

*AUS DEM LEHRSTUHL FÜR PATHOLOGIE  
DIREKTOR: PROF. DR. MED. F. HOFSTÄDTER  
DER MEDIZINISCHEN FAKULTÄT  
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG*

*SEQUENZPOLYMORPHISMUS 309 IM ONKOGEN MDM2 KORRELIERT MIT  
INVASIVEM WACHSTUM BEIM UROTHELKarZINOM DER HARNBLASE*

Inauguraldissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin

der  
Medizinischen Fakultät  
der Universität Regensburg

vorgelegt von  
Florian Hitzenbichler

2011



*AUS DEM LEHRSTUHL FÜR PATHOLOGIE  
DIREKTOR: PROF. DR. MED. F. HOFSTÄDTER  
DER MEDIZINISCHEN FAKULTÄT  
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG*

*SEQUENZPOLYMORPHISMUS 309 IM ONKOGEN MDM2 KORRELIERT MIT  
INVASIVEM WACHSTUM BEIM UROTHELKRZINOM DER HARNBLASE*

Inauguraldissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin

der  
Medizinischen Fakultät  
der Universität Regensburg

vorgelegt von  
Florian Hitzenbichler

2011



Dekan: Prof. Dr. Bernhard Weber

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Arndt Hartmann

2. Berichterstatter: PD Dr. Maximilian Burger

Tag der mündlichen Prüfung: 18.01.2012

*Meinen Eltern gewidmet*

# Inhaltsverzeichnis

<b>A. Einleitung:</b>	<b>10</b>
1. Anatomie der Harnblase:	10
2. Das Urothelkarzinom:	10
2.1. Definition und Epidemiologie:	10
2.2. Lokalisation:	11
2.3. Exogene Risikofaktoren:	12
2.3.1. Rauchen:	12
2.3.2. Exposition von bestimmten Chemikalien:	13
2.3.3. Nahrungsmittel:	13
2.3.4. Chronische Entzündungen der Harnwege:	14
2.3.5. Bestrahlung:	14
2.3.6. Geschlecht:	14
2.4. Histopathologie:	15
2.4.1. Urothel:	15
2.4.2. Hyperplasie:	15
2.4.3. Dysplasie:	15
2.4.4. Carcinoma in situ (CIS):	15
2.4.5. Papillom:	15
2.4.6. Nicht invasives papilläres urotheliales Karzinom:	15
2.4.7. Invasives Urothelkarzinom:	16
2.5. Staging und Differenzierung:	17
2.6. Diagnose und Therapie:	19
2.6.1. Symptome:	19
2.6.2. Diagnose:	19
2.6.3. Therapie:	19
2.6.4. Nachsorge:	21
3. Molekularpathologie des Urothelkarzinoms:	22
3.1. <i>RTK-Ras</i> -pathway und FGFR3:	23
3.2. Chromosomale Veränderungen:	23
3.3. <i>p53 pathway</i> :	24
3.4. <i>RB pathway</i> :	25
3.5. Polymorphismen:	25
3.6. Urothelkarzinom bei jungen Patienten:	26
4. Single Nucleotid Polymorphismus (SNPs):	27
4.1. Allgemeines:	27
4.2. SNPs und Harnblasenkarzinom:	28
5. p53 – “Wächter des Genoms”:	29
6. Bedeutung von MDM2:	31
6.1. Negative Regulierung von p53:	31
6.2. Amplifikation von MDM2:	31
6.3. SNP309 in MDM2:	32
6.4. Bedeutung von der G Variante in SNP309 in der Entstehung von verschiedenen Tumoren:	34
6.5. Geschlechtsabhängige Wirkung von SNP309 in MDM2:	37
7. Zielsetzung der Arbeit:	39

<b>B. Material und Methoden:</b>	<b>40</b>
1. Vorliegendes Material:	40
2. Gewinnung von DNA: Mikrodissektion von Material aus Paraffinblöcken:	42
2.1. Einbettung des Gewebes in Paraffin zur Lagerung:	42
2.2. Entparaffinierung:	43
2.3. HE-Färbung der Schnitte:	43
2.4. Mikrodissektion und anschließende Isolierung der DNA:	44
3. PCR, Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus (RFLP) und Vermessung mit Hilfe der Kapillarelektrophorese:	45
3.1. Grundprinzip:	45
3.2. Standard-PCR:	46
3.3. Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus-Analyse (RFLP-Analyse):	48
3.4. Exakte Darstellung der DNA-Abschnitte des PCR-Produkts mit SNP309 bei MDM2 inklusive Schnittstelle von <i>MspAII</i> :	50
4. ABI Analyse:	51
4.1. Elektrophorese und Kapillarelektrophorese – Prinzip und verwendete Materialien:	51
4.2. Fragmentanalyse im ABI Prism® 3100-Avant Genetic Analyzer:	51
5. Sequenzierung:	53
6. Software:	54
<b>C. Ergebnisse:</b>	<b>55</b>
1. Kontrolle der Ergebnisse der RFLP-Analyse durch Sequenzierung:	55
2. Altersverteilung und Verteilung der Tumorstadien in den drei untersuchten Gruppen:	57
3. Kontrollgruppe:	60
4. Tumorgruppen: Junge Patienten und Konsekutive Fälle:	61
5. Hardy-Weinberg-Gleichgewicht:	63
6. Ergebnisse der statistischen Auswertung:	64
6.1. SNP309 nimmt keinen Einfluss auf das Risiko, an einem Urothelkarzinom zu erkranken.	64
6.2. Signifikante Häufung von SNP309 G bei invasiven Tumoren:	66
6.3. Kein Einfluss von SNP309 auf Differenzierung (Grading) von Urothelkarzinomen:	69
6.4. Kein Zusammenhang zwischen Geschlecht der Patienten und dem Auftreten von SNP309:	71
6.5. Keine Assoziation zwischen der G Variante in SNP309 und dem Erkrankungsalter bei nicht-invasiven Tumoren:	73
<b>D. Diskussion:</b>	<b>74</b>

<b>E. Zusammenfassung:</b>	<b>80</b>
<b>F. Ausblick:</b>	<b>81</b>
<b>G. Verzeichnis der verwendeten Literatur:</b>	<b>82</b>
<b>H. Anhang:</b>	<b>91</b>
1. Danksagung:	91
2. Lebenslauf:	92

# A. EINLEITUNG

## 1. Anatomie der Harnblase

(aus: Drenckhahn et al, 2008)

Die Harnblase (*Vesica urinaria*) sammelt den Urin, der über die beiden Ureteren zufließt.

