate
Follow-up muskelinvasive	Nicht erhoben	Nicht erhoben
Nicht muskelinvasive Erkrankung: Patienten mit Follow-up (n = 117)		
Rezidiv negativ	56	47.9%
Rezidiv positiv	61	52.1%
Zeit bis Rezidiv	Mean: 15.9 Monate	Median: 10 Monate
Progression negativ	89	76.1%
Progression positiv	28	23.9%
Zeit zur Progression	Mean: 23.9 Monate	Median: 12 Monate
Instillationstherapie	53	45.3%
Responders	32	60.4%
Non-responders	21	39.6%

*: Keiner der Patienten mit oberflächlicher Erkrankung war Lymphknoten positiv; daher bezieht die die Prozentangabe auf die Anzahl der Patienten mit einer muskelinvasiven Erkrankung (n=34).

Tabelle 6: Patienten- und Tumorcharakteristika

3.2 Expresssionsevaluation in Korrelation klinisch-pathologischer Parameter

3.2.1 Hyaluronsäure

Bei der Betrachtung des Tumorstadiums ließ sich eine kontinuierliche Zunahme der Hyaluronsäure-Expression, wie in Abbildung 7 gezeigt, feststellen ($p<0,0001$). Oberflächliche Karzinome wiesen im Vergleich zu muskelinvasiv wachsenden Tumoren geringere Mengen an Hyaluronsäure auf (Ta/T1 vs. T2-4: $p<0,0001$). In der Analyse, unter ausschließlichem Einschluss der Ta/T1 Kohorte, unterschieden sich beide Tumorstadien signifikant ($p<0,01$).

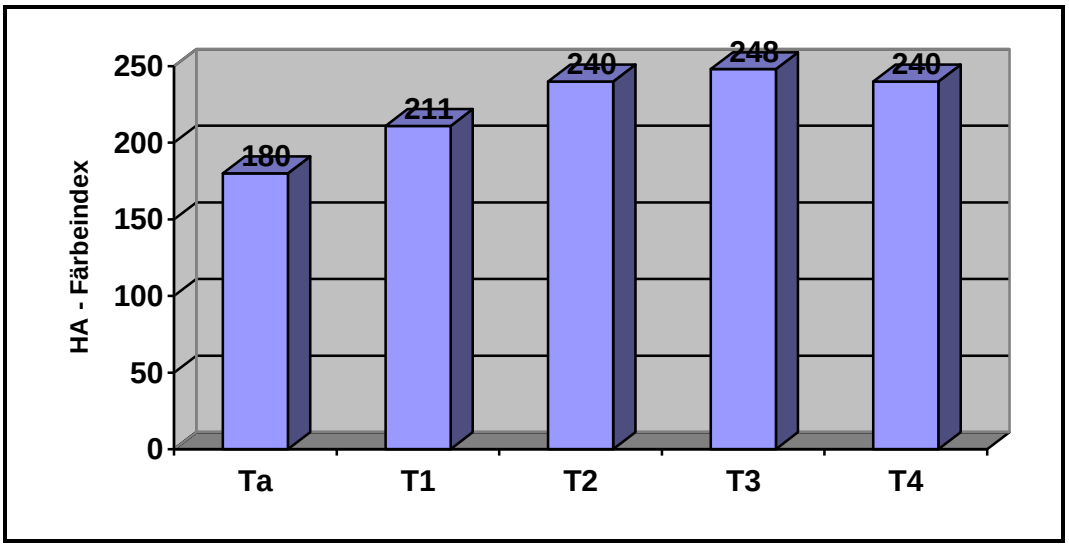

Abbildung 7: HA-Expression nach T-Stadien

Die Analyse des für oberflächliche Tumoren bedeutsamen Differenzierungsgrads korrelierte mit den bei T-Stadien gefundenen Ergebnissen. Hierbei zeigte sich bei gut und mäßig differenzierten Tumoren ein nahezu identischer HA-Index Wert (195 vs. 196). Schlecht differenzierte Tumoren exprimierten dagegen mehr Hyaluronsäure ($p<0,03$). Abbildung 8 zeigt die graphische Darstellung der HA-Expression anhand des Differenzierungsgrads.

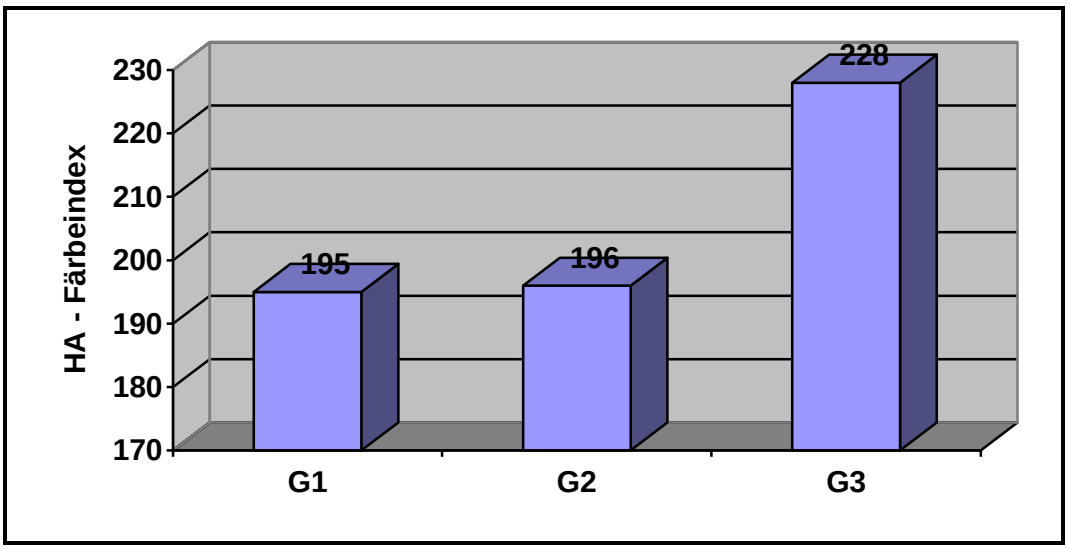

Abbildung 8: HA-Expression nach Tumordifferenzierung

Neben Tumorstadium und –grading wurden weitere Kriterien in die Analyse der Tumoren mit einbezogen. Es zeigte sich eine verstärkte HA-Expression bei Tumoren von Patienten mit multifokal auftretenden tumorösen Läsionen ($p<0,05$). Keine Korrelation konnte für das Vorhandensein eines zusätzlichen Auftretens eines Carcinoma in situ nebst Ta/T1 Tumoren ($p=0,15$) beobachtet werden (Tabelle 7).

Parameter	HA	Mean Diff	95% Confidence
Ta/T1 vs. T2-4	**<0.0001**	49.45	26.04 - 72.87
Ta vs. T1	**<0.01**	29.97	9.30 – 50.64
Multifocality	**<0.05**	25.64	0.63 – 50.64
G1 vs. G2	0.46	1.160	-25.70 - 28.02
G1 vs. G3	**<0.03**	33.02	0.25 – 65.79
G2 vs. G3	**<0.02**	31.86	2.22 – 61.49
CIS	0.14	43.79	-14.59 – 102.2

Tabelle 7: HA-Expression in Korrelation zu verschiedenen Tumorcharakteristika

3.2.2 Hyaluronidase 1

Es zeigte sich, ähnlich der Hyaluronsäure-Expression, eine kontinuierliche Zunahme der Hyaluronidase-1 ($p<0,0001$) einhergehend mit fortgeschrittenen Tumorstadien (Abbildung 9). Ebenso deutlich fiel der Unterschied zwischen oberflächlichen und muskelinvasiven Harnblasenkarzinomen aus ($p<0,0001$). T1 Tumoren exprimierten etwas mehr Hyaluronidase als Ta Tumoren. Dies war statistisch gesehen signifikant ($p<0,0001$).

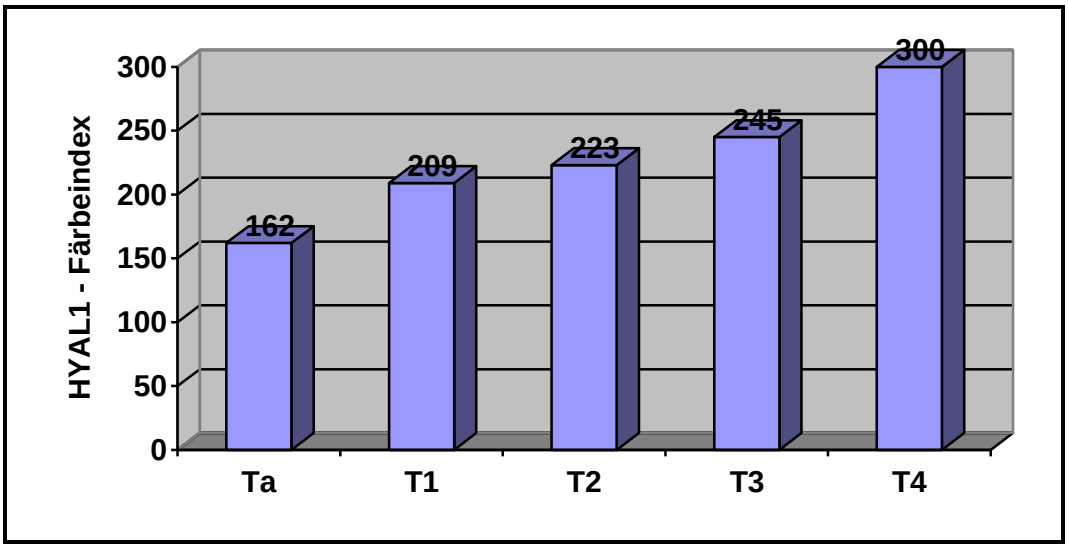

Abbildung 9: HYAL1-Expression nach T-Stadien

Bei der Analyse des Differenzierungsgrads zeigte sich, ähnlich des T-Stadiums, eine kontinuierlich Zunahme der HYAL1 Expression ($p<0,0001$) (Abbildung 10). Gut und mäßig differenzierte Tumoren wiesen hierbei signifikant geringere Expressionsmengen HYAL1 auf als schlecht differenzierte Transitionalzellkarzinome der Harnblase (Tabelle 8).

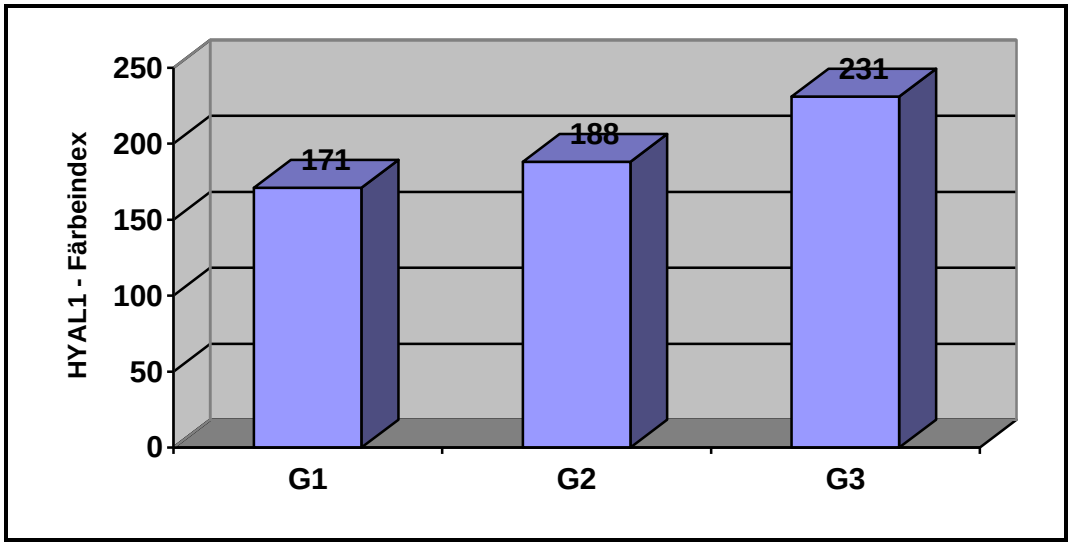

Abbildung 10: HYAL1-Expression nach Tumordifferenzierung

Eine positive Korrelation wurde auch für das Auftreten multipler tumoröser Läsionen (p<0,02) bei initialer TUR-B in Relation mit dem HYAL1-Index und bei Auftreten eines Carcinoma in situ neben papillären Tumoren gefunden (p<0,04).

Parameter	HYAL1	Mean Diff	95% Confidence
Ta/T1 vs. T2-4	**<0.0001**	51.51	28.26 – 74.76
Ta vs. T1	**<0.0001**	47.16	28.18 – 66.13
Multifocality	**<0.02**	31.28	7.35 – 55.21
G1 vs. G2	0.10	17.47	-7.34 – 42.27
G1 vs. G3	**<0.001**	60.62	29.98 – 91.27
G2 vs. G3	**<0.01**	43.15	14.90 – 71.41
CIS	**<0.04**	65.85	5.24 – 126.50

Tabelle 8: HYAL1-Expression in Korrelation anhand verschiedener Tumorcharakteristika

3.2.3 Splicevariante 1 der Hyaluronidase 1 (HYAL1-v1)

Abbildung 11 zeigt die immunhistochemische Auswertung der HYAL1-v1-Expression. Hierbei ergab sich eine kontinuierliche Abnahme mit zunehmendem Tumorstadium (p<0,04). Muskelinvasive Tumoren wiesen eine deutlich geringere Expression auf als nicht muskelinvasive Tumoren (p<0,001) (Abbildung 12). Keinen statistisch signifikanten Unterschied konnte bei der Unterscheidung der oberflächlichen Tumoren (Ta vs. T1) gefunden werden (p=0,63) (Tabelle 9).