Die Blase ist hinter der Symphyse gelegen, die basalen Anteile sind dabei subperitoneal lokalisiert. Vor der Harnblase gelegen ist das *Spatium retropubicum*, in dem sich lockeres Bindegewebe befindet. Genau in diesem Spalt folgt die Ausdehnung der Blase – dies geschieht, indem das Peritoneum von der Bauchwand abgeschoben wird. (Die Blasenpunktion ist also direkt über der Symphyse ohne Verletzung des Bauchfells nur bei gefüllter Blase möglich.)

Die Schleimhaut der Blase ist verschieblich und gefaltet. Bei gefülltem Zustand verstreichen die Falten der Blase.

Die Harnblase besteht aus einer kräftigen Muskelschicht, dem *M. detrusor vesicae* („Austreiber“). Hier werden drei Schichten unterschieden: eine äußere und innere Längsmuskulatur und eine dazwischen gelegene Schicht aus zirkulär verlaufenden Muskelfasern. Aus den längs verlaufenden Zügen wird die Muskulatur der Urethra. Dazu kommt die Fortsetzung der Ureterenmuskulatur, die Trigonummuskulatur.

## 2. Das Urothelkarzinom

### 2.1. Definition und Epidemiologie

Urothelkarzinome zeigen eine starke geographische und geschlechtsbezogenen Streuung über die gesamte Welt: Afroamerikaner und Japaner sind am seltensten betroffen, wohingegen besonders hohe Zahlen bei in der Stadt lebenden Kaukasiern in Westeuropa und den USA gefunden werden.

Die hohe Inzidenz des Urothelkarzinoms in Ägypten, Sudan und anderen afrikanischen Ländern ist auf das epidemische Auftreten von Bilharziose zurückzuführen (Rubin et al, 2008)

Urothelkarzinome sind die häufigsten Malignome des Urogenitaltrakts in Europa. Im westlichen und im südlichen Teil findet sich die höchsten Inzidenzraten (Babjuk et al, 2008).

Im Jahre 2007 wurden in Europa ca. 104.400 Blasentumoren diagnostiziert. Davon entfallen 21.600 Fälle auf weibliche, 82.800 auf männliche Patienten (6,6% aller Tumoren überhaupt). Dies macht das Harnblasenkarzinom zum vierthäufigsten Tumor des Mannes (Stenzl et al, 2008).

90% der malignen Tumoren der ableitenden Harnwege sind dem histopathologischen Phänotyp des Urothelkarzinoms zuzurechnen (der Rest sind Plattenepithel- und Adenokarzinome).

Männer sind dreifach häufiger betroffen als Frauen. Vor dem 40. Lebensjahr sind diese Tumore sehr selten, meist treten sie zwischen dem 50. und 80. Lebensjahr auf (Böcker et al, 2001; Rubin et al, 2008). Nach Informationen des *Bevölkerungsbezogenen Krebsregisters Bayern* liegt das mediane Erkrankungsalter für Männer bei 71 Jahren und für Frauen bei 73 Jahren (Daten von 2006). Für ganz Deutschland liegt der Median bei Männern bei 72 Jahren, bei Frauen bei 74 Jahren, gemäß den Krebsregisterdaten des Robert-Koch-Instituts.<sup>1</sup>

Jährlich sterben etwa 132.000 Menschen an den Folgen des Urothelkarzinoms (Wu, 2005).

## 2.2. Lokalisation

Typisch für Urothelkarzinome ist, dass sie multifokal auftreten. Nicht selten kommt es nach erfolgreicher Therapie zu einem Rezidiv an anderer Stelle des Urothel ausgekleideten Harntrakts.

Die häufigste Lokalisation des Tumors ist in der Harnblase. Urothelkarzinome entstehen im gesamten Urothel der ableitenden Harnwege mit gleicher

---

<sup>1</sup> Entnommen aus der Broschüre: „Krebs in Deutschland 2005/06. Häufigkeiten und Trends“, die online auf der Seite [www.rki.de](http://www.rki.de) erhältlich ist und die Daten des Krebsregisters enthält (ISBN 978-3-89606-207-9).

Wahrscheinlichkeit. Da die Blase 93% der Urothelfläche einnimmt, treten auch hier die Karzinome am häufigsten auf.

In diesem Zusammenhang ist beim Urothelkarzinom auch von der „urothelialen Systemkrankheit“ die Rede (Riede et al 2004).

Für diese Multifokalität gibt es zwei Hypothesen:

1. Der sog. *Feldeffekt*, wonach tumorinduzierende Noxen (wie Nikotin oder chronische Entzündung) das gesamte Urothel beeinträchtigen können (da sie durch den Urin auch mit allen Zellen im Harntrakt Kontakt haben).
2. Die sog. *klonale Ausbreitung*: hierbei wird eine spezifische Stelle im Urothel neoplastisch verändert. Die mutierten Zellen gelangen durch den Urin oder aber auch durch intra-urotheliale Migration an andere Stellen im Urothelverband und lagern sich dort ab. V.a. diese Theorie scheint eher zutreffend, da auch bei multifokalen Tumoren identische p53 Mutationen gefunden wurden. (Riede et al, 2004; Stöhr et al, 2005, Hafner et al, 2002; Smith et al, 2003)