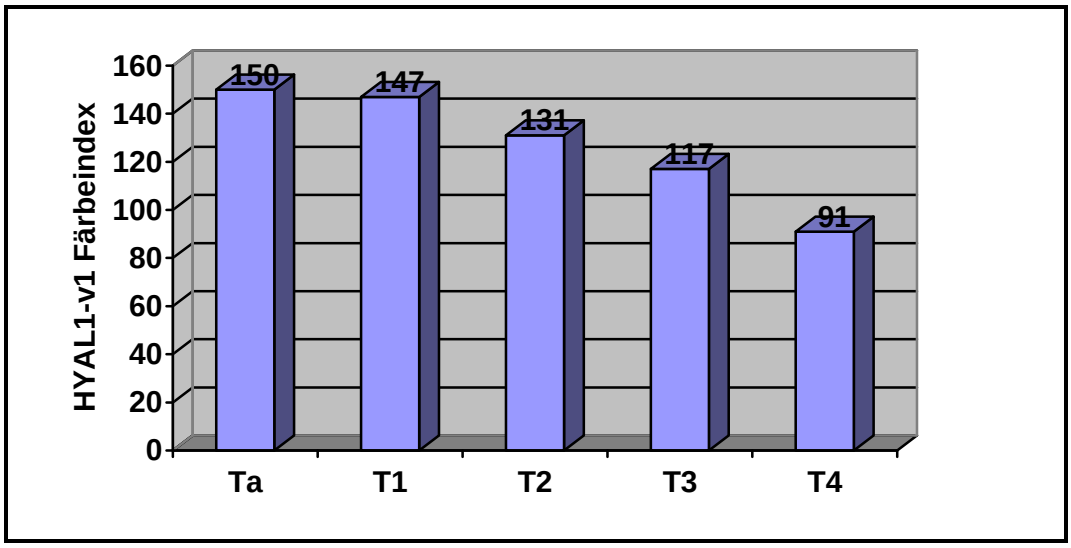

Abbildung 11: HYAL1-v1-Expression nach Tumorstadien

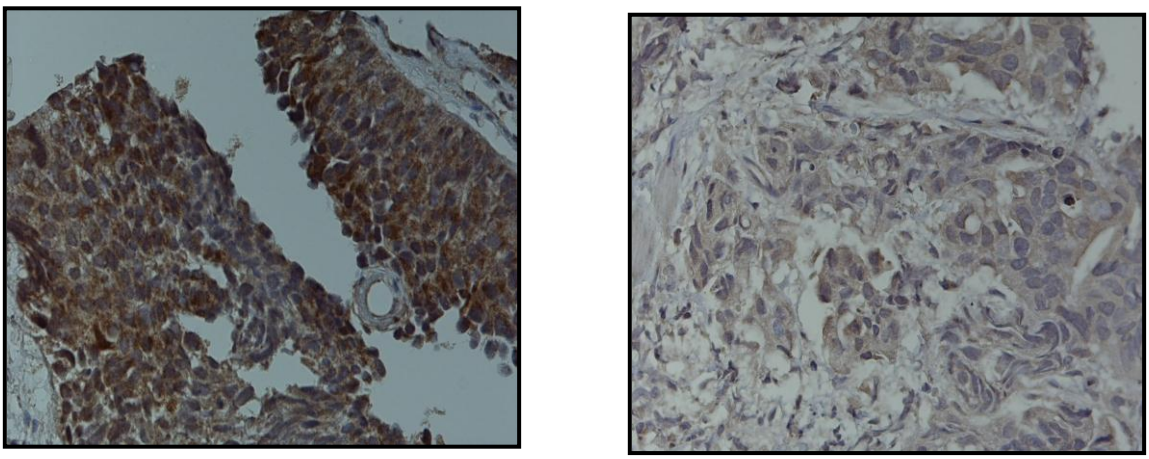

Abbildung 12: HYAL1-v1-Expression im Gewebe

Links: starke HYAL1-v1 Expression bei oberflächlichem TCC (Ta G1).
Rechts: schwache HYAL1-v1 Expression bei muskelinvasivem TCC (T2 G3)

Wie bereits beim Tumorstadium gesehen ließ sich eine Abnahme der Färbung mit zunehmend schlechterer Differenzierung der Tumoren erkennen ($p<0,01$), wie Abbildung 13 zeigt.

Wie bereits in den Kapiteln zuvor zeigten sich vorwiegend aussagekräftige Unterschiede zwischen gut bzw. mäßig differenzierten im Vergleich zu schlecht differenzierten Tumoren (Tabelle 9).

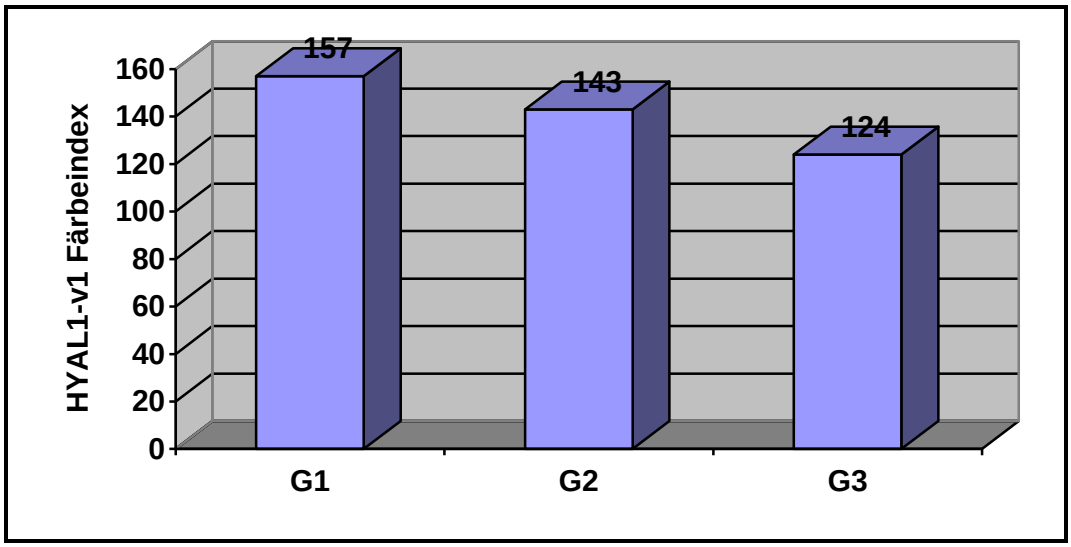

Abbildung 13: HYAL1-v1-Expression nach Tumordifferenzierung

Keine signifikanten Korrelationen wurden zwischen dem HYAL1-v1-Index und dem Auftreten von multiplen Tumoren (p=0,18) und beim gleichzeitigen Auftreten eines Carcinoma in situ mit papillären Tumoren (p=0,62) gefunden.

Parameter	HYAL1-v1	Mean Diff	95% Confidence
Ta/T1 vs. T2-4	**<0.001**	8.92	8.63 – 43.88
Ta vs. T1	0.63	8.51	4.78 – 36.17
Multifocality	0.36	9.87	-28.80 – 10.45
G1 vs. G2	0.12	1.05	-6.22 – 19.92
G1 vs. G3	**<0.01**	55.32	20.08 – 74.17
G2 vs. G3	**<0.04**	8.55	1.82 – 35.95
CIS	0.77	31.73	-88.03 – 108.67

Tabelle 9: HYAL1-v1-Expression in Korrelation zu verschiedenen Tumorcharakteristika

3.3 Evaluation prognostischer Parameter in Korrelation zum Expressionsniveau

3.3.1 Hyaluronsäure

Unter Verwendung der Chi-square Analyse wurde kein Unterschied zwischen Patienten mit und ohne Rezidiv in Bezug zur HA-Expression beobachtet (p=0,71) (Tabelle 10). Jedoch wiesen Patienten mit einer Tumorprogression innerhalb des Nachbetrachtungszeitraumes durchschnittlich signifikant höhere Hyaluronsäure Werte auf (p<0,03) (Tabelle 11).

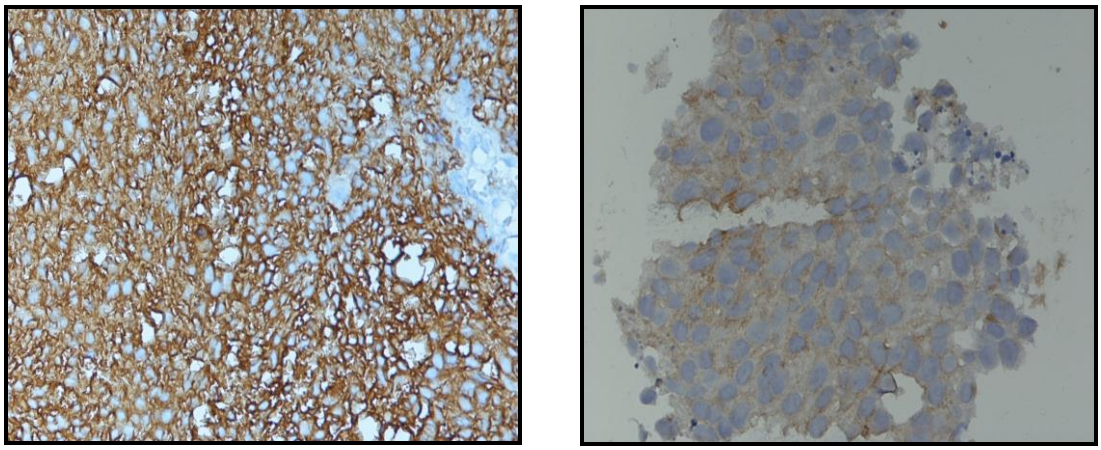

Abbildung 14: HA-Expression im Gewebe

Darstellung einer Hyaluronsäurefärbung an Ta G2 Tumoren. Links progressierend, rechts ohne Progression.

Unter Verwendung der ROC Analyse wurde ein Cut-off Wert von 175 festgelegt. Dieser basierte auf der besten zu ermittelnden Sensitivität und Spezifität in Bezug zum Rezidivrisko und Progressionsrisiko (Tabellen 12 und 13). Anhand des Cut-off Wertes wurde die Kohorte in zwei Gruppen geteilt. Die Abschätzung der Wahrscheinlichkeit eines Rezidivs bzw. Tumorprogression nach Zeit wurde unter Verwendung der Kaplan-Meier Kurve ermittelt. Wie aus Abbildung 15 zu entnehmen ist, zeigte sich ein signifikant reduziertes Progressionsrisiko für Patienten mit einem HA-Index <175 ($p<0,05$). Keine prognostische Aussagekraft wies der HA-Index hingegen beim Rezidivrisiko auf ($p=0,42$).

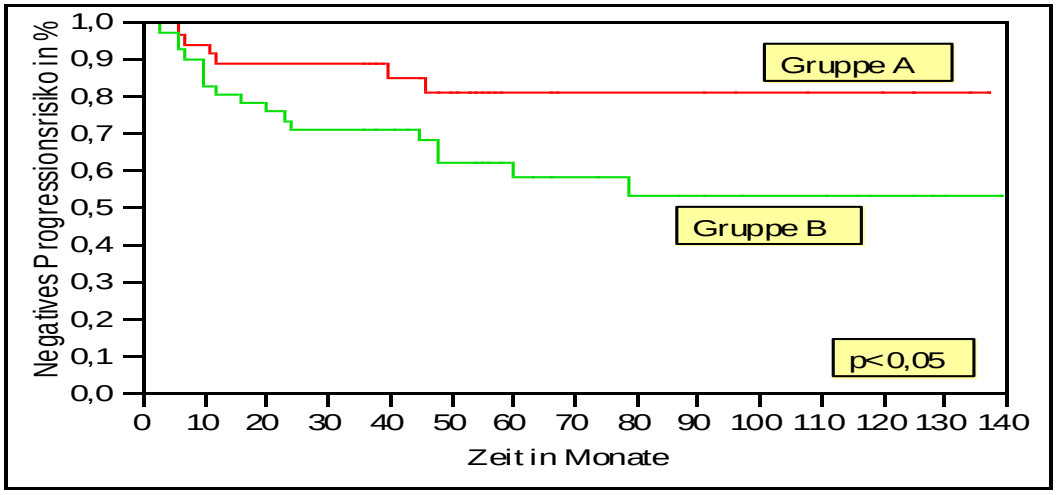

Abbildung 15: Kaplan-Meier Analyse zur Progressionswahrscheinlichkeit in Korrelation zur HA-Expression

Kaplan-Meier Analyse zur Ermittlung der HA-Expression in Korrelation zum progressionsfreien Überleben. Gruppe A: HA-Index <175, Gruppe B: HA-Index ≥175. Log-Rank Test: $p<0,05$.

Außerdem wurden alle zuvor in univariaten Analysen evaluierten Patienten- und Tumorcharakteristika im Hinblick auf ihre prognostische Aussagekraft beim Harnblasenkarzinom mittels einer multivariaten Cox-Regressionsanalyse untersucht. Hierbei konnte der HA-Index weder für das Auftreten von Rezidiven noch für Tumorprogression als unabhängiger, prognostischer Indikator ermittelt werden (Tabelle 14).

3.3.2 Hyaluronsäure 1

Untersucht wurden 117 Patienten mit und ohne Rezidiv sowie Tumorprogression. Dabei zeigte sich bei der Chi-square Analyse eine Zunahme der HYAL1 Expression beim Patienten mit einem zu einem späteren Zeitpunkt diagnostizierten Rezidiv. Noch deutlicher fiel der Unterschied zwischen Patienten mit und ohne nachfolgender Tumorprogression aus. Tabellen 10 und 11 zeigen die Ergebnisse im Detail.

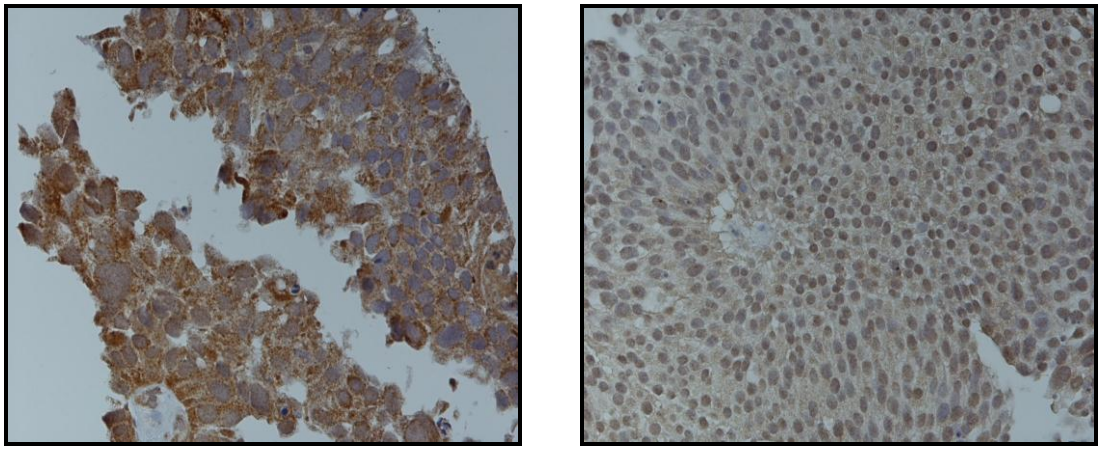

Abbildung 16: HYAL1-Expression im Gewebe

Darstellung einer Hyaluronidasefärbung an Ta G2 Tumoren. Links progressierend, rechts ohne Progress.

Wie unter Kapitel 3.2.1 beschrieben, wurde die Patientenkohorte mittels ROC Analyse in zwei Gruppen geteilt. Der Cut-off Wert wurde bei 210 (HYAL1-Index) festgesetzt (Tabellen 12 und 13). Anschließend wurden die Gruppen als Basis der Kaplan-Meier Analyse verwendet. Die hierbei abgeschätzten Rezidiv- bzw. Progressionsrisiken nach Zeit zeigen die beiden Abbildungen 17 und 18. Sowohl für das rezidivfreie als auch für das progressionsfreie Überleben zeigte sich eine reduzierte Wahrscheinlichkeiten bei einem HYAL1-Index <210.

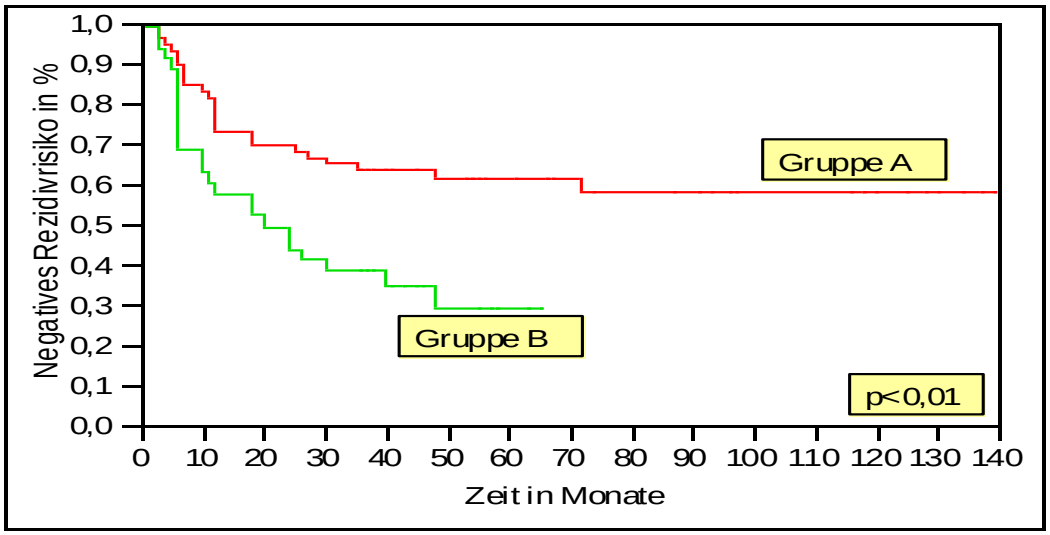

Abbildung 17: Kaplan-Meier Analyse zur Rezidivwahrscheinlichkeit in Korrelation zur HYAL1-Expression

Gruppe A: HYAL1-Index ≥210, Gruppe B: HA-Index <210. Log-Rank Test: p<0,01.

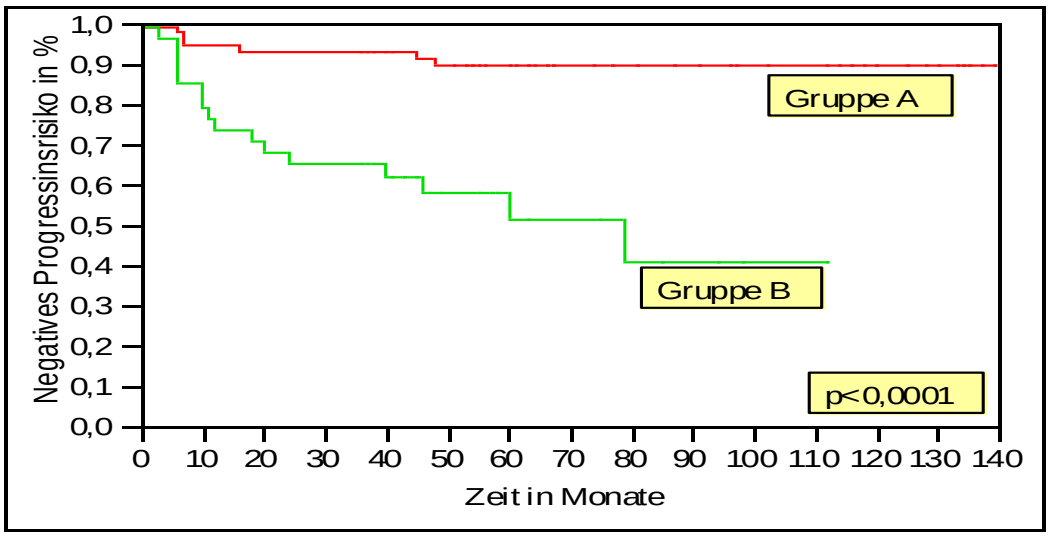

Abbildung 18: Kaplan-Meier Analyse zur Progressionswahrscheinlichkeit in Korrelation zur HYAL1-Expression

Gruppe A: HYAL1-Index ≥210, Gruppe B: HA-Index <210. Log-Rank Test: p<0,0001.

Patienten- und Tumorcharakteristika, welche zuvor mittels univariater Analyse untersucht wurden, sollten nun hinsichtlich ihrer möglichen prognostischen Aussagekraft beim Harnblasenkarzinom untersucht werden. Die Cox-Regressionsanalyse fand hierbei Verwendung.

Der HYAL1-Index wurde hierbei als unabhängige Faktoren für das Auftreten eines Rezidivs ermittelt. Keine prognostische Relevanz hatten das T-Stadium, Tumorgrad, Alter, Geschlecht, Multifokalität und CIS.

Für das Auftreten einer Tumorprogression wurde der HYAL1-Index ebenso als prognostischer unabhängiger Faktor berechnet. Ebenso erwies sich das Alter des Patienten bei Operation bei der Analyse des gruppierten HYAL1-Index als prognostisch unabhängig. Keine Relevanz hatten das T-Stadium, Tumorgrading, Geschlecht, Multifokalität und CIS. Eine genaue Darstellung ist in Tabelle 14 wiedergegeben.

3.3.3 Kombination HA-HYAL1

Um eine Kombinationsanalyse durchzuführen, wurde für beide Tumormarker ein gemeinsamer Cut-off Wert auf Grundlage einer ROC Analyse berechnet. Folgende Regeln fanden hierbei Verwendung:

a) Überschritt mindestens einer der beiden evaluierten Parameter (HA / HYAL1) den zugrunde gelegten Cut-off Wert, wurde das Ergebnis als positiv bewertet.
b) Blieben beide Parameter unterhalb des Cut-off Wertes, wurde das Ergebnis als negativ bewertet.

Aufgrund der in den Tabellen 12 und 13 dargestellten Sensitivitäten bzw. Spezifitäten wurde ein Cut-off Wert von 235 festgesetzt.

Die Kaplan-Meier Analyse (Abbildung 19) ergab kein reduziertes Rezidivrisiko bei Patienten mit einem HA-HYAL1-Index ≥235. Es zeigte sich jedoch eine erhöhte Wahrscheinlichkeit für das Auftreten von Tumorprogressionen ($p<0,0001$).

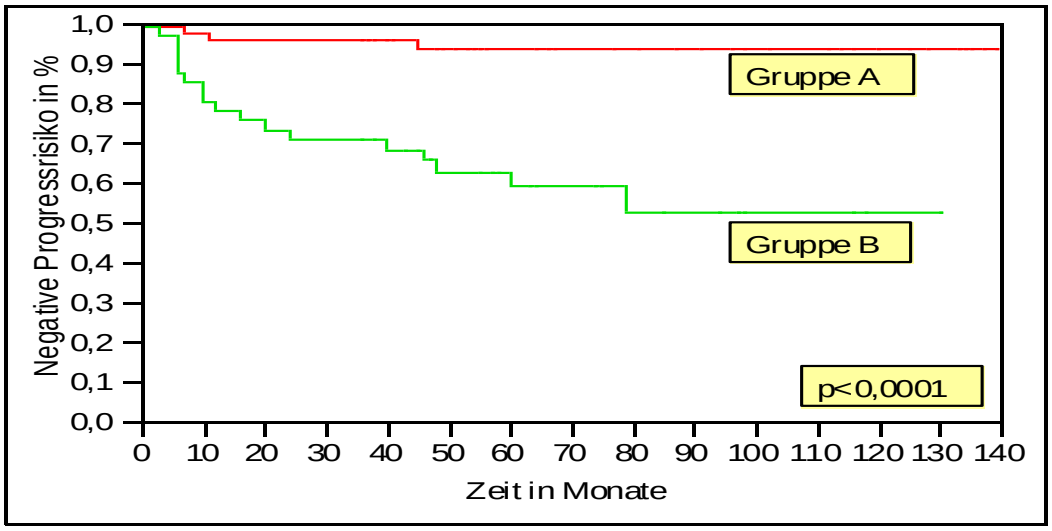

Abbildung 19: Kaplan-Meier Analyse zur Progressionswahrscheinlichkeit in Korrelation zur HA/HYAL1-Expression

Gruppe A: HA/HYAL1-Index <235, Gruppe B: HA-Index ≥235. Log-Rank Test: p<0,0001.

In der multivariaten Analyse zur Evaluation prognostisch unabhängiger Parameter für das Harnblasenkarzinomrezidiv zeigte sich der gruppierte HA/HYAL1-Index als nicht relevant (p=0,11); ebenso wenig die mit in die Analyse eingeschlossenen Parameter T-Stadium (p=0,82), Tumorgrad (p=0,61), Multifokalität (p=0,73), Carcinoma in situ (p=0,47), Alter (p=0,53) und Geschlecht (p=0,50). In der multivariaten Analyse zum Progressionsrisiko stellte sich dagegen der gruppierte HA/HYAL1-Index als prognostisch relevant heraus (p<0,001).

3.3.4 HYAL1-v1

Wie bereits in den vorherigen Kapiteln beschrieben, wurde auch der Zusammenhang zwischen HYAL1-v1-Expression in Bezug zu Rezidiventwicklung und Tumorprogression evaluiert. Die hierbei verwendete Chi-Square Analyse ergab weder für die Rezidiventwickung (p<0,44), noch für den Tumorprogress (p<0,12) eine signifikante Korrelation (Tabellen 10 und 11).

Anhand einer ROC Analyse wurde die Patientenkohorte mit einem Cut-off Wert von 137 in zwei Gruppen geteilt (Tabellen 12 und 13). Die anschließende Kaplan-Meier Analyse zur Ermittlung der Wahrscheinlichkeit des Auftretens eines Rezidivs (p=0,11) bzw. einer Tumorprogression (p=0,48) nach Zeit ergab auch hierbei keine signifikante Korrelation mit dem HYAL1-v1-Index.

Die multivariate Analyse mittels Cox-Regressionsanalyse im Bezug zur prognostischen Wertigkeit von HYAL1-v1 ergab weder für die Rezidiventwicklung noch für den Tumorprogress eine signifikante Aussagekraft. In die Analyse eingeschlossen wurden neben dem HYAL1-v1 Färbeindex das T-Stadium, der Tumorgrad, das Vorkommen multipler Tumoren, das Auftreten eines Carcinoma in situ, das Alter und das Geschlecht (Tabelle 15).

3.4 Tabellen

3.4.1 Chi-Quadrat Analyse: Rezidiv

Parameter	p-Value	Chi Square	95%-Confidence	Odds Ratio
HA	>0.05	0.22	0.82 – 3.75	1.75
HYAL1	**<0.04**	4.53	1.31 – 7.25	3.08
HA-HYAL1*	**<0.05**	4.20	1.03 – 5.33	2.35
HYAL1-v1	>0.05	0.40	0.35 – 8.06	0.61
T-Stage	>0.05	0.06	0.44 – 1.92	0.92
Grade	>0.05	0.19	0.56 – 2.46	1.18
Multifocality	>0.05	0.90	0.67 – 3.11	1.45
CIS	>0.05	0.27	1.00 – 3.86	0.62
Gender	>0.05	1.13	0.25 – 1.52	0.61
Age	>0.05	1.18	0.87 – 3.85	1.83

*: Gruppierter Wert bei einem Cut-off Limit von 230

Tabelle 10: Darstellung der Chi-Quadrat Analyse verschiedenster Parameter in Bezug zum Auftreten eines Tumorrezidivs

3.4.2 Chi-Quadrat Analyse: Tumorprogression

Parameter	p-Value	Chi Square	95%-Confidence	Odds Ratio
HA	**<0.03**	4.75	1.27 – 9.55	3.48
HYAL1	**<0.0001**	13.79	3.17 – 26.42	9.16
HA-HYAL1*	**<0.0001**	19.72	3.49 – 47.82	12.92
HYAL1-v1	>0.05	2.85	1.28 – 4.52	0.99
T-Stage	>0.05	1.23	0.69 – 3.80	1.62
Grade	>0.05	0.12	0.37 – 2.02	0.86
Multifocality	**<0.04**	4.48	1.06 – 5.98	2.51
CIS	>0.05	0.74	0.35 – 13.91	2.21
Gender	>0.05	0.16	0.45 – 3.32	1.02
Age	**<0.02**	5.93	1.47 – 11.66	2.42

*: Gruppierter Wert bei einem Cut-off Limit von 230

Tabelle 11: Darstellung der Chi-Quadrat Analyse verschiedenster Parameter in Bezug zum Auftreten einer Tumorprogression

3.4.3 ROC Analyse: Rezidiv

Parameter	Sensitivität	Spezifität	Odds-Ratio	p-Wert	Cut-off Wert
HA	60%	53%	1.8	0.71	175
HYAL1	49%	76%	2.8	**<0.05**	210
HA/HYAL1	56%	65%	1.1	**<0.05**	235
HYAL1-v1	59%	57%	1.9	0.44	137

Tabelle 12: Darstellung von Sensitivität und Spezifität anhand der mittels ROC Analyse ermittelten Cut-off Werte in Bezug zum Tumorrezidiv

3.4.4 ROC Analyse: Tumorprogression

Parameter	Sensitivity	Specificity	Odds-Ratio	p-Value	Cut-off Limit
HA	76%	55%	3.5	**<0.03**	175
HYAL1	75%	78%	7.5	**<0.001**	210
HA/HYAL1	86%	67%	8.6	**<0.0001**	235
HYAL1-v1	63%	54%	2.0	0.12	137

Tabelle 13: Darstellung von Sensitivität und Spezifität anhand der mittels ROC Analyse ermittelten Cut-off Werte in Bezug zur Tumorprogression

3.4.5 Multivariate Analysen unter Verwendung von HA/HYAL1

Rezidiv				
Parameter	**p-Value**	**Chi-Square**	**Risk**	**95%-CI**
HA	0.74	0.11	1.00	1.00 – 1.00
HYAL1	**<0.02**	6.39	1.01	1.00 – 1.01
T-Stage	0.40	0.72	0.69	0.29 – 1.62
Grade	0.75	0.57	1.26	0.60 – 2.62
Multifocality	0.50	0.46	0.87	0.63 – 1.26
CIS	0.32	0.97	1.49	0.70 – 4.02
Age	0.86	0.03	1.00	0.97 – 1.03
Sex	0.53	0.40	1.14	0.77 – 1.80
Progression				
HA	0.87	0.02	1.00	0.99 – 1.01
HYAL1	**<0.001**	12.47	1.02	1.01 – 1.03
T-Stage	0.90	0.02	1.09	0.29 – 3.82
Grade	0.11	4.48	0.42	0.12 – 1.40
Multifocality	0.65	0.21	0.88	0.50 – 1.53
CIS	0.85	0.04	0.91	0.33 – 2.80
Age	**<0.02**	5.77	1.07	1.01 – 1.03
Sex	0.98	0.00	1.01	0.57 – 1.92

Tabelle 14: Multivariate Analyse unter Verwendung des Cox Proportional Hazard Fit zur Bestimmung unabhängiger, prognostischer Variabeln zur Vorhersage eines Rezidivs bzw. Tumorprogression in Bezug zur HA- und HYAL1-Expression

3.4.6 Multivariate Analyse unter Verwendung von HYAL1-v1

Rezidiv				
Parameter	**p-Value**	**Chi-Square**	**Risk**	**95%-CI**
HYAL1-v1	0.79	0.07	1.00	0.99 – 1.01
T-Stage	0.95	0.00	1.02	0.50 – 2.08
Grade	0.66	0.84	1.32	0.67 – 2.64
Multifocality	0.39	0.74	0.87	0.63 – 1.20
CIS	0.61	0.26	1.22	0.61 – 3.21
Age	0.61	0.27	1.01	0.98 – 1.04
Sex	0.37	0.79	1.19	0.82 – 1.80
Progression				
HYAL1-v1	0.18	1.83	1.01	1.00 – 1.01
T-Stage	**<0.05**	3.99	2.98	1.02 – 8.72
Grade	0.08	5.07	2.26	0.27 – 15.67
Multifocality	0.12	2.48	0.68	0.41 – 1.10
CIS	0.51	0.43	0.69	0.27 – 2.29
Age	**<0.02**	6.43	1.07	1.01 – 1.13
Sex	0.62	0.24	0.88	0.54 – 1.52

Tabelle 15: Multivariate Analyse unter Verwendung des Cox Proportional Hazard Fit zur Bestimmung unabhängiger, prognostischer Variabeln zur Vorhersage eines Rezidivs bzw. einer Tumorprogression in Bezug zur HYAL1-v1-Expression.