### 2.3. Exogene Risikofaktoren

Die Ätiologie des Urothelkarzinoms ist – wie bei vielen anderen Tumoren auch – ein multifaktorieller Prozess. Zahlreiche Noxen konnten bisher in eindeutigen kausalen Zusammenhang mit der Entstehung gebracht und somit als Risikofaktoren benannt werden:

#### 2.3.1. Rauchen

Rauchen gilt als einer der am besten dokumentierten Risikofaktoren für das Harnblasenkarzinom. Manche Autoren meinen, dass 50-65% der männlichen und 20-30% der weiblichen Blasenkarzinome durch Tabakrauch verursacht sind (Stenzl et al, 2008); andere Studien gehen davon aus, dass etwa 20-40% der Urothelkarzinome durch Rauchen verursacht sind (Otto et Rübben, 2004). Dies macht auf eindrucksvolle Art den Wert der Prävention auch in Bezug auf das Harnblasenkarzinom deutlich. Als krebserregende Stoffe im Tabak gelten vor allem 2-Naphthylamin und polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe. Letztere gelten heute als *der* wichtigste Risikofaktor für die Entstehung eines Harnblasenkarzinoms (Rubin et al, 2008). So ist die Inzidenz von Blasentumoren auch direkt korreliert mit der *Dauer* der Tabakraucheinwirkung (Stenzl et al, 2008). Die European Association of Urology

(EAU) folgert hieraus, dass die Vermeidung von Aktiv- und Passivrauchen die wichtigste Prävention im Bezug auf das Urothelkarzinom ist (Stenzl et al, 2010).

### 2.3.2. Exposition von bestimmten Chemikalien

Dies gilt als der zweitbedeutendste Risikofaktor für die Entstehung von Harnblasentumoren. So werden 20-25% der Karzinome dieser Gruppe zugerechnet. Folgende Stoffe gelten als karzinogen: 2-Naphthylamin, Benzidin, 4-Aminobiphenyl, Dichlorbenzidin, Orthodianisidin, Auramin, Magenta, polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe, Phenacetin, Chlornaphazin (Stenzl et al, 2008; Otto et Rübben, 2004).

<b>Folgende Berufszweige zeigen ein gehäuftes Auftreten von Blasenkarzinomen</b> (nach Otto et Rübben, 2004)
Kunststoffindustrie
Strahlenindustrie
Friseure
Druck-, Textil- und Aluminiumindustrie
Kammerjäger
Gummiverarbeitende Industrie
Farbindustrie

**Tab A.1.** Berufszweige, die mit dem Auftreten von Urothelkarzinomen assoziiert sind

Dies ist besonders für behandelnde Ärzte zu beachten, vor allem wenn sich bei Patienten aus diesen Gruppen Frühsymptome zeigen, wie z.B. Hämaturie.

### 2.3.3. Nahrungsmittel

Künstliche Stoffe wie Saccharin und Cylamat, ebenso wie der Konsum von Kaffee, führen zu *keinem* erhöhten Risiko für Harnblasentumore.

Für chloriertes Leitungswasser gilt: maßgeblich für die Karzinogenität sind chemische Begleitkomponenten wie Arsen. Schätzungen in den USA, Spanien, Italien und Deutschland gehen von immerhin 15% Harnblasenkarzinomen, induziert durch Trinkwasser, aus (Otto et Rübben, 2004). Jedoch gilt gerade der Zusammenhang zwischen Blasentumoren und der Ernährung als sehr unsicher und es finden sich

durchaus widersprüchliche Aussagen. Die EAU (Stenzl et al, 2008) zitiert eine große Meta-Studie zu diesem Thema (Steinmaus et al, 2000), wonach bisher *lediglich* als gesichert gelten kann, dass der Verzehr von Gemüse und Früchten und fettarme Ernährung das Tumorrisiko senkt.

#### 2.3.4. Chronische Entzündungen der Harnwege

Eine wesentliche Rolle in der Ätiologie scheint hier den Nitrosaminen zuzukommen, die bei manchen (möglicherweise sogar allen) Infekten entstehen können. Chronische Harnwegsinfekte führen zu einem erhöhten Harnblasenkarzinomrisiko, ebenso wie die Entzündung durch den permanenten Reiz eines Dauerkatheters (Otto et Rübber, 2004). Ein wichtiger weiterer karzinogener Faktor – wenn auch nicht in den europäischen Breiten – ist die Schistosomiasis (hervorgerufen durch *Schistosoma haematobium*), die zweithäufigste parasitäre Erkrankung weltweit (nach der Malaria): sie führt zu einer Erhöhung des Blasenkarzinomrisikos auf den 5-fachen Wert. Zuletzt sei noch die Nebenwirkung von Cyclophosphamid (welches z.B. in der Therapie von Autoimmunkrankheiten wie z.B. M. Wegener seine Anwendung findet) erwähnt: neben einer hämorrhagischen Zystitis kann es auch, davon unabhängig, zu einer Erhöhung der Erkrankungswahrscheinlichkeit für Urothelkarzinome kommen, dies jedoch vermutlich dosisabhängig (Travis et al, 1995).

#### 2.3.5. Bestrahlung

Auch die Bestrahlung macht eine Nachsorge im kleinen Becken notwendig, da sie Urothelkarzinome induzieren kann: Das relative Risiko für die Entstehung eines Zweitmalignoms wird mit 1,58 angegeben (Otto et Rübber, 2004).

#### 2.3.6. Geschlecht

Hier scheint es vor allem in der Post-Menopause ein erhöhtes Risiko für das Auftreten von Urothelkarzinomen zu geben. Möglicherweise liegt dies an der veränderten hormonellen Situation des Organismus (Stenzl et al, 2008). So zeigt sich auch eine frühere Menopause ( $\leq 45$  Jahre; im Vergleich zur späten Menopause) mit einem erhöhten Erkrankungsrisiko für Harnblasenkarzinome vergesellschaftet (McGrath et al, 2006).