4 DISKUSSION

4.1 Allgemeines

Die Suche nach molekularen Markern zur besseren Diagnostik und Therapie von Krebsgeschwüren ist seit Jahren Fokus intensiver Forschungsarbeit. Abgesehen von der Identifikation verschiedener prognostischer Parameter, wie das TNM-Stadium und dem histologischen Grading, sind zuverlässige Prognoseparameter nur begrenzt vorhanden. Beispiele für die klinische Anwendung „neuer“ Parameter sind das Prostata Spezifische Antigen (PSA) beim Prostatakarzinom oder der HER-2 Rezeptor beim Mammakarzinom. Das PSA wird im Tumorscreening eingesetzt, eignet sich aber besonders für die Verlaufskontrolle nach Prostatektomie. Der HER-2 Rezeptor ist dagegen ein Indikator für die Aggressivität beim Mammakarzinom. Er kann durch den monoklonalen Antikörper Herceptin geblockt werden. Damit stellt er ein gelungen Beispiel für eine „targeted therapy“ dar, bei welcher speziifische Rezeptoren und damit einhergehend Signalkaskaden funktionell ausgeschaltet werden können [110]. Beim Harnblasenkarzinom ist es, trotz intensiver Bemühungen, bisher nicht gelungen, geeignete Marker zur Erkennung von Karzinomen und deren Verläufen klinisch zu etablieren. Eine Ausnahme stellt hierbei das NMP-22 dar, welches zur Erkennung von Urothelkarzinomen mittels Urinanalyse in manchen Kliniken seinen Einsatz findet. Die Sensitivität dieses Tests liegt je nach Studie zwischen 47% - 100% und die Spezifität zwischen 55% - 80% [33]. Es ist daher ein wichtiges Ziel, Tumormarker mit einer besseren und konstanteren Spezifität bzw. Sensitivität zu finden. Ein vielversprechender Test ist beispielsweise der HA-HAase Test mit einer Sensitivität zwischen 88-94% und einer Spezifität von ca. 84%. Dieser Test war u.a. Grundlage dieser retrospektiven Studie zur Ermittlung der prognostischen Aussagekraft von HA und HYAL1 sowie HYAL1-v1 an Urothelkarzinomen mittels Immunhistochemie.

4.2 Hyaluronsäure: Bewertung – Bedeutung

Die im Jahre 1934 entdeckte Hyaluronsäure ist ein Glykosaminoglykan, das mittels Disacchariden aufgebaut wird. Physiologischerweise ist dieses Molekül an der Regulation der Gewebshydratation und an intrazellulären Prozessen durch Interaktion mit HA-Rezeptoren beteiligt [111, 112]. Die Hyaluronsäure wird in Tumorgewebe vorwiegend im Stroma gefunden [113, 114]. Es wird angenommen, dass Tumorzellen Fibroblasten dazu anregen, Hyaluronsäure in hohen Konzentrationen zu sezernieren [115]. Jedoch konnte *in vitro* nachgewiesen werden, dass Tumorzellen selbst Hyaluronsäure produzieren und sezernieren können [111]. Somit ist anzunehmen, dass die hohen Konzentrationen der Hyaluronsäure in Harnblasentumorgewebe sowohl aus dem Tumor assoziierten Stroma als auch von Tumorzellen selbst stammen.

Eine Vielzahl an Studien zeigt, dass Hyaluronsäure in tumorspezifische Prozesse involviert ist. Es spielt eine Rolle bei der Tumorinvasion und in dessen Folge bei Metastasierungsprozessen. Ebenso gibt es Hinweise, dass Hyaluronsäure die Induktion der Angiogenese fördert. Dies konnte anhand von Karzinomen des Colons, des Ovars, der Mamma, der Prostata und der Harnblase beobachtet werden [74-77, 116, 117]. Ebenso fördert die Hyaluronsäure Proliferation, Migration und Adhäsion von Tumorzellen bei gleichzeitiger Inhibition der immunologischen Kontrolle [79, 81-83].

In der vorliegenden Arbeit wurde die Expression der Hyaluronsäure in nicht muskelinvasivem und muskelinvasem Gewebe charakterisiert und mit prognose-relevanten Parametern wie T-Stadium, Tumorgrad, dem Auftreten von multiplen Tumoren und dem Carcinoma in situ verglichen. Unter Einbeziehung von Follow-up Informationen wurde die prognostische Aussagekraft der Hyaluronsäure unter Evaluation des rezidivfreien und progressionsfreien Überlebens untersucht. Bereits zuvor konnte unsere Arbeitsgruppe zeigen, dass die Expression von Hyaluronsäure in Tumorgewebe im Vergleich zu normalem Urothel erhöht ist [80]. Dies war nicht Bestandteil dieser Studie, konnte aber an Vergleichsfärbungen wiederholt bestätigt werden.

Darüber hinaus zeigt sich eine Zunahme der HA-Expression einhergehend mit fortgeschrittenen T-Stadien und einem hohen Tumorgrad. Dieses Ergebnis bestätigt die Studie von Hautmann *et al.* [80]. Die Arbeitsgruppe um Hautmann stellte ebenfalls fest, dass hohe Hyaluronsäure Werte in hohen Tumorstadien und Tumoren schlechter Differenzierung zu finden sind. Gleichzeitig weist das Ergebnis darauf hin, dass De Kerks Annahme, die Hyaluronsäuresekretion sei in muskelinvasiven Harnblasenkarzinomgewebe herunterreguliert, falsch gewesen ist [118]. In der vorliegenden Studie ist eine signifikant höhere Expression in muskelinvasivem Harnblasenkarzinomgewebe verglichen mit oberflächlichem Tumorgewebe zu beobachten. Dennoch stehen die Ergebnisse im Konflikt mit denen des HA-Urintests. Bei diesem Test wird Hyaluronsäure im Urin gemessen. Hohe HA-Werte korrelieren dabei mit dem Vorhandensein von Urothelkarzinomen der Blase, unabhängig von deren Tumorstadium und -grad. Zwei Erklärungen lassen sich hierfür finden. Erstens, der HA-Test detektiert Hyaluronsäure erst ab einem Grenzwert von über 500 ng/mg [119]. Zweitens, Urothelkarzinome höheren Tumorgrads exprimieren entsprechend größere Mengen von Hyaluronidasen, welche die Hyaluronsäure in kleine Fragmente schneiden. Diese kleinen, angiogenetisch aktiven Fragmente findet man vor allem bei Patienten mit Grad 2 und Grad 3 Tumoren. Jedoch kann der HA-Test diese Fragmente nicht zuverlässig erfassen. Daher ist es vorstellbar, dass, obwohl die HA-Menge in entsprechendem Maße in Grad 2 und 3 Tumoren gebildet wird, nicht mittels HA-Test gefunden werden kann.

Interessanterweise zeigt sich eine signifikant höhere HA-Expression bei multipel auftretenden Tumoren. Dies deutet auf die bereits postulierte, erleichterte Migration von Tumorzellen durch Hyaluronsäure hin. Keinen Einfluss scheint die Hyaluronsäure für das Auftreten eines Carcinoma in situ zu besitzen. Zumindest unterschieden sich papilläre Tumoren mit dem gleichzeitig auftretenden eines Carcinoma in situ nicht von papillären Tumoren ohne dergleichen. Jedoch sollte beachtet werden, dass bei lediglich 8 (4,5%) der Tumoren diese Präkanzerose mittels TUR-B gefunden wurde. Es sind größere Fallzahlen nötig, um valide Aussagen treffen zu können.

Bisher wurde die prognostische Aussagekraft der HA-Expression in Harnblasenkarzinomgewebe in keiner Studie umfassend untersucht. Diverse Studien belegen jedoch, dass Hyaluronsäure die Aggressivität des Tumors beeinflusst und somit auch das Überleben. Anttila *et al.* konnten an einer Kohorte von 309 Patientinnen mit Ovarialkarzinomen zeigen, dass eine starke, zytosolische Hyaluronsäureexpression mit einem geringeren Gesamtüberleben, als auch mit einer kürzeren rezidivfreien Überlebenszeit assoziiert sind. Diese Ergebnisse standen im Einklang mit der Evaluation von tumorspezifischen Merkmalen. Schlecht differenzierte Tumoren, fortgeschrittene Tumorstadien und große Tumoren zeigten signifikant höhere HA-Expressionsmuster [120]. Zu ähnlichen Ergebnissen führten Studien an Mamma-, Magen- und Prostatakarzinomen [113, 121, 122]. Studien zur Evaluation des prognostischen Potentials der HA-Expression an Harnblasenkarzinomen lieferten lediglich Hinweise. So schrieben Hautmann *et al.* der HA-Expression eine mögliche prognostische Aussagekraft zu, basierend auf der Untersuchung von 38 Patienten, die innerhalb eines Jahres ein Rezidiv zeigten. 97% waren dabei HA positiv [80]. Ebenfalls einen Hinweis lieferten Passerotti et al., welche den HA-Test an Urinproben anwendeten, um Residualtumoren nach TUR-B aufzuspüren. Dabei zeigte der Test eine Sensitivität von 93% und eine Spezifität von 83%. In der Schlussfolgerung wurde darauf hingewiesen, dass hohe HA-Werte im Urin mit einer schlechteren Prognose assoziierte seien [123]. In der vorliegenden Studie wurde die prognostische Aussagekraft der Hyaluronsäure an einer Kohorte von 117 Patienten mit einem Follow-up von mindestens 3 Jahren untersucht. Insgesamt zeigten 56 Patienten ein Rezidiv. 28 Patienten entwickelten einen muskelinvasiven Tumor. Dabei korrelierte die immunhistochemisch ermittelte HA-Expression nicht mit dem rezidivfreien Überleben. Jedoch wies eine signifikant stärkere Hyaluronsäureproduktion bei oberflächlichen Tumoren der Harnblasen auf einen bevorstehenden muskelinfiltrierenden Prozess hin. Dies zeigte sich sowohl in der Chi-Quadrat Analyse, als auch unter Verwendung der Kaplan-Meier Kurve zur Ermittlung der Wahrscheinlichkeit einer Tumorprogression nach Zeit. Die HA-Expression korrelierte mit einer Sensitivität von 76% und einer Spezifität von 55% mit dem

Auftreten von Tumorprogressionen. In der multivariaten Analyse wies der HA-Index jedoch keinen prognostischen Wert in der Erkennung von Tumorprogressionen auf.

4.3 Hyaluronidase 1: Bewertung – Bedeutung

Hyaluronidasen sind Enzyme, die für die Hydrolyse der Hyaluronsäure zuständig sind. Schon 1933 postulierte der spanische Biologe Duran-Reynals, dass der „spreading factor“, den er an Bakterien erforschte, möglicherweise Einfluss auf neoplastische Zellen haben könnte [124]. Zu dieser Zeit war nicht bekannt, dass der „spreading factor“ aus insgesamt 6 Hyaluronidasen bestand. Die bedeutendste Hyaluronidase beim Harnblasenkarzinom ist HYAL1, die von Tumorzellen des Urothelkarzinoms selbst produziert wird [96].
Bei der Analyse verschiedener Zelllinien konnte eine verstärkte HYAL1-Expression beobachtet werden, wenn diese von Tumorgewebe abstammten [88, 96]. Bei der Evaluation 11 verschiedener Harnblasenkarzinomzelllinen zeigte sich beispielsweise eine besonders starke Expression bei HT1376 Zellen. Diese Zellen stammen aus einem Spender mit einem muskelinvasiven und schlecht differenziertem Harnblasenkarzinom. Sie sind ein Indikator für eine aggressive Form des Tumors. Ob diese Überexpression zu einer tumorfördernden oder zu einer –inhibierenden Wirkung führte, war lange nicht klar. Jacobson *et al.* berichteten, dass die Überexpression von HYAL1 in Zelllinien des Kolonkarzinoms aus Ratten bei Xenografts die Tumorbildung unterdrückte [125]. Somit nahm er an, dass es sich beim HYAL1 um ein Tumorsuppressorgen handelte. Lokeshwar *et al.* konnten dagegen beweisen, dass die Inhibition der HYAL1 Expression in Zelllinien des Harnblasenkarzinoms die Wachstumsrate um das 4-fache reduzierte [126]. Es wird demnach angenommen, dass die Zellproliferationsrate, zumindest in Harnblasenkarzinomen, von der Expressionsstärke des HYAL1-Moleküls abhängt. Dies konnte auch an anderen Zellen gezeigt werden. Lin et al. berichteten von Zelllinien aus Plattenepithelkarzinomen der Mundhöhle, bei denen die Unterdrückung der HYAL1-Expression zum Zellzyklusarrest führte

[127]. Diese beiden Untersuchungen sprächen für die These, dass es sich beim Hyaluronidase 1 um ein Onkogen handelt.

In verschiedenen Studien unter Anwendung diverser Methoden konnten erhöhte HYAL1 Werte in Prostata- und Harnblasenkarzinomen, in Tumoren des Hals- und Kopfbereichs, in Mammakarzinomen und in Gliomen gefunden werden [91, 93, 94, 100, 102, 103, 108, 128]. Die hier vorliegende Studie bestätigt dabei die bereits von Hautmann *et al.* gefunden Ergebnisse einer erhöhten HYAL1 Expression in Harnblasenkarzinomgewebe. Die von unserer Arbeitsgruppe ermittelten Ergebnisse zeigen eine eindeutige Zunahme des Moleküls einhergehend mit fortgeschrittenen Tumorstadien. Dies äußert sich im signifikanten Unterschied sowohl zwischen oberflächlichen (Ta/T1) und muskelinvasiven Tumoren (T2-4) als auch in der Unterscheidung zwischen Ta und T1 Tumoren. Ausgehend von der Annahme, dass die HYAL1-Expression ein Indiz für aggressivere Formen des Tumors ist, weist dieses Ergebnis darauf hin, dass T1 Tumoren hinsichtlich ihres Progressionspotentials deutlich von Ta Tumoren unterschieden werden müssen.

Dies bestätigt sich auch in der Analyse der Tumordifferenzierung. Schlecht differenzierte Tumoren exprimieren signifikant mehr HYAL1 als gut differenzierte Urothelkarzinome. Es ist bekannt, dass schlecht differenzierte Urothelkarzinome eher dazu neigen, muskelinfiltrierend zu wachsen und schließlich zur Metastasierung neigen. Diese Tatsache fügt sich in den Kontext einer Studie von Lokeshwar *et al.* ein, bei der das Invasionspotential von Harnblasenkarzinomzellen in Bezug zur HYAL1-Expession untersucht wurde [126]. Hierbei zeigte sich, dass neben einer erhöhten Proliferationsrate auch das Potential zum invasiven Wachstum mit einem starken Vorkommen von HYAL1 korrelierte.

Der HAase-Test, welcher Hyaluronidase im Urin nachweist, besitzt eine Sensitivität von 81% und eine Spezifität von 84% in der Erkennung von Grad 2 und Grad 3 Tumoren der Harnblase [119, 128]. Seine Sensitivität in der Identifikation von Grad 1 Tumoren liegt bei lediglich 23%. Grundlage des Tests ist die Annahme, dass die von den Tumorzellen gebildete Hyaluronidase u.a. an den Urin abgegeben wird und direkt mit der produzierten Menge korreliert.

Somit bestätigt das hier gefundene Ergebnis einer aufsteigenden HYAL1-Expression einhergehend mit schlecht differenzierten Tumoren die Beobachtungen beim HAase-Test.

Interessanterweise wurden erhöhte Hyaluronidase 1 Werte bei papillären Tumoren gefunden, die neben einem Carcinoma in situ wachsen. Diese stellten sich im Gegensatz zur Hyaluronsäure als signifikant dar. Wie bereits erwähnt zeigten lediglich 8 (4,5%) aller oberflächlichen Tumoren dieses gemeinsame Wachstumsmuster. Es sollte daher an einer größeren Kohorte re-evaluiert werden.

Wie auch schon bei der Analyse des HA-Index beobachtet, wurde bei multipel auftretenden Tumoren ein signifikant erhöhter HYAL1-Index gefunden. Hyaluronidasen werden von Tumorzellen exprimiert, um sich den Weg in die Tiefe bzw. Breite zu bahnen [126]. Somit verdeutlicht dieses Ergebnis die Bedeutung von HYAL1 bei der Tumorausdehnung und der Tumorinvasion. Beides sind Determinanten für aggressive Formen von Tumoren.

Mit experimentellen Untersuchungen wurde mithilfe des erhobenen Follow-up die prognostische Aussagekraft für Patienten mit oberflächlichen Harnblasenkarzinomen in Bezug zur HYAL1 Färbung untersucht. An Prostatakarzinomen konnte bereits gezeigt werden, dass HYAL1 ein die Prognose bestimmender Faktor ist. Posey *et al.* untersuchten 70 Prostatakarzinome mittels Immunhistochemie. Von diesen zeigten 25 ein biochemisches Rezidiv (PSA >0,4 ng/ml). Die HYAL1 Färbungen konnten retrospektiv das Auftreten eines Rezidivs mit einer Sensitivität von 84% und einer Spezifität von 80% vorhersagen. In der multivariaten Analyse wurde u.a. die HYAL1-Expression als unabhängiger prognostischer Indikator zur Vorhersage eines biochemischen Rezidivs bei Prostatakarzinomen identifiziert [94]. Eine spätere Studie, die Zelllinien von Prostatakarzinomen verwendete, bestätigte diese Ergebnisse. Hierbei wurde postuliert, dass eine erhöhte HYAL1-Expression in Prostatakarzinomen eine Voraussetzung für dessen progressives Potential ist [129]. In der hier vorliegenden Studie wurde die HYAL1-Expression an oberflächlichen Harnblasenkarzinomen mittels Immunhistochemie evaluiert und mit Follow-up Daten korreliert. Es stellte sich

heraus, dass, retrospektiv ermittelt, erhöhte HYAL1-Werte sowohl mit dem Auftreten von Rezidiven als auch mit der Entwicklung von Tumorprogressionen assoziiert sind. Die Sensitivität bzw. Spezifität bei der Vorhersagewahrscheinlichkeit von Tumorprogressionen liegt bei 75% bzw. 78% (Odds-Ratio 7,5). Die Kaplan-Meier Kurve weist auf ein signifikant höheres Risiko für die Entwicklung von Rezidiven bzw. Tumorprogressionen hin. So treten beide Ereignisse zeitlich früher auf, wenn das ursprüngliche Tumorgewebe hohe Hyaluronidase-1-Werte anzeigt. Diese Ergebnisse wurden in der multivariaten Analyse unter Einschluss des HA-Index, des T-Stadiums, des Tumorgradings, des Auftretens von multiplen Tumoren sowie von Carcinoma in situ, des Alters und des Geschlechts bestätigt.

4.4 HA/HYAL1 – Kombination: Wertung – Bedeutung

Sowohl HA als auch HYAL1 besitzen tumorspezifische Eigenschaften, die in den vorangegangenen Kapiteln vorgestellt und diskutiert wurden. Die Hyaluronsäure wird durch Hyaluronidasen in Fragmente geschnitten und abgebaut. Es ist davon auszugehen, dass Prozesse wie die Tumorgrößenzunahme, die Angiogeneseförderung, die Metastasenbildung und letztlich die Prognose des Patienten im Zusammenspiel beider Faktoren determiniert sind. Ohne die Hyaluronidase 1 gäbe es beispielsweise keine kleinen HA-Fragmente, welche angiogenesefördernd wirken [130, 131].
Es besteht also die Annahme, dass die Kombination beider prognostisch bedeutsamen Moleküle für das Harnblasenkarzinom die Erkennung desgleichen bzw. die Prognoseabschätzung noch verbessern sollten. Gleiches wurde bereits von Lokeshwar *et al.* analysiert. Dabei wurden die Einzelergebnisse das HA-Test und des HAase-Test, beides Nachweisverfahren von Hyaluronsäure bzw. Hyaluronidase 1 im Urin, kombiniert. Der HA-Test lieferte eine Sensitivität von 83% und eine Spezifität von 90% in der Erkennung von Harnblasenkarzinomen unabhängig von dessen Stadium und Differenzierung. Der HAase-Test zeigte eine Sensitivität von 82% und eine Spezifität von 84% in der Erkennung von Grad 2 und 3 Tumoren. Kombinierte

man beide Tests, verbesserte sich die Sensitivität auf 91%. Die Spezifität blieb stabil bei 84% [119].
Gleiches wurde bei der vorliegenden Studie unternommen. Zunächst wurde ein gemeinsamer Cut-off Wert anhand einer ROC Analyse ermittelt. Ergebnisse wurden als positiv gewertet, wenn mindestens einer der beiden Marker ein positives Ergebnis anzeigte. Waren beide Ergebnisse negativ, wurde das Ergebnis als negativ gewertet.
Der kombinierte HA/HYAL1-Index korrelierte nicht mit dem Auftreten von Rezidiven. Hierbei lagen Sensitivität und Spezifität lediglich bei geringen 56% bzw. 65%. Beim Vergleich von Tumorprogression und HA/HYAL1-Index zeigte sich jedoch ein signifikanter Unterschied zu Tumoren, die keine Tumorprogression zeigten. Die Sensitivität konnte auf 86% gesteigert werden. Im Vergleich dazu lagen die Sensitivitäten von HA bzw. HYAL1 alleine bei 76% und 75%. Die Spezifität des kombinierten HA-HYAL1-Index ergab hierbei 67%.

4.5 HYAL1-v1: Bewertung – Bedeutung

Eine Reihe von Splice-Varianten verschiedenster Hyaluronidasen wurden durch eine Studie von Lokeshwar *et al.* aus dem Jahre 2002 näher charakterisiert [132]. Hierbei wurde festgestellt, dass die in Harnblasenkarzinomen bedeutendste Hyaluronidase, HYAL1, 5 verschiedene Splice-Varianten besitzt (HYAL1-v1 bis HYAL1-v5). HYAL1 besitzt 3 Exons und 2 Introns. Bei der Bildung von HYAL1-v1 wird die Kodierung von Exon 2 ausgespart, was einen Verlust von 90 Basenpaaren (bp) zu Folge hat. Genau diese 90 bp sind in allen aktiven Formen der Hyaluronidasen zu finden. Interessanterweise wurde bei dieser Studie festgestellt, dass das Auftreten der Splicevarianten von HYAL1 und HYAL3 in verschiedenen Proben aus Harnblasenkarzinomen und Lymphknoten unterschiedliche Expressionslevel zeigten. Dies weist auf eine gezielte Förderung bzw. Abschwächung der Transkription hin. Alle Splice-Varianten sind jedoch enzymatisch inaktiv. Gleichzeitig wurde beobachtet, dass Zellkulturen aggressiver Tumorformen aus Harnblase und Prostata hauptsächlich den Wildtyp der Hyaluronidase exprimieren, wohingegen weniger

aggressive Formen und normales Urothel eine starke Expression der Splicevarianten zeigten. Aufgrund dieser Ergebnisse wurde postuliert, dass HYAL1 möglicherweise eine entscheidende Rolle bei der Förderung der Tumorprogression inne habe. Normales Urothel könnte dagegen die HYAL1 Expression durch die Kodierung der Splicevarianten beeinflussen.

Diese Annahme bestätigt die hier vorliegende Studie. Mit Hilfe eines Antikörpers wurde die Expression von HYAL1-v1 an Harnblasenkarzinomen unterschiedlicher Tumorstadien und –grade immunhistochemisch ausgewertet. Es zeigte sich eine starke Expression bei oberflächlichen Tumoren der Stadien pTa und pT1 mit einem signifikanten Abfall in muskelinvasiven Stadien (pT2-4). Einhergehend mit diesen Ergebnissen wiesen schlecht differenzierte Tumoren geringe Mengen an HYAL1-v1 auf. Somit bekräftigt dies die Annahme, dass aggressivere Tumorformen mehr HYAL1 und weniger HYAL1-v1 bzw. andere Splicevarianten produzieren, um damit die Tumorausdehnung und –invasion zu fördern. Dieses unterstreicht eine von uns publizierte Studie, die sich eingehender mit HYAL1-v1 befasst [104]. Hierbei wurden Harnblasenkarzinomzellen mit HYAL1-v1 transfiziert und unter *in vitro* Bedingungen bzw. an Xenografts evaluiert. Es zeigte sich, dass die Expression von HYAL1-v1 zu einer verminderten Proliferationsrate der Zellen führte, verursacht durch einen Stopp im Zell-Zyklus und durch die Induktion von Apoptosevorgängen. In den Xenograftmodellen wurde ein langsameres Tumorwachstum bei HYAL1-v1 transfizierten Tumoren beobachtet. Bei der histologischen Aufarbeitung zeigte sich eine geringere Dichte an CD34, was für ein geringeres angiogenetisches Potential spricht. Gleichzeitig waren die Tumoren weniger invasiv. Interessanterweise zeigte sich bei dieser Studie, dass alle Zelllinien ähnliche Levels des HYAL1 Moleküls wie auch des HYAL1-v1 Moleküls aufwiesen. Jedoch beobachtete man eine nicht-kovalente Bindung zwischen beiden Molekülen, die, je mehr HYAL1-v1 exprimiert wurde, umso stärker ausfiel. Bei einer Aktivitätsanalyse mittels ELISA zeigte sich eine signifikant geringe Hyaluronidase-Aktivität in der gebundenen Form. Man kann demnach davon ausgehen, dass HYAL1-v1 durch die Bindung an HYAL1 dessen Aktivität hemmt. Die würde auch das geringere angiogenetische

Potential bei starker HYAL1-v1 Produktion erklären. Weniger Hyaluronidase führt zu einer geringeren Produktion von kleinen, angiogenetisch aktiven HA-Fragmenten.
Ein geringeres angiogentisches Potential sollte zu prognostisch günstigeren Tumorformen führen. Die in der vorliegenden Studie verwendete Kohorte weist ein akzeptables Follow-up in Bezug auf Rezidiv- und Progressionsentwicklung auf. Beide Ereignisformen wurden mit der HYAL1-v1-Expression korreliert. Hierbei ergab sich kein statistisch aussagekräftiges Ergebnis. Die Sensitivitäten entsprechend Rezidiv und Tumorprogression lagen bei 59% und 65%.
Unklar ist, welche Funktionen und Interaktionen die anderen Splice-Varianten der Hyaluronidasen besitzen. Möglicherweise schwächen sie ebenfalls die Aktivität der Hyaluronidasen und bilden somit einen Regulationsmechanismus. Unklar ist auch, wie die erhöhte HYAL1-v1 Expression zur verstärkten Apoptose führt. Es konnte gezeigt werden, dass sehr hohe HYAL1 Werte (>100mU/ml) zum programmierten Zelltod in Prostatazellen führt [133]. Führendes Merkmal hierbei ist die Depolarisation der Mitochondrien [87]. Dieser Mechanismus wird hierbei jedoch nicht beobachtet. Vielmehr könnte der Verlust der HYAL1 Expression zur Anoikis führen. Weitere Studien müssen sich hiermit näher beschäftigen. Auch ist es wichtig, das prognostische Potential der verschiedenen Splice-Varianten an großen Kohorten zu evaluieren.

4.6 Schlussfolgerung

Die Ergebnisse der hier vorliegenden Studie bestätigen die Annahme, dass Regulationsmechanismen der Hyaluronsäure die Tumorbildung und –progression beeinflussen können. HA und HYAL1 sind nicht nur geeignete Screeningparameter von Harnblasentumoren, sondern eignen sich wahrscheinlich auch zur individuellen Prognoseabschätzung. Die Untersuchung von HYAL1-v1 zeigt darüber hinaus, dass die Regulationsmöglichkeiten innerhalb eines Organismus sehr komplex sind. Eine noch nicht veröffentlichte Arbeit aus unserem Arbeitskreis zeigt auf, dass die Induktionsvorgänge zur Bildung von Hyaluronidase 1 über Methylierungsschritte geregelt scheinen.

Gleichzeitig kann die Aktivität der Hyaluronidasen über dessen Splicevarianten beeinflusst werden. Diese doppelte Absicherung gegenüber der Aktivität der Hyaluronidasen zeigt deren Stellenwert und Einfluss im Organismus. Weitere Regulationsmechanismen bestehen über die Hyaluronsäure aufbauenden HA-Synthetasen, von denen es 3 verschiedene gibt. Unsere Arbeitsgruppe konnte bereits zeigen, HAS1 das Wachstum von Harnblasentumoren und deren Progressionspotential über die Regulation der HA-Produktion und die Modulation von CD44 Rezeptoren beeinflusst [79, 134].

Die in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse sind nur ein kleiner Teil auf der Suche nach geeigneten Markern zum Screening und Verlaufskontrolle von Tumoren in der Harnblase. Sie können aber einen Beitrag leisten, um Subgruppen von Patienten mit aggressiveren Formen des Harnblasenkarzinoms zu identifizieren, die einer engmaschigen Nachsorge bedürfen. Gleichzeitig bieten die hier vorgestellten Ergebnisse ein Fundament zum möglichen Einsatz des HA-HAase Tests. Sollte es in Zukunft möglich sein, die Abstufung aggressiver Tumoren noch genauer vorzunehmen, wird die engmaschige Nachsorge mittels Zystoskopien zu überdenken sein. Der kombinierte Einsatz von Urintest und Zystoskopien ist dabei ein zu diskutierender Lösungsansatz. Durch zahlreiche Arbeiten an Hyaluronsäure, Hyaluronidasen und den HA-Synthetasen ist ein sehr komplexes Bild entstanden. Die Beeinflussung des Tumorgeschehens durch diese Moleküle darf als gesichert gelten. Weitere Studien müssen die genauen molekularen Zusammenhänge aufdecken. Anhand klinischer prospektiver Studien muss sich zeigen, ob sich diese Parameter für den Routineeinsatz empfehlen, um die frühzeitigere Erkennung von Patienten mit Harnblasenkarzinomen zu beschleunigen um somit die individuelle Prognose zu verbessern.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Patienten mit Harnblasenkarzinomen müssen sich meist auf eine langwierige Krankengeschichte gefasst machen, die mit zahlreichen mehr oder minder invasiven Untersuchungen einhergeht. Geeignete molekulare Nachweismethoden könnten in Zukunft Hilfe leisten, die Vorhersage von Krankheitsverläufen besser einzugrenzen. Dies vermag nicht nur zur besseren Patientencompliance beizutragen, sondern auch Geld zu sparen. Hyaluronsäure (HA) ist ein Glykosaminoglykan, welches eine Metastasierung von Tumoren fördern kann. Hyaluronidase 1 (HYAL1) fördert invasives Tumorwachstum und Angiogenese. Im Urin gemessen stellen sie diagnostische Marker zur Erkennung von Harnblasenkarzinomen dar. Die Splice-Variante 1 des HYAL1-Gens (HYAL1-v1) wurde erst im Jahre 2006 entdeckt und scheint eine tumorhemmende Funktion zu besitzen.

Unter Verwendung immunhistochermischer Nachweismethoden und der Tissue Microarray Technik wurden Gewebeproben muskelinvasiver und nicht muskelinvasiver Art von 178 Patienten untersucht. Die Färbeergebnisse wurden mit tumorspezifischen Eigenschaften sowie mit Patientencharakteristika verglichen. Desweiteren wurde ein Follow-up erhoben, mit welchem die prognostisch relevanten Merkmale Tumorrezidiv und –progression korreliert wurden.