## 2.4. Histopathologie

(nach WHO 2004, entnommen aus Seitz et al, 2005)

### 2.4.1. Urothel

Das die Harnwege auskleidende Epithel wird als Urothel bezeichnet; dieses kann sich besonders gut an das schwankende Volumen anpassen: hierbei geht es von einer vielschichtigen in eine weniger geschichtete Form über (jedoch mindestens drei Schichten, sog. Übergangsepithel, früher auch: Transitionalepithel). Auf die Basalzellschicht folgen einer oder mehrere intermediäre Zellschichten, um an der luminalen Seite schließlich von den sog. *umbrella cells* (Deckzellen) abgeschlossen zu werden.

### 2.4.2. Hyperplasie

Hier wurde die früher gebräuchliche Definition mit „mehr als sieben Zellreihen dick“ verlassen. Stattdessen liegt nun eine Hyperplasie vor, wenn das Urothel merklich verdickt imponiert. Jedoch sieht man bei der Hyperplasie noch keine Atypien.

### 2.4.3. Dysplasie

Hierbei handelt es sich um eine Präneoplasie. Es imponieren Alterationen der Zellstruktur und Veränderungen des Zellkerns (Hyperchromasie, prominenter Nukleolus). Die *umbrella cells* bleiben dabei jedoch meist unverändert. Die Dysplasie gilt als Vorstufe des CIS.

### 2.4.4. Carcinoma in situ (CIS)

Ein CIS gilt als obligate Vorstufe des Urothelkarzinoms. Histopathologisch finden sich eine aufgehobene Schichtung des Epithels und daneben unregelmäßig begrenzte, hyperchromatische Kerne, große, prominente Nukleoli und häufige Mitosen.

### 2.4.5. Papillom

Dies ist ein papillär aufgebauter Tumor, welcher ein Urothel mit normaler Breite und Zytologie zeigt, gelegentlich sieht man hier Rezidive.

### 2.4.6. Nicht invasives papilläres urotheliales Karzinom

- Papilläre urotheliale Neoplasie mit niedriger maligner Potenz (PUNLMP):

Das Urothel beim PUNLMP ist deutlich verdickt, jedoch ist die Zellanordnung unverändert. Teilweise imponieren die Zellkerne gleichmäßig vergrößert (nicht obligat). Der Nukleolus ist jedoch unauffällig oder nicht nachweisbar. Mitosen sind selten und basal gelegen. Die *umbrella cells* bleiben vorhanden. Dieser Tumortyp hat ein relativ hohes Rezidivrisiko (35%) und kann sehr selten zum Karzinom fortschreiten (in 4%). Die Mortalität ist jedoch sehr niedrig (>1%). (Zum PUNLMP siehe auch Abschnitt 4.2.5.)

- Nicht-invasives papilläres urotheliales Low-grade Karzinom (LG-PUC):

Das LG-PUC weist eine atypische Zellstruktur auf: Form und Größe des Zellkerns sind verändert, die Kerne sind unterschiedlich groß, der Nukleolus ist unauffällig. Mitosen zeigen sich gelegentlich, allerdings in jeder Schicht. Es zeigen sich sehr hohe Rezidivraten (50-70%), ein Progress wird in etwa 10% der Fälle gesehen. Sie entsprechen in der WHO Klassifikation von 1973 zum Großteil den pTaG1, aber zu einem kleinen Teil auch den pTaG2 Tumoren.

- Nicht-invasives papilläres urotheliales High-grade Karzinom (HG-PUC):

Diese zeigen eine häufig aufgehobene Zellschichtung mit deutlichen Veränderungen der Histoarchitektur. Zellkerne sind unterschiedlich groß, es zeigt sich ein mäßiger bis starker Pleomorphismus. Multiple prominente Nukleoli können sich zeigen. Mitosen sind häufig und in jeder Schicht vorhanden. Die *umbrella cells* können fehlen. Die Rezidivrate beträgt 70-75%. Nach WHO 1973 entsprechen sie den pTaG2 und pTaG3 Tumoren.

	<b>Mortalität in %</b>	<b>Rezidive in %</b>	<b>Progression in %</b>
<b>PUNLMP</b>	0,5	35	4
<b>LG-PUC</b>	5	70	10
<b>HG-PUC</b>	20	75	15-40

**Tab A.2** Mortalitäts-, Progressions- und Rezidivraten bei den nicht-invasiven papillären Urothelkarzinomen, übernommen aus Seitz et al, 2005

#### 2.4.7. Invasives Urothelkarzinom

Hier gilt (histopathologisch):

- Liegt eine Invasion der Lamina propria vor, so spricht man vom T1: Urotheliale Zellen sind in Lamina propria nachweisbar.

- Kommt es zu Invasion der Muscularis propria (und somit des M. detrusor vesicae): Karzinomzellen sind in der glatten Muskulatur dieser Schichten nachweisbar.<sup>2</sup>

## 2.5. Staging und Differenzierung

### **TNM Klassifikation nach der Union International Contre le Cancer (UICC) von 2002 (nach den Empfehlungen der EAU; Stenzl et al, 2008):**

#### **T: Primärtumor**

- *TX: Der Tumor kann nicht beurteilt werden.*
- *T0: Kein Hinweis auf einen Tumor*
- *Ta: Nicht-invasives, papilläres Karzinom*
- *Tis (CIS): Carcinoma in situ*
- *T1: Tumor infiltriert das subepitheliale Gewebe*
- *T2: Tumor infiltriert Muskelgewebe*
  - T2a: Tumor infiltriert oberflächliche Muskelschicht (innere Hälfte)*
  - T2b: Tumor infiltriert tiefe Muskelschicht (äußere Hälfte)*
- *T3: Tumor infiltriert das perivesikuläre Gewebe*
  - T3a: mikroskopisch*
  - T3b: makroskopisch*
- *T4: Tumor infiltriert eines der folgenden: Prostata, Uterus, Vagina (T4a), Beckenwand, Bauchwand (T4b)*