Diese Studie unterstreicht die Bedeutung der untersuchten Marker für Tumorwachstum, -ausbreitung und –progression beim Transitionalzellkarzinom der Harnblase. Es konnte gezeigt werden, dass sowohl die Hyaluronsäure als auch die Hyaluronidase 1 in entdifferenzierten und fortgeschrittenen Tumoren in erhöhtem Maße gefunden wurde. Desweiteren ist dies die erste Studie, die einen Anhalt dafür liefert, dass beide molekulare Marker eine prognostische Bedeutung besitzen. Hierbei konnte die signifikant erhöhte Wahrscheinlichkeit einer Tumorprogression in Zusammenhang mit einer starken Hyaluronsäure- bzw. Hyaluronidase-Expression gezeigt werden. Gleichzeitig korrelierte eine starke Hyaluronidase-Expression mit dem Auftreten von Tumorrezidiven. Diese Ergebnisse unterstreichen die Bedeutung beider Marker in der Tumordiagnostik

und bekräftigen die Aussagekraft des HA-HAase Tests, welcher Hyaluronsäure und Hyaluronidase 1 im Urin nachweist. Erstmals konnte der Zusammenhang zwischen einer niedrigen Expression der Splicevariante 1 der Hyaluronidase 1 (HYAL1-v1) und fortgeschrittenen Tumorstadien des Harnblasenkarzinoms in einem immunhistochemischen Nachweisverfahren beobachtet werden. Hierbei zeigte sich jedoch keine prognostische Aussagekraft von HYAL1-v1 in Bezug zu Tumorrezidiv- und –progressionsneigung.

Abschließend bleibt festzustellen, dass die Tissue Microarray Technik ein gut anwendbares und effizientes Verfahren zur Untersuchung großer Patientenkohorten darstellt. Weitere Studien vorwiegend klinischer und prospektiver Natur sind notwendig, um die prognostische Aussagekraft der untersuchten Variablen zu verifizieren und klinisch zu etablieren.

6 ABKÜRZUNGEN

Abb.	Abbildung
BCG	Bacillus Calmette-Guérin
bp	Basenpaare (base pairs)
CIS	Carcinoma in situ (siehe auch Tis)
CMV	Cisplatin, Methotrexat, Vinblastin
Da	Dalton
DAB	Diaminobenzidin
d.h.	das heisst
EAU	European Association of Urology
EORTC	European Organisation for Research and Treatment of Cancer
EMT	Epitheliale-Mesenchymale Transition
EZR	Extrazellulärraum
GC	Gemcitabine, Cisplatin
GAG	Glykosaminoglykane
HA	Hyaluronsäure
HER-2	Human Epithelial Receptor 2
H&E	Hämatoxylin & Eosin
HYAL1	Hyaluronidase 1
HYAL1-v1	Splicevariante 1 der Hyaluronsäure 1
ICAM	Intracellular Adhesion Molecule
Ig	Immunglobulin
IRB	Instituational Review Board
ISUP	International Society of Urological Pathology
MDR	Multi-Drug Resistance
MVAC	Methotrexat, Vinblastin, Doxorubicin, Cisplatin
PBS	Phosphate Buffered Saline
PSA	Prostata Spezifisches Antigen
pT	Postoperativ festgelegte Tumorgröße
PUNLMP	Papillary Urothelial Neoplasm of Low

	Malignant Potential
RHAMM	Receptor for Hyaluronic Acid Mediated Moltility
ROC	Receiver Operating Curve
sog.	Sogenannt
TCC	Transitionalzellkarzinom
Tis	Carcinoma in situ (siehe auch CIS)
TMA	Tissue Microarrays
TNM	Stagingeinteilung (**T**umor, **N**odes, **M**etastasis)
TUR	Transurethrale Resektion
TUR-B	Transurethrale Resektion der Blase
UICC	Union International Contre le Cancer
usw.	und so weiter
WHO	World Health Organisation

7 TABELLEN UND ABBILDUNGEN

Tabelle1: TNM-Klassifikation für Harnblasenkarzinome (2002). 10
Tabelle2: Klassifikation nicht invasiver urothelialer Tumoren (WHO 2004) [24]. 11
Tabelle3: Klassifikation der Tumordifferenzierung bei Urothelkarzinomen (WHO 1973) [21]. 12
Tabelle4: EORTC Fragebogen zur Evaluation des Rezidiv- bzw. Progressionsrisikos [29]. 13
Tabelle5: Wahrscheinlichkeiten des Auftretens von Rezidiven bzw. einer Tumorprogression anhand der EORTC Evaluationstabelle [29]. 13
Tabelle6: Patienten- und Tumorcharakteristika 36
Tabelle7: HA-Expression in Korrelation zu verschiedenen Tumorcharakteristika 38
Tabelle8: HYAL1-Expression in Korrelation anhand verschiedener Tumorcharakteristika 40
Tabelle9: HYAL1-v1-Expression in Korrelation zu verschiedenen Tumorcharakteristika 43
Tabelle10: Darstellung der Chi-Quadrat Analyse verschiedenster Parameter in Bezug zum Auftreten eines Tumorrezidivs 51
Tabelle11: Darstellung der Chi-Quadrat Analyse verschiedenster Parameter in Bezug zum Auftreten einer Tumorprogression 52
Tabelle12: Darstellung von Sensitivität und Spezifität anhand der mittels ROC Analyse ermittelten Cut-off Werte in Bezug zum Tumorrezidiv 53
Tabelle13: Darstellung von Sensitivität und Spezifität anhand der mittels ROC Analyse ermittelten Cut-off Werte in Bezug zur Tumorprogression 53
Tabelle14: Multivariate Analyse unter Verwendung des Cox Proportional Hazard Fit zur Bestimmung unabhängiger, prognostischer Variabeln zur Vorhersage eines Rezidivs bzw. Tumorprogression in Bezug zur HA- und HYAL1-Expression 54
Tabelle15: Multivariate Analyse unter Verwendung des Cox Proportional Hazard Fit zur Bestimmung unabhängiger, prognostischer Variabeln zur Vorhersage eines Rezidivs bzw. einer Tumorprogression in Bezug zur HYAL1-v1-Expression. 55

Abbildung 1: Wachstumsmuster TCC 9
Abbildung 2: Tissue Microarray 25
Abbildung 3: Placement of Control Points 26
Abbildung 4: Microarrayer 26
Abbildung 5: Farbintensitäten 30
Abbildung 6: Kalkulation der Farbintensitäten 31
Abbildung 7: HA-Expression nach T-Stadien 36
Abbildung 8: HA-Expression nach Tumordifferenzierung 37
Abbildung 9: HYAL1-Expression nach T-Stadien 39
Abbildung 10: HYAL1-Expression nach Tumordifferenzierung 39
Abbildung 11: HYAL1-v1-Expression nach Tumorstadien 41
Abbildung 12: HYAL1-v1-Expression im Gewebe 41
Abbildung 13: HYAL1-v1-Expression nach Tumordifferenzierung 42
Abbildung 14: HA-Expression im Gewebe 44

Abbildung 15: Kaplan-Meier Analyse zur Progressionswahrscheinlichkeit in Korrelation zur HA-Expression 45
Abbildung 16: HYAL1-Expression im Gewebe 46
Abbildung 17: Kaplan-Meier Analyse zur Rezidivwahrscheinlichkeit in Korrelation zur HYAL1-Expression 47
Abbildung 18: Kaplan-Meier Analyse zur Progressionswahrscheinlichkeit in Korrelation zur HYAL1-Expression 47
Abbildung 19: Kaplan-Meier Analyse zur Progressionswahrscheinlichkeit in Korrelation zur HA/HYAL1-Expression 49

8 LITERATURVERZEICHNIS

[1] Jemal A, Siegel R, Ward E, et al. Cancer statistics, 2006. CA Cancer J Clin. 2006: **56**:106-30

[2] Jemal A, Siegel R, Ward E, Murray T, Xu J, Thun MJ. Cancer statistics, 2007. CA Cancer J Clin. 2007: **57**:43-66

[3] Rübben H. [Bladder Cancer - a series of articles]. Deutsches Ärzteblatt. 2007: **104**:A-718 / B-632 / C-08

[4] Walsh P, Retick A, Vaughan EJ, et al. Campbell's Urology, CD-ROM, Bladder Structure, Urothelial Tumors of the Urinary Tract. 8. edn, 2002

[5] Otto T, Rubben H. [Prevention of bladder cancer]. Urologe A. 2004: **43**:562-4

[6] Howe GR, Burch JD, Miller AB, et al. Tobacco use, occupation, coffee, various nutrients, and bladder cancer. J Natl Cancer Inst. 1980: **64**:701-13

[7] Slattery ML, Schumacher MC, West DW, Robison LM. Smoking and bladder cancer. The modifying effect of cigarettes on other factors. Cancer. 1988: **61**:402-8

[8] Harris RE, Chen-Backlund JY, Wynder EL. Cancer of the urinary bladder in blacks and whites. A case-control study. Cancer. 1990: **66**:2673-80

[9] Theodorescu D. Molecular pathogenesis of urothelial bladder cancer. Histol Histopathol. 2003: **18**:259-74

[10] Hautmann RE, Huland H. Urologie. 2. edn, Berlin, Heidelberg, New York, 2001

[11] Hueper W, Wiley F, Wolfe H. Experimental production of bladder tumours in dogs by administration of beta-naphthylamin. J Indust Hyg Toxicol. 1938: **20**:46

[12] Schär W. Experimentelle Erzeugung von Blasentumoren (Die Wirkung langdauernder Inhalation von aromatischen Amidoverbidungen). Dtsch Z Chir. 1930: **226**:81-97

[13] Perlmann S, Staehler W. Untersuchungen über die Ätiologie der Blasengewächse (Experimentelle Erzeugung von Blasengeschwülsten). Z Urolog Chir. 1933:139-64

[14] Hicks RM, Walters CL, Elsebai I, Aasser AB, Merzabani ME, Gough TA. Demonstration of nitrosamines in human urine: preliminary observations on a possible etiology for bladder cancer in association with chronic urinary tract infections. Proc R Soc Med. 1977: **70**:413-7

[15] Tricker AR, Mostafa MH, Spiegelhalder B, Preussmann R. Urinary excretion of nitrate, nitrite and N-nitroso compounds in Schistosomiasis and bilharzia bladder cancer patients. Carcinogenesis. 1989: **10**:547-52

[16] Kantor AF, Hartge P, Hoover RN, Narayana AS, Sullivan JW, Fraumeni JF, Jr. Urinary tract infection and risk of bladder cancer. Am J Epidemiol. 1984: **119**:510-5

[17] Wynder EL, Onderdonk J, Mantel N. An Epidemiological Investigation Of Cancer Of The Bladder. Cancer. 1963: **16**:1388-407

[18] La Vecchia C, Negri E, D'Avanzo B, Savoldelli R, Franceschi S. Genital and urinary tract diseases and bladder cancer. Cancer Res. 1991: **51**:629-31

[19] Johansson S, Wahlqvist L. Tumours of urinary bladder and ureter associated with abuse of phenacetin-containing analgesics. Acta Pathol Microbiol Scand [A]. 1977: **85**:768-74

[20] Schmelz H, Sparwasser C, W W. Facharztwissen Urologie, Heidelberg: Springer, 2006

[21] Mostofi FK, Sorbin L, Torloni H. Histological typing of urinary bladder tumours. International classification of tumours. 19. edn, Geneva: World Health Organisation, 1973

[22] Epstein JI, Amin MB, Reuter VR, Mostofi FK. The World Health Organization/International Society of Urological Pathology consensus classification of urothelial (transitional cell) neoplasms of the urinary bladder. Bladder Consensus Conference Committee. Am J Surg Pathol. 1998: **22**:1435-48

[23] Mostofi F, Davis C, Sesterhenn I. Histological typing of urinary bladder tumors. WHO 2nd edn, Berlin, Heidelberg, New York: Springer, 1999

[24] Eble J, Sauter G, Epstein I, Sesterhenn I. Tumours of the urinary system and male genital organs, WHO classification of tumours, Lyon: IARC Press, 2004

[25] Jakse G, Algaba F, Malmstrom PU, Oosterlinck W. A second-look TUR in T1 transitional cell carcinoma: why? Eur Urol. 2004: **45**:539-46; discussion 46

[26] Miladi M, Peyromaure M, Zerbib M, Saighi D, Debre B. The value of a second transurethral resection in evaluating patients with bladder tumours. Eur Urol. 2003: **43**:241-5

[27] Lopez-Beltran A, Montironi R. Non-invasive urothelial neoplasms: according to the most recent WHO classification. Eur Urol. 2004: **46**:170-6

[28] Lutzeyer W, Rubben H, Dahm H. Prognostic parameters in superficial bladder cancer: an analysis of 315 cases. J Urol. 1982: **127**:250-2

[29] Sylvester RJ, van der Meijden AP, Oosterlinck W, et al. Predicting recurrence and progression in individual patients with stage Ta T1 bladder cancer using EORTC risk tables: a combined analysis of 2596 patients from seven EORTC trials. Eur Urol. 2006: **49**:466-5; discussion 75-7

[30] Jichlinski P. New diagnostic strategies in the detection and staging of bladder cancer. Curr Opin Urol. 2003: **13**:351-5

[31] Kriegmair M, Zaak D, Rothenberger KH, et al. Transurethral resection for bladder cancer using 5-aminolevulinic acid induced fluorescence endoscopy versus white light endoscopy. J Urol. 2002: **168**:475-8

[32] Riedl CR, Daniltchenko D, Koenig F, Simak R, Loening SA, Pflueger H. Fluorescence endoscopy with 5-aminolevulinic acid reduces early recurrence rate in superficial bladder cancer. J Urol. 2001: **165**:1121-3

[33] Lokeshwar VB, Habuchi T, Grossman HB, et al. Bladder tumor markers beyond cytology: International Consensus Panel on bladder tumor markers. Urology. 2005: **66**:35-63

[34] Paik ML, Scolieri MJ, Brown SL, Spirnak JP, Resnick MI. Limitations of computerized tomography in staging invasive bladder cancer before radical cystectomy. J Urol. 2000: **163**:1693-6

[35] Tavares NJ, Demas BE, Hricak H. MR imaging of bladder neoplasms: correlation with pathologic staging. Urol Radiol. 1990: **12**:27-33

[36] Jager GJ, Barentsz JO, Oosterhof GO, Witjes JA, Ruijs SJ. Pelvic adenopathy in prostatic and urinary bladder carcinoma: MR imaging with a three-dimensional TI-weighted magnetization-prepared-rapid gradient-echo sequence. AJR Am J Roentgenol. 1996: **167**:1503-7

[37] Barentsz JO, Engelbrecht MR, Witjes JA, de la Rosette JJ, van der Graaf M. MR imaging of the male pelvis. Eur Radiol. 1999: **9**:1722-36

[38] Sylvester RJ, Oosterlinck W, van der Meijden AP. A single immediate postoperative instillation of chemotherapy decreases the risk of recurrence in patients with stage Ta T1 bladder cancer: a meta-analysis of published results of randomized clinical trials. J Urol. 2004: **171**:2186-90, quiz 435

[39] Oosterlinck W, Solsona E, van der Meijden AP, et al. EAU guidelines on diagnosis and treatment of upper urinary tract transitional cell carcinoma. Eur Urol. 2004: **46**:147-54

[40] Ghoneim MA, el-Mekresh MM, el-Baz MA, el-Attar IA, Ashamallah A. Radical cystectomy for carcinoma of the bladder: critical evaluation of the results in 1,026 cases. J Urol. 1997: **158**:393-9

[41] Poulsen AL, Horn T, Steven K. Radical cystectomy: extending the limits of pelvic lymph node dissection improves survival for patients with bladder cancer confined to the bladder wall. J Urol. 1998: **160**:2015-9; discussion 20

[42] Lerner SP, Skinner DG, Lieskovsky G, et al. The rationale for en bloc pelvic lymph node dissection for bladder cancer patients with nodal metastases: long-term results. J Urol. 1993: **149**:758-64; discussion 64-5

[43] Sternberg CN, de Mulder PH, Schornagel JH, et al. Randomized phase III trial of high-dose-intensity methotrexate, vinblastine, doxorubicin, and cisplatin (MVAC) chemotherapy and recombinant human granulocyte colony-stimulating factor versus classic MVAC in advanced urothelial tract tumors: European Organization for Research and Treatment of Cancer Protocol no. 30924. J Clin Oncol. 2001: **19**:2638-46

[44] Sternberg CN, Yagoda A, Scher HI, et al. Preliminary results of M-VAC (methotrexate, vinblastine, doxorubicin and cisplatin) for transitional cell carcinoma of the urothelium. J Urol. 1985: **133**:403-7

[45] Sternberg CN, Yagoda A, Scher HI, et al. Methotrexate, vinblastine, doxorubicin, and cisplatin for advanced transitional cell carcinoma of the urothelium. Efficacy and patterns of response and relapse. Cancer. 1989: **64**:2448-58

[46] Saxman SB, Propert KJ, Einhorn LH, et al. Long-term follow-up of a phase III intergroup study of cisplatin alone or in combination with methotrexate, vinblastine, and doxorubicin in patients with metastatic urothelial carcinoma: a cooperative group study. J Clin Oncol. 1997: **15**:2564-9

[47] von der Maase H, Hansen SW, Roberts JT, et al. Gemcitabine and cisplatin versus methotrexate, vinblastine, doxorubicin, and cisplatin in advanced or metastatic bladder cancer: results of a large, randomized, multinational, multicenter, phase III study. J Clin Oncol. 2000: **18**:3068-77

[48] Meyer K, Palmer J. The Polysaccharide of the vitreous humour. J Biol Chem. 1934: **107**:629-34

[49] Tammi MI, Day AJ, Turley EA. Hyaluronan and homeostasis: a balancing act. J Biol Chem. 2002: **277**:4581-4

[50] Weissman B, Meyer K. The structure of hyalobiuronic acid and hyaluroic acis from umbilial cord. J Am Chem Soc. 1954: **76**:1753

[51] Prehm P. Hyaluronate is synthesized at plasma membranes. Biochem J. 1984: **220**:597-600

[52] Misra S, Ghatak S, Zoltan-Jones A, Toole BP. Regulation of multidrug resistance in cancer cells by hyaluronan. J Biol Chem. 2003: **278**:25285-8

[53] Stern R, Asari AA, Sugahara KN. Hyaluronan fragments: an information-rich system. Eur J Cell Biol. 2006: **85**:699-715

[54] Cheung WF, Cruz TF, Turley EA. Receptor for hyaluronan-mediated motility (RHAMM), a hyaladherin that regulates cell responses to growth factors. Biochem Soc Trans. 1999: **27**:135-42

[55] Lesley J, Hascall VC, Tammi M, Hyman R. Hyaluronan binding by cell surface CD44. J Biol Chem. 2000: **275**:26967-75

[56] Day AJ, Prestwich GD. Hyaluronan-binding proteins: tying up the giant. J Biol Chem. 2002: **277**:4585-8

[57] Powell JD, Horton MR. Threat matrix: low-molecular-weight hyaluronan (HA) as a danger signal. Immunol Res. 2005: **31**:207-18

[58] Evanko SP, Wight TN. Intracellular localization of hyaluronan in proliferating cells. J Histochem Cytochem. 1999: **47**:1331-42

[59] Toole BP, Zoltan-Jones A, Misra S, Ghatak S. Hyaluronan: a critical component of epithelial-mesenchymal and epithelial-carcinoma transitions. Cells Tissues Organs. 2005: **179**:66-72

[60] Zoltan-Jones A, Huang L, Ghatak S, Toole BP. Elevated hyaluronan production induces mesenchymal and transformed properties in epithelial cells. J Biol Chem. 2003: **278**:45801-10

[61] Toole BP, Wight TN, Tammi MI. Hyaluronan-cell interactions in cancer and vascular disease. J Biol Chem. 2002: **277**:4593-6

[62] Tammi R, MacCallum D, Hascall VC, Pienimaki JP, Hyttinen M, Tammi M. Hyaluronan bound to CD44 on keratinocytes is displaced by hyaluronan decasaccharides and not hexasaccharides. J Biol Chem. 1998: **273**:28878-88

[63] Banerji S, Day AJ, Kahmann JD, Jackson DG. Characterization of a functional hyaluronan-binding domain from the human CD44 molecule expressed in Escherichia coli. Protein Expr Purif. 1998: **14**:371-81

[64] Knudson CB, Knudson W. Hyaluronan-binding proteins in development, tissue homeostasis, and disease. Faseb J. 1993: **7**:1233-41

[65] Pilarski LM, Masellis-Smith A, Belch AR, Yang B, Savani RC, Turley EA. RHAMM, a receptor for hyaluronan-mediated motility, on normal human lymphocytes, thymocytes and malignant B cells: a mediator in B cell malignancy? Leuk Lymphoma. 1994: **14**:363-74

[66] van de Stolpe A, van der Saaq PT. Intracellular adhesion molecule-1. J Mol Med. 1996: **74**:13-33

[67] Kong QY, Liu J, Chen XY, Wang XW, Sun Y, Li H. Differential expression patterns of hyaluronan receptors CD44 and RHAMM in transitional cell carcinomas of urinary bladder. Oncol Rep. 2003: **10**:51-5

[68] Park DS, Park JH, Lee JL, et al. Induction of ICAM-1, HLA-DR molecules by IFN-gamma and oncogene expression in human bladder cancer cell lines. Urol Int. 1997: **59**:72-80

[69] Srebrow A, Kornblihtt AR. The connection between splicing and cancer. J Cell Sci. 2006: **119**:2635-41

[70] Bertrand P, Girard N, Delpech B, Duval C, d'Anjou J, Dauce JP. Hyaluronan (hyaluronic acid) and hyaluronectin in the extracellular matrix of human breast carcinomas: comparison between invasive and non-invasive areas. Int J Cancer. 1992: **52**:1-6

[71] Jojovic M, Delpech B, Prehm P, Schumacher U. Expression of hyaluronate and hyaluronate synthase in human primary tumours and their metastases in scid mice. Cancer Lett. 2002: **188**:181-9

[72] Paris S, Sesboue R, Chauzy C, Maingonnat C, Delpech B. Hyaluronectin modulation of lung metastasis in nude mice. Eur J Cancer. 2006: **42**:3253-9

[73] Victor R, Chauzy C, Girard N, et al. Human breast-cancer metastasis formation in a nude-mouse model: studies of hyaluronidase, hyaluronan and hyaluronan-binding sites in metastatic cells. Int J Cancer. 1999: **82**:77-83

[74] Bullard KM, Kim HR, Wheeler MA, et al. Hyaluronan synthase-3 is upregulated in metastatic colon carcinoma cells and manipulation of expression alters matrix retention and cellular growth. Int J Cancer. 2003: **107**:739-46

[75] Liu N, Gao F, Han Z, Xu X, Underhill CB, Zhang L. Hyaluronan synthase 3 overexpression promotes the growth of TSU prostate cancer cells. Cancer Res. 2001: **61**:5207-14

[76] Udabage L, Brownlee GR, Nilsson SK, Brown TJ. The over-expression of HAS2, Hyal-2 and CD44 is implicated in the invasiveness of breast cancer. Exp Cell Res. 2005: **310**:205-17

[77] Yabushita H, Noguchi M, Kishida T, et al. Hyaluronan synthase expression in ovarian cancer. Oncol Rep. 2004: **12**:739-43

[78] Lokeshwar VB, Selzer MG. Differences in hyaluronic acid-mediated functions and signaling in arterial, microvessel, and vein-derived human endothelial cells. J Biol Chem. 2000: **275**:27641-9

[79] Golshani R, Hautmann SH, Estrella V, et al. HAS1 expression in bladder cancer and its relation to urinary HA test. Int J Cancer. 2007: **120**:1712-20

[80] Hautmann SH, Lokeshwar VB, Schroeder GL, et al. Elevated tissue expression of hyaluronic acid and hyaluronidase validates the HA-HAase urine test for bladder cancer. J Urol. 2001: **165**:2068-74

[81] Hayen W, Goebeler M, Kumar S, Riessen R, Nehls V. Hyaluronan stimulates tumor cell migration by modulating the fibrin fiber architecture. J Cell Sci. 1999: **112 (Pt 13)**:2241-51

[82] Hobarth K, Maier U, Marberger M. Topical chemoprophylaxis of superficial bladder cancer with mitomycin C and adjuvant hyaluronidase. Eur Urol. 1992: **21**:206-10

[83] Itano N, Atsumi F, Sawai T, et al. Abnormal accumulation of hyaluronan matrix diminishes contact inhibition of cell growth and promotes cell migration. Proc Natl Acad Sci U S A. 2002: **99**:3609-14

[84] Kreil G. Hyaluronidases--a group of neglected enzymes. Protein Sci. 1995: **4**:1666-9

[85] Csoka AB, Frost GI, Stern R. The six hyaluronidase-like genes in the human and mouse genomes. Matrix Biol. 2001: **20**:499-508

[86] Stern R, Jedrzejas MJ. Hyaluronidases: their genomics, structures, and mechanisms of action. Chem Rev. 2006: **106**:818-39

[87] Lepperdinger G, Mullegger J, Kreil G. Hyal2--less active, but more versatile? Matrix Biol. 2001: **20**:509-14

[88] Lokeshwar VB, Rubinowicz D, Schroeder GL, et al. Stromal and epithelial expression of tumor markers hyaluronic acid and HYAL1 hyaluronidase in prostate cancer. J Biol Chem. 2001: **276**:11922-32

[89] Al'Qteishat A, Gaffney J, Krupinski J, et al. Changes in hyaluronan production and metabolism following ischaemic stroke in man. Brain. 2006: **129**:2158-76

[90] Dechert TA, Ducale AE, Ward SI, Yager DR. Hyaluronan in human acute and chronic dermal wounds. Wound Repair Regen. 2006: **14**:252-8

[91] Franzmann EJ, Schroeder GL, Goodwin WJ, Weed DT, Fisher P, Lokeshwar VB. Expression of tumor markers hyaluronic acid and hyaluronidase (HYAL1) in head and neck tumors. Int J Cancer. 2003: **106**:438-45

[92] Lerman MI, Minna JD. The 630-kb lung cancer homozygous deletion region on human chromosome 3p21.3: identification and evaluation of the resident candidate tumor suppressor genes. The International Lung Cancer Chromosome 3p21.3 Tumor Suppressor Gene Consortium. Cancer Res. 2000: **60**:6116-33

[93] Madan AK, Yu K, Dhurandhar N, Cullinane C, Pang Y, Beech DJ. Association of hyaluronidase and breast adenocarcinoma invasiveness. Oncol Rep. 1999: **6**:607-9

[94] Posey JT, Soloway MS, Ekici S, et al. Evaluation of the prognostic potential of hyaluronic acid and hyaluronidase (HYAL1) for prostate cancer. Cancer Res. 2003: **63**:2638-44

[95] Stern R. Hyaluronan metabolism: a major paradox in cancer biology. Pathol Biol (Paris). 2005: **53**:372-82

[96] Lokeshwar VB, Young MJ, Goudarzi G, et al. Identification of bladder tumor-derived hyaluronidase: its similarity to HYAL1. Cancer Res. 1999: **59**:4464-70

[97] Chang NS. Transforming growth factor-beta1 blocks the enhancement of tumor necrosis factor cytotoxicity by hyaluronidase Hyal-2 in L929 fibroblasts. BMC Cell Biol. 2002: **3**:8

[98] Sekido Y, Ahmadian M, Wistuba, II, et al. Cloning of a breast cancer homozygous deletion junction narrows the region of search for a 3p21.3 tumor suppressor gene. Oncogene. 1998: **16**:3151-7

[99] Triggs-Raine B, Salo TJ, Zhang H, Wicklow BA, Natowicz MR. Mutations in HYAL1, a member of a tandemly distributed multigene family encoding disparate hyaluronidase activities, cause a newly described lysosomal disorder, mucopolysaccharidosis IX. Proc Natl Acad Sci U S A. 1999: **96**:6296-300

[100] Lokeshwar VB, Lokeshwar BL, Pham HT, Block NL. Association of elevated levels of hyaluronidase, a matrix-degrading enzyme, with prostate cancer progression. Cancer Res. 1996: **56**:651-7

[101] Liu D, Pearlman E, Diaconu E, et al. Expression of hyaluronidase by tumor cells induces angiogenesis in vivo. Proc Natl Acad Sci U S A. 1996: **93**:7832-7

[102] Bertrand P, Girard N, Duval C, et al. Increased hyaluronidase levels in breast tumor metastases. Int J Cancer. 1997: **73**:327-31

[103] Delpech B, Laquerriere A, Maingonnat C, Bertrand P, Freger P. Hyaluronidase is more elevated in human brain metastases than in primary brain tumours. Anticancer Res. 2002: **22**:2423-7

[104] Lokeshwar VB, Estrella V, Lopez L, et al. HYAL1-v1, an alternatively spliced variant of HYAL1 hyaluronidase: a negative regulator of bladder cancer. Cancer Res. 2006: **66**:11219-27

[105] Brown ML, Riley GF, Schussler N, Etzioni R. Estimating health care costs related to cancer treatment from SEER-Medicare data. Med Care. 2002: **40**:IV-104-17

[106] Kononen J, Bubendorf L, Kallioniemi A, et al. Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumor specimens. Nat Med. 1998: **4**:844-7

[107] Kramer MW, Merseburger AS, Hennenlotter J, Kuczyk M. Tissue microarrays in clinical urology - Technical considerations. Scand J Urol Nephrol. 2007:1-7

[108] Lokeshwar VB, Obek C, Soloway MS, Block NL. Tumor-associated hyaluronic acid: a new sensitive and specific urine marker for bladder cancer. Cancer Res. 1997: **57**:773-7

[109] Theodorescu D, Broder SR, Boyd JC, Mills SE, Frierson HF, Jr. Cathepsin D and chromogranin A as predictors of long term disease specific survival after radical prostatectomy for localized carcinoma of the prostate. Cancer. 1997: **80**:2109-19

[110] Shepard HM, Jin P, Slamon DJ, Pirot Z, Maneval DC. Herceptin. Handb Exp Pharmacol. 2008:183-219

[111] Delpech B, Girard N, Bertrand P, Courel MN, Chauzy C, Delpech A. Hyaluronan: fundamental principles and applications in cancer. J Intern Med. 1997: **242**:41-8

[112] Laurent TC, Fraser JR. Hyaluronan. Faseb J. 1992: **6**:2397-404

[113] Auvinen P, Tammi R, Parkkinen J, et al. Hyaluronan in peritumoral stroma and malignant cells associates with breast cancer spreading and predicts survival. Am J Pathol. 2000: **156**:529-36

[114] Ropponen K, Tammi M, Parkkinen J, et al. Tumor cell-associated hyaluronan as an unfavorable prognostic factor in colorectal cancer. Cancer Res. 1998: **58**:342-7