#### **N: Regionale Lymphknoten**

- *NX: regionale Lymphknoten können nicht beurteilt werden*
- *N0: keine Lymphknotenmetastasen*
- *N1: Metastase in einem einzelnen Lymphknoten  $\leq 2\text{cm}$*
- *N2: Metastasen in einem einzelnen Lymphknoten  $> 2\text{cm}$  aber  $< 5\text{cm}$  oder multiple Lymphknotenmetastasen  $\leq 5\text{cm}$*
- *N3: Lymphknotenmetastase  $> 5\text{cm}$*

#### **M: Fernmetastasen**

- *MX: Fernmetastasen können nicht beurteilt werden*
- *M0: keine Fernmetastasen*
- *M1: Fernmetastasen vorhanden*

Für das Grading gelten momentan (2011) zwei wesentliche Klassifizierungen, die noch nebeneinander bestehen und beide noch zur Anwendung kommen (sollten).

---

<sup>2</sup> Histologischer Aufbau gesundes Gewebe (stichpunktartig): Mukosa – Basalmembran – Lamina propria (mit Muscularis mucosa) – Muscularis propria (entspricht M. detrusor vesicae)

<b>WHO Grading von 1973</b> <b>(verwendet in dieser Arbeit)</b>	
G1	Gut differenziert
G2	mäßig differenziert
G3	schlecht differenziert

**Tab A.3.** WHO Grading 1973 – in dieser Arbeit verwendet

Die gewonnenen Materialien dieser Arbeit wurden vielfach schon vor 2004 akquiriert; deshalb ist oben stehende Klassifizierung von 1973 auch in die Auswertung der Ergebnisse eingeflossen. Zudem findet sie auch in den gängigen Publikationen zu SNP309 MDM2 noch Verwendung.

Die neue Klassifikation des Gradings – welches in dieser Arbeit *nicht* berücksichtigt wird – soll aber gerade aufgrund seiner Aktualität trotzdem erwähnt werden:

<b>WHO Grading 2004</b> <b>(<u>nicht</u> in dieser Arbeit verwendet)</b>
Papillary urothelial neoplasm of low malignant potential (PUNLMP)
Low-grade urothelial carcinoma
High-grade urothelial carcinoma

**Tab A.4.** WHO Grading 2004 – nicht in dieser Arbeit verwendet

So nimmt das PUNLMP eine gewisse Sonderstellung ein. Es gilt als Läsion, die keine Anzeichen von Malignität in der Zytologie zeigt; dennoch sind die normalen Urothelzellen in papillärer Formation zu sehen. Auch hier zeigt sich ein gewisses Rezidivrisiko. Das PUNLMP gilt als nicht völlig benigne. Da sich bisher auch die neue Klassifikation des Gradings (von 2004) nicht durchsetzen konnte, wird von der EAU empfohlen, vorläufig beide Klassifizierungen gleichzeitig zu verwenden und die Tumoren danach einzustufen (nach Babjuk et al, 2008). In der „alten“ WHO Klassifikation von 1973 entspricht das PUNLMP einem pTaG1 Tumor (Seitz et al, 2005).

Zudem kommt Gönül et al in seiner 2008 publizierten Arbeit zu dem Ergebnis, dass die 1973 WHO Einteilung noch immer ein valides System zur Einteilung von Urothelkarzinomen ist. Die Gruppe der PUNLMP-Tumoren sollte jedoch als zusätzliche vierte Gruppe geführt werden.

## *2.6. Diagnose und Therapie*

*(nach den Leitlinien der European Association of Urology, EAU, entnommen aus Stenzl et al 2010 und Babjuk et al, 2010)*

Dieser Abschnitt soll lediglich einen sehr kurzen, orientierenden Überblick über Diagnose und Therapie des Urothelkarzinoms geben.

Auch hier muss zwischen den nicht-muskelinvasiven und den muskelinvasiven Tumoren unterschieden werden.

### 2.6.1. Symptome

Typisch ist die schmerzlose Hämaturie (Warnsymptom!). Diese ist immer ernst zu nehmen. Bei den muskel-invasiven Tumoren können zudem weitere Symptome wie Dysurie, erhöhte Miktionsfrequenz und auch Schmerzen im Beckenbereich vorkommen, jedoch nicht obligatorisch.

### 2.6.2. Diagnose

Die Zystoskopie ist die Methode der Wahl zur Diagnose des Harnblasentumoren. Bei nicht-invasiven Tumoren ist hier auch eine Entfernung der verdächtigen Läsionen im Rahmen einer Transurethralen Resektion (TUR) möglich.

Nach der EAU (Babjuk et al, 2010) gilt für nicht-invasive Tumoren <1cm, dass diese in einer TUR entfernt werden können. Sind die Tumoren größer als 1cm ist eine fraktionierte Entfernung der Tumoren möglich. Zudem sollte eine Urinanalyse und eine Urinzytologie durchgeführt werden, sowie eine Ultraschalluntersuchung des Beckens (insb. Nieren, Blasenfüllung).

Bei invasiven Tumoren (EAU, Stenzl et al, 2010) gestaltet sich die Diagnostik dementsprechend umfangreicher. So sollte sich der initialen Zystoskopie mit Biopsieentnahme und ein Staging mit CT Thorax und Abdomen / Becken (Metastasierung) und ggf. auch MRT Becken (OP-Planung) anschließen. Auch hier muss eine Urinanalyse mit Zytologie, sowie eine Sonographie durchgeführt werden.

### 2.6.3. Therapie

Sie besteht aus TUR-Blase und gegebenenfalls radikaler Zystektomie, Strahlentherapie und ggf. adjuvanter Chemotherapie.

1. Beim nicht-invasivem Urothelkarzinom wird zunächst die TUR-Blase durchgeführt. Zur weiteren Therapieplanung ist die Einschätzung des Rezidivs mittels eines Scoringsystems möglich (etabliert durch die European Organisation for Research and Treatment of Cancer, EORTC, vgl. in Babjuk et al, 2010, EAU). Mittels dieses Systems ist eine Einteilung in low risk, intermediate risk und high risk möglich. Abhängig von dieser Einteilung kann dann auch eine adjuvante Therapie erwogen werden.

	Wahrscheinlichkeit eines Rezidivs nach 5 Jahren	Empfohlene adjuvante Therapie nach EAU
Low risk	31%	Einmalige, sofortige, intravesikale Applikation von Chemotherapie (Epirubicin, Doxorubicin)
Intermediate risk	46-62%	Zudem: weitere intravesikale Chemotherapieapplikationen oder 1 Jahr Therapie mit BCG
High risk	78%	

Tab A.5: nach Babjuk et al, 2010, EAU. Einschätzung des Rezidivs bei nicht-invasiven Harnblasentumoren nach dem Scoringsystem der EORTC und adjuvante Therapieempfehlung, BCG=Bacillus Calmette-Guerin.

Erwogen werden muss auch bei nicht-invasiven Tumoren die Zystektomie, wenn es sich um G3 Tumoren handelt oder multiple Rezidive vorliegen.

2. Carcinoma in situ (CIS, Tis): Hier wird initial mit BCG intravesikal therapiert. Gelingt es nicht, innerhalb von drei Monaten mit intravesikaler Applikation von dem Immuntherapeutikum BCG eine vollständige Remission zu erlangen, so steht die Indikation zur Zystektomie (Goebell et al, 2006).

3. Muskelinvasive Urothelkarzinome (N0, M0): der Goldstandard der Therapie ist in diesem Fall die radikale Zystektomie (Goebell et al, 2006) – weder Chemotherapie nach Radiotherapie alleine scheinen ähnlich effektiv zu sein (Stenzl et al, 2010). Es erfolgt die Entfernung der Harnblase, der distalen Harnleitern und ggf. der Harnröhre. Beim Mann ist die Entfernung der Prostata und Samenblasen nur bei Tumorbefall obligat. Auch bei der Frau werden gesunder Uterus und Ovarien nur in Rücksprache mit der Patientin entfernt. Bei der prämenopausalen Frau sollte ein Eierstock belassen werden (Goebell et al, 2006).

Für metastasierte Tumoren wird u.a. eine palliative Chemotherapie empfohlen, z.B. nach dem Schema MVAC (Methotrexat, Vinblastin, Adriamycin, Cisplatin; Stenzl et al, 2010).

#### 2.6.4. Nachsorge

##### 1. Nicht-invasive Tumoren:

	Nachsorgeempfehlungen
Low risk	Zystoskopie nach drei Monaten → wenn negativ erneute Zystoskopie nach weiteren neun Monaten; anschließend jährliche Zystoskopien für insgesamt fünf Jahre
High risk	Zystoskopie und Urinzytologie alle drei Monate für insg. zwei Jahre, im dritten Jahr Zystoskopie alle vier Monate, bis zum fünften Jahr halbjährliche Zystoskopien

**Tab A.6.** (nach Babjuk et al, 2010): Empfehlungen der EAU zur Nachsorge bei nicht-invasiven Tumoren

2. Invasive Tumoren: Empfehlungen hierzu sind schwierig, da sie sich sehr nach der Ausprägung der Tumorerkrankung richten. In bis zu 50% der Patienten mit Zystektomie zeigt sich ein Rezidiv des Tumors. Häufig betroffen sind Lunge, Leber und Knochen (Stenzl et al, 2010).

<i>Krankheitsspezifisches Überleben nach radikaler Zystektomie bei muskelinvasivem Urothelkarzinom der Harnblase</i>		
Tumorstadium	5-Jahres-Überlebensrate in %	10-Jahresüberlebensrate in %
<pT3a	78,9	72,9
>pT3b	36,8	33,3
NO	66,7	61,7
N+	31,2	27,7

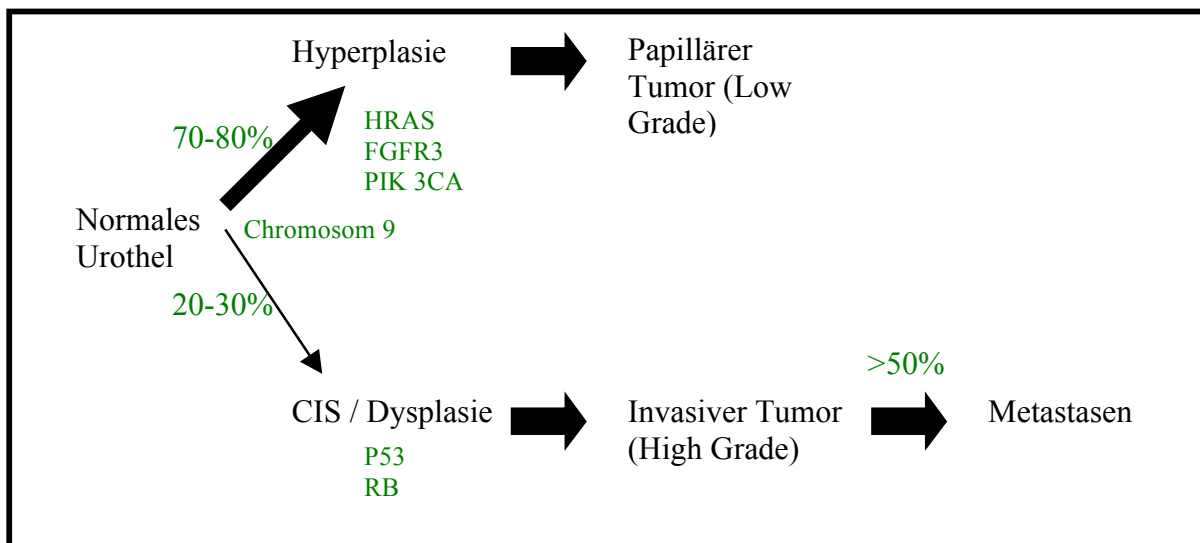
**Tab A.7.** Überleben nach Therapie abhängig vom Tumorstadium (nahezu unverändert entnommen aus Goebell et al, 2006)

### 3. Molekularpathologie des Urothelkarzinoms

Die Karzinogenese des Urothelkarzinoms des Menschen ist durch exogene Faktoren maßgeblich beeinflusst (siehe oben). Dennoch gibt es auch Hinweise auf zahlreiche endogene Faktoren, die für die Entstehung von Bedeutung sind.