[115] Knudson W, Biswas C, Toole BP. Interactions between human tumor cells and fibroblasts stimulate hyaluronate synthesis. Proc Natl Acad Sci U S A. 1984: **81**:6767-71

[116] Simpson MA, Wilson CM, McCarthy JB. Inhibition of prostate tumor cell hyaluronan synthesis impairs subcutaneous growth and vascularization in immunocompromised mice. Am J Pathol. 2002: **161**:849-57

[117] Yamada Y, Itano N, Narimatsu H, et al. Elevated transcript level of hyaluronan synthase1 gene correlates with poor prognosis of human colon cancer. Clin Exp Metastasis. 2004: **21**:57-63

[118] De Klerk DP. The glycosaminoglycans of human bladder cancers of varying grade and stage. J Urol. 1985: **134**:978-81

[119] Lokeshwar VB, Obek C, Pham HT, et al. Urinary hyaluronic acid and hyaluronidase: markers for bladder cancer detection and evaluation of grade. J Urol. 2000: **163**:348-56

[120] Anttila MA, Tammi RH, Tammi MI, Syrjanen KJ, Saarikoski SV, Kosma VM. High levels of stromal hyaluronan predict poor disease outcome in epithelial ovarian cancer. Cancer Res. 2000: **60**:150-5

[121] Ekici S, Cerwinka WH, Duncan R, et al. Comparison of the prognostic potential of hyaluronic acid, hyaluronidase (HYAL-1), CD44v6 and microvessel density for prostate cancer. Int J Cancer. 2004: **112**:121-9

[122] Vizoso FJ, del Casar JM, Corte MD, et al. Significance of cytosolic hyaluronan levels in gastric cancer. Eur J Surg Oncol. 2004: **30**:318-24

[123] Passerotti CC, Bonfim A, Martins JR, et al. Urinary hyaluronan as a marker for the presence of residual transitional cell carcinoma of the urinary bladder. Eur Urol. 2006: **49**:71-5

[124] Duran-Reynals F. Studies on a certain spreading factor existing in bacteria and its significance for bacterial invasiveness. J Exp Med. 1933: **58**:161-81

[125] Jacobson A, Rahmanian M, Rubin K, Heldin P. Expression of hyaluronan synthase 2 or hyaluronidase 1 differentially affect the growth rate of transplantable colon carcinoma cell tumors. Int J Cancer. 2002: **102**:212-9

[126] Lokeshwar VB, Cerwinka WH, Lokeshwar BL. HYAL1 hyaluronidase: a molecular determinant of bladder tumor growth and invasion. Cancer Res. 2005: **65**:2243-50

[127] Lin G, Stern R. Plasma hyaluronidase (Hyal-1) promotes tumor cell cycling. Cancer Lett. 2001: **163**:95-101

[128] Pham HT, Block NL, Lokeshwar VB. Tumor-derived hyaluronidase: a diagnostic urine marker for high-grade bladder cancer. Cancer Res. 1997: **57**:778-83

[129] Bharadwaj AG, Rector K, Simpson MA. Inducible hyaluronan production reveals differential effects on prostate tumor cell growth and tumor angiogenesis. J Biol Chem. 2007: **282**:20561-72

[130] Lokeshwar VB, Iida N, Bourguignon LY. The cell adhesion molecule, GP116, is a new CD44 variant (ex14/v10) involved in hyaluronic acid binding and endothelial cell proliferation. J Biol Chem. 1996: **271**:23853-64

[131] West DC, Kumar S. The effect of hyaluronate and its oligosaccharides on endothelial cell proliferation and monolayer integrity. Exp Cell Res. 1989: **183**:179-96

[132] Lokeshwar VB, Schroeder GL, Carey RI, Soloway MS, Iida N. Regulation of hyaluronidase activity by alternative mRNA splicing. J Biol Chem. 2002: **277**:33654-63

[133] Lokeshwar VB, Cerwinka WH, Isoyama T, Lokeshwar BL. HYAL1 hyaluronidase in prostate cancer: a tumor promoter and suppressor. Cancer Res. 2005: **65**:7782-9

[134] Golshani R, Lopez L, Estrella V, Kramer M, Iida N, Lokeshwar VB. Hyaluronic acid synthase-1 expression regulates bladder cancer growth, invasion, and angiogenesis through CD44. Cancer Res. 2008: **68**:483-91

9 DANKSAGUNG

An dieser Stelle danke ich herzlich sowohl Herrn Prof. Dr. A. Stenzl (Ärztlicher Direktor der Klinik für Urologie, Universitätsklinikum Tübingen) wie auch Herrn Prof. Dr. M. Kuczyk (Ärztlicher Direktor der Klinik für Urologie und urologischer Onkologie, Medizinische Hochschule Hannover) für die Überlassung des Themas, wissenschaftliche Betreuung und die Bereitstellung von Forschungsmitteln.

Herrn Dr. A.S. Merseburger danke ich besonders für seine freundschaftliche Unterstützung und seine stets konstante Förderung sowie für die Bahnung des wissenschaftlichen USA Aufenthaltes im Rahmen dieser Dissertation.

Danken möchte ich auch Herrn Prof. Dr. H. Stolte und seinen Mitarbeitern der International Academy of Life Sciences.

Mein Dank gilt allen Mitarbeitern des hiesigen urologisch-onkologischen Labors, besonders aber Herrn Dipl. Biologen J. Hennenlotter und Frau Kuehs für die zahlreichen Ideen und praktische Hilfestellungen.

Für die außergewöhnliche Chance, an einem renommierten wissenschaftlichen Institut als junger Eleve arbeiten zu dürfen, möchte ich besonders herzlich Frau Prof. Dr. V. Lokeshwar (Miller Medical School, University of Miami, Florida, USA) danken. Sie und Ihre Mitarbeiter Roozbeh Golshani sowie Louis Lopez haben entscheidenden Anteil an der Umsetzung dieser Arbeit und an meinem erfolgreichen wissenschaftlichen Austausch.

Meinen lieben Eltern danke ich für Ihre immerwährende Förderung, Ihre stets guten Ratschläge und ihre fortwährende Unterstützung in allen Lebenslagen.

10 LEBENSLAUF

Personalien

Name:	Mario Wolfgang Kramer
Geburtsdatum:	21.09.1980
Geburtsort:	Nagold
Nationalität:	deutsch
Familienstand:	ledig

Schulbildung

1987 – 1991	Grundschule Oberjettingen
1991	Grundschule Kämpfelbach – Bilfingen
1991 – 2000	Lise-Meitner Gymnasium Königsbach-Stein

Studium und Beruf

2000 – 2001	Zivildienst als Rettungssanitäter beim Roten Kreuz, Kreisverband Pforzheim
WS 2001/2001	Beginn Medizinstudium, Universität Tübingen
SS 2003	Ärztliche Vorprüfung (Physikum)
2005 – 2007	Wissenschaftlicher Forschungsaufenthalt im Rahmen der Dissertation an der University of Miami, Miller School of Medicine, Florida, USA. Stipendiat der *International Academy of Life Sciences (IALS)* im Rahmen des *Biomedical Science Exchange Programs (BMEP)*.
26.05.2009	Ärztliche Prüfung (Hammerexamen)
05.06.2009	Erlangung der Approbation
Seit 10/2009	Wissenschaftlicher Mitarbeiter der Klinik für Urologie und Urologische Onkologie der Medizinischen Hochschule Hannover

Famulaturen und Praktisches Jahr

2003	KH St. Trudpert, Pforzheim (Chirurgie)
2004	KH Leonberg (Innere Medizin)
2004	Universität Tübingen (Urologie)
2007	Pforzheim (Allgemeinmedizin, Praxis)
2008 – 2009	Universität Tübingen (Wahlfach Urologie; PJ)

Wissenschaftliche Arbeiten

Lokeshwar VB, Estrella V, Lopez L, Kramer M, Gomez P, Soloway MS, Lokeshwar BL: *HYAL1-v1, an alternatively spliced variant of HYAL1 hyaluronidase: a negative regulator of bladder cancer.* Cancer Res. 2006; 66(23):11219-27

Kramer MW, Merseburger AS, Hennenlotter J, Kuczyk M: *Tissue microarrays in clinical urology – technical considerations*. Scand J Urol Nephrol. 2007; 41(6):478-84. Review.

Golshani R, Lopez L, Estrella V, Kramer M, Iida N, Lokeshwar VB: *Hyaluronic acid synthase-1 expression regulates bladder cancer growth, invasion, and angiogenesis through CD44.* Cancer Res. 2008; 68(2):483-91

Merseburger AS, Kramer MW, Hennenlotter J, Simon P, Knapp J, Hartmann JT, Stenzl A, Serth J, Kuczyk MA: *Involvement of decreased Galectin-3 expression in the pathogenesis and progression of prostate cancer.* Prostate. 2008; 68(1):72-7 *(both first authors contributed equally)*

Hennenlotter J, Ohneseit PA, Simon P, Merseburger AS, Serth J, Kuehs U, Kramer M, Hartmann JT, Stenzl A, Kuczyk AS: *PTEN und p27Kip1 are not downregulated in the majority of renal cell carcinomas – implications for Akt activation.* Oncol Rep. 2008; 19(5):1141-7

Kruck S, Kuczyk MA, Gakis G, Kramer MW, Stenzl A, Merseburger AS: *Novel therapeutic options in metastatic renal cell cancer – review and post ASCO 2007 update.* Rev Recent Clin Trials. 2008; 3(3):212-6. Review.

Lokeshwar VB, Gomez P, Kramer M, Knapp J, McCornack MA, Lopez LE, Fregien N, Dhir N, Scherer S, Klumpp DJ, Manoharan M, Soloway MS, Lokeshwar BL: *Epigenetic regulation of HYAL-1 hyaluronidase expression, identification of HYAL-1 promoter.* J Biol Chem. 2008; 283(43):29215-27

Kruck S, Merseburger AS, Gakis G, Kramer MW, Stenzl A, Kuczyk AS: *An update on the medical therapy of advanced metastatic renal cell carcinoma.* Scand J Urol Nephrol. 2008; 42(6):501-6. Review.

Merseburger AS, Kramer MW, Hennenlotter J, Serth J, Kruck S, Garcia A, Stenzl A, Kuczyk MA: *Loss of galectin-3 expression correlates with clear cell renal carcinoma progression and reduced survival.* World J Urol. 2008; 26(6):637-42. *(both first authors contributed equally)*

Kramer MW, Kuczyk MA, Hennenlotter J, Serth J, Schilling D, Stenzl A, Merseburger AS: *Decreased expression of galectin-3 predicts tumour recurrence in pTa bladder cancer.* Oncol Rep. 2008; 20(6):1403-8

Waalkes S, Kramer M, Herrmann TR, Schrader AJ, Kuczyk MA, Merseburger AS: *Present state of target therapy for disseminated renal cell carcinoma.* Immunotherapy 2010; 2(3):393-8 Review

Waalkes S, Merseburger AS, Herrmann TR, Kramer MW, Wegener G, Rustemeier J, Hofmann R, Kuczyk MA, Schrader AJ: *Urinary collecting system invasion is no independent prognostic factor in renal cell carcinoma.* World J Urol. 2010; 28(3):283-8

Waalkes S, Merseburger AS, Kramer MW, Herrmann TR, Wegener G, Rustemeier J, Hofmann R, Schrader M, Kuczyk MA, Schrader AJ: *Obesity is associated with improved survival in patients with organ-confined clear-cell kidney cancer.* Cancer Causes Control. 2010; 21(11):1905-10

Kramer MW, Golshani R, Merseburger AS, Knapp J, Garcia A, Hennenlotter J, Duncan RC, Soloway MS, Merce J, Kuczyk MA, Stenzl A, Lokeshwar VB: *HYAL-1 hyaluronidase: a potential prognostic indicator for progression to muscle invasion and recurrence in bladder cancer.* Eur Urol. 2010; 57(1):86-93

Waalkes S, Atschekzei F, Kramer MW, Hennenlotter J, Vetter G, Becker JU, Stenzl A, Merseburger AS, Schrader AJ, Kuczyk MA, Serth J. *Fibronectin 1 mRNA expression correlates with advanced disease in renal cancer.* BMC Cancer 2010; 10:503

Kramer MW, Krege S, Peters I, Merseburger AS, Kuczyk MA: *Targeted therapy of urological tumours. Experimental field or established therapeutic approach?* Urologe A 2010; 49(10):1260-5 Review. German

Kramer MW, Merseburger AS, Tezval H: *Can aquaporin-1 and adipophilin in urine distinguish between malignant and nonmalignant renal lesions?* Mayo Clin Proc. 2010; 85(8):768; author reply 768-9

Kramer MW, Waalkes S, Hennenlotter J, Serth J, Stenzl A, Kuczyk MA, Merseburger AS: *Maspin protein expression correlates with tumor progression in non-muscle invasive bladder cancer.* Oncology Letters 2010; 1:621-626

Waalkes S, Rott H, Herrmann TR, Wegener G, Kramer MW, Merseburger AS, Schrader M, Hofmann R, Kuczyk MA, Schrader AJ. *Does male sex influence the prognosis of patients with renal cancer?* Onkologie 2011; 34(1-2):24-8

Waalkes S, Eggers H, Blasig H, Atschekzei, Kramer MW, Hennenlotter J, Tränkenschuh W, Stenzl A, Serth J, Schrader AJ, Kuczyk MA, Merseburger AS: *Caveolin 1 mRNA is overexpressed in malignant renal tissue and might serve as a novel diagnostic marker for renal cancer.* Biomark Med. 2011; 5(2):219-25

Kramer MW, Escudero DO, Lokeshwar SD, Golshani R, Ekwenna OO, Acosta K, Merseburger AS, Soloway M, Lokeshwar VB: *Association of hyaluronic acid family members (HAS1, HAS2, and HYAL-1) with bladder cancer diagnosis and prognosis.* Cancer 2011; 15;117(6):1197-209

Wolters M, Kramer MW, Becker JU, Christgen M, Nagele U, Imkamp F, Burchardt M, Merseburger AS, Kuczyk MA, Bach T, Gross AJ, Herrmann TR: *Tm:YAG laser en bloc mucosectomy for accurate staging of primary bladder cancer: early experience.* World J Urol. 2011; May 8 [Epub ahead of print] *(both first authors contributed equally)*

Kramer MW, Bach T, Wolters M, Imkamp F, Gross AJ, Kuczyk MA, Merseburger AS, Herrmann TR: *Current evidence for transurethral laser therapy of non-muscle invasive bladder cancer*. World J Urol. 2011; May 5 [Epub ahead of print]

[weitere Veröffentlichungen in Form von Vorträgen und Kongressbeiträgen sind nicht aufgelistet]

Preise

Award for exceptional scientific work. University of Miami, Miller School of Medicine, Miami, Florida, USA 2006.

Nachwuchsförderpreis: Die Besten der Urologie. Deutsche Gesellschaft für Urologie. Berlin 2007.

Bestes Poster, AUA 2010, San Francisco,
Session: Bladder Cancer: Basic Research II
Titel: Diagnosis, metastasis and recurrence of transitional cell carcinoma of the bladder are associated with expression of hyaluronic acid regulators.

Bestes Poster, 2. Preis, 4. Nordkongress Urologie, 2010, Potsdam
Titel: Differenzierung von benignen Nierenerkrankungen und Nierenzellkarzinomen durch Caveolin 1 und ITGA5 Expression.

Hannelore-Munke Forschungsstipendium 2011 der Medizinischen Hochschule Hannover

Residents‘ Corner Award 2011 – European Journal of Urology