Aktuell gibt es einen Konsensus über die Molekularpathologie des Urothelkarzinoms, wonach sich dieses in zwei unterschiedlichen molekularen Entwicklungswegen ausbildet:

Auf der einen Seite steht der nicht-invasive, niedrig-maligne papilläre Tumor (aus der Urothelhyperplasie stammend), auf der anderen Seite der hoch-maligne, invasive Tumor (über frühe p53 Mutationen, aus dem CIS stammend; Hofstädter, 2008). Beide Formen unterscheiden sich maßgeblich in ihrer Prognose und ihrem Verlauf (Wu, 2005).



**B A.1.** Genetische Defekte, die für die jeweiligen Entwicklungswege des Urothelkarzinoms prädisponieren (Grafik nach Wu, 2005): Inzwischen geht man davon aus, dass es für die Entwicklung des Urothelkarzinoms zwei verschiedene *pathways* gibt: der eine führt über die Hyperplasie zu den papillär wachsenden, niedrig malignen Tumoren, der andere über das CIS zu den hochmalignen, invasiven Tumoren. Übergänge von der nicht-invasiven Form zur invasiven sind möglich, aber eher selten (ca. 15%).

Dabei ist bei den nicht-invasiven Tumoren v.a. folgende Veränderungen zu finden: Deletionen in Chromosom 9 und Punktmutationen in FGFR3 (*fibroblast growth factor receptor 3*). Jedoch finden sich auch zahlreichen andere Veränderungen in Ta-Blasentumoren, z.B. Deletionen in den Chromosomen 2, 8, 10, 11, 13, 17 und 18 sowie aktivierende Mutationen im Onkogen HRAS. Etwa 70% der nicht-invasiven

Tumoren rezidivieren, jedoch nur etwa 15% werden zu invasiv-wachsenden Tumoren. So scheinen insbesondere Deletionen in den kurzen Armen von Chromosom 8 und 11 und Deletionen in den langen Armen der Chromosomen 13 und 14 dazu zu prädisponieren (Wu 2005).

Bei den muskel-invasiven Tumoren hingegen findet man zahlreiche genomische Veränderungen – gut untersucht sind hier p53 und RB. So machen auch Mutationen in p53 den großen Unterschied zwischen invasiven und nicht-invasiven Urothelkarzinomen aus. Auch hier gibt es zahlreiche weitere untersuchte genomische Veränderungen, wie z.B. Deletionen in verschiedenen Chromosomen und aktivierende Mutationen in Onkogenen. (Knowles, 2008).

Hierauf soll im Weiteren näher eingegangen werden.

### 3.1. RTK-Ras-pathway und FGFR3

Der Rezeptor Tyrosin Kinase (RTK) *pathway* hat eine zentrale Rolle bei der Proliferation von epithelialen Zellen inne: bestimmte Schritte aus diesem Regelkreis scheinen beim Urothelkarzinom aktiviert zu sein (Wu, 2005). So ist z.B. HRAS in etwa 30-40% der Urothelkarzinome mutiert (meist in Codon 12, 13, 61) und begünstigt nach aktueller Datenlage eher die Entstehung von papillären, niedrig-malignen Tumoren. Weiter entscheidend in der Tumorgenese scheint das FGFR3 Gen zu sein. Dieses ist entscheidend für die embryonale Entwicklung, Zellwachstum, Differenzierung und Proliferation. 70% der nicht-invasiven Urothelkarzinome besitzen Mutationen in FGFR3, jedoch nur etwa 10-20% der invasiv-wachsenden Tumoren (Rieger-Christ et al, 2003; van Rhijn et al, 2004). Dabei finden sich Mutationen meist in den exons 7, 10 und 15. Die häufigsten Mutationen sind S375C (mit etwa 20%) und S249C (mit circa 67%; Knowles, 2008).

### 3.2. Chromosomale Veränderungen

Mehr als die Hälfte aller Urothelkarzinome (sowohl invasiv als auch nicht-invasiv) zeigen Veränderungen im Chromosom 9 (Knowles 2008). Dabei kommen sowohl Deletionen auf dem kurzen Arm (9p) als auch auf dem langen Arm (9q) vor. Zudem scheinen Deletionen in Chromosom 9 sehr frühere Veränderungen in der Entstehung von urothelialen Tumoren zu sein (Knowles 2008; Wu, 2005).

Bei 9p finden sich die Deletionen hauptsächlich auf dem Locus CDKN2A, welcher für p14 und p16 codiert – beides negative Regulatoren von RB und p53 (Knowles 2008).

Hartmann et al (2002) konnten zeigen, dass sich Chromosom 9 Deletionen sowohl in CIS als auch in papillären Tumoren fanden – und somit für beide Varianten der Urothelkarzinomentstehung von Bedeutung zu sein scheinen (Wu, 2005). Jedoch gibt es in vielen weiteren Studien Hinweise, dass Chromosom 9q Deletionen sowohl in invasiven als auch in nicht-invasiven Tumoren gefunden wird, häufiger jedoch in der Gruppe der papillären Tumoren (Lindgren et al, 2006; Keen et al, 1994), wohingegen sich Deletionen in 9p häufiger bei invasiven Tumoren finden (Chapman et al, 2005).

In einer Studie von Stöhr et al, 2004, fanden sich in 25 von 99 untersuchten Blasen Tumoren (etwa 25%) Deletionen im Chromosom 8p. Ferner zeigte sich auch eine signifikante Korrelation des LOH in 8p mit der Invasivität des Tumors.

So konnte Stöhr et al 2005 zudem zeigen, dass sich in histologisch normalem (!) Urothel von Karzinompatienten ein LOH in den Chromosomen 8p und 9 (in 15 von 160 Proben, 9,4%), nicht jedoch in 17p zeigten.

Zusammenfassend lässt sich bei der divergenten Studienlage festhalten, dass chromosomale Deletionen sowohl beim invasiven, als auch beim nicht-invasiven Karzinom vorkommen und auch einen frühen Schritt der Karzinogenese darstellen.

Zudem sind zahlreiche andere Deletionen in Chromosomen beim Urothelkarzinom beschrieben (sowohl beim invasiv als auch beim nicht-invasiv wachsenden Tumor; Knowles 2008, siehe auch oben).

### 3.3 p53 pathway

Mutationen von p53 betreffen typischerweise erst das eine und erst anschließend das zweite Allel. Dadurch kommt es zur Herunterregulation von p21, welches ein weiterer Schritt der p53 Kaskade ist.

P53 Mutationen sind sehr häufig bei invasiv-wachsenden Urothelkarzinomen (>50%, Spruck et al, 1994) und auch beim urothelialen CIS, jedoch selten bei den nicht-invasiv wachsenden Tumoren. Patienten mit p53 Mutationen haben ein höheres Risiko für Progress und eine schlechtere Prognose. Jedoch ist unsicher, ob die Entstehung von Urothelkarzinomen auch von p53 Mutationen ausgeht. (Wu, 2005).

Generell gilt, dass Mutationen von p53 und die daraus resultierende Überexpression von p53 (in der Immunhistochemie) bei nicht-invasiven Blasentumoren seltener gefunden wird. Liegt jedoch eine Überexpression vor, so ist diese – auch bei nicht-invasiven Tumoren – mit einem verschlechterten Überleben und eine höheren Rezidivrate der Tumoren assoziiert. Die Überexpression von p53 ist somit vergesellschaftet mit einer schlechteren Prognose (Smith et al, 2003).

Jedoch wurde Überexpression von p53 hauptsächlich bei muskel-invasiven Tumoren gefunden – dies wiederum ist auch hier mit einer schlechteren Prognose assoziiert (z.B. Esrig et al, 1994)

P53 selbst und seine Verflechtung mit MDM2 wird gesondert beschrieben (s.u.).

### 3.4. RB pathway

Das Retinoblastom (RB) Gen hat eine entscheidende Rolle in Differenzierung, Seneszenz und Apoptose der Zelle. Dieses Gen ist in zahlreichen epithelialen Tumoren verändert (Wu, 2005). Es liegt auf Chromosom 13. So zeigen Patienten mit Defekten in RB1, die ein Retinoblastom entwickelt haben, ein erhöhtes Risiko, auch andere Tumoren zu entwickeln, wie zum Beispiel Urothelkarzinome (Fletcher et al, 2004). So sind auch dementsprechend Deletionen des Gens auch in Blasenkarzinomen nachweisbar, hier vor allem bei den invasiv-wachsenden Tumoren (Cairns et al, 1991). RB hat wahrscheinlich seine Funktion eingebüßt und kann E2F nicht inhibieren: es entsteht eine ungehemmte Zellproliferation (Wu, 2005; Mitra et al, 2006). Deletionen in RB scheinen zudem auch eine Rolle für die Prognose des Tumors zu spielen. So konnte Cordan-Cardo et al zeigen (1992), dass sich eine veränderte Expression des RB Proteins v.a. bei invasiv-wachsenden Tumoren fand und zudem jene Patienten auch eine schlechtere 5-Jahres Überlebensrate zeigten.

### 3.5. Polymorphismen

Eine weitere wichtige Rolle bei der Karzinomentstehung scheinen prädisponierende Polymorphismen zu spielen: So können Polymorphismen in Reperaturgenen der DNA eine abgeschwächte oder fehlende Funktion bestimmter Reperaturproteine bedingen und somit – so die Hypothese – die Karzinogenese und genetische Instabilität

ermöglichen. Gerade dies macht die gezielte Untersuchung von einzelnen Polymorphismen in Bezug auf bestimmte Karzinome so wichtig (Goode et al, 2002). Ein wichtiger Zusammenhang, der obige Hypothese bestätigt, konnte zwischen der *N*-Acetyltransferase-2 (NAT2) und dem Harnblasenkarzinom hergestellt werden. So führt das Fehlen von zwei funktionierenden NAT2-Allelen zu einer verminderten Detoxifikationsfähigkeit (durch Acetylierung) der Leber. Dadurch sind insbesondere aromatische Amine betroffen, ihrerseits wichtige Karzinogene im Tabak. So ist die gängige Hypothese, dass die durch diese eingeschränkte Acetylierung häufiger Karzinome entstehen. Dies konnte dann auch durch Marcus et al, 2000, und durch Vineis et al, 2001, gezeigt werden. Jedoch haben jene Patienten mit eingeschränkter Acetylierung ein erhöhtes Harnblasenkarzinomrisiko, die *gleichzeitig* auch Raucher sind – somit ist die NAT2 nicht selbst ein Risikofaktor für das Harnblasenkarzinom, wohl aber ein wichtiger Modulator (Vineis et al, 2001). Zudem fand sich bei Vineis et al, 2001, dass der Effekt von NAT2 in Zusammenhang mit Tabakkonsum nur auf die aktiven Raucher bezieht.

Eine weitere (wenn auch eher geringe) Bedeutung für die Entstehung des Urothelkarzinoms hat die Glutathion-S-Transferase M1 (GSTM1), die für die Eliminierung der polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffe (wie sie im Tabak enthalten sind) benötigt wird. So findet sich ein Polymorphismus (in diesem Fall in Form einer Deletion) des GSTM1-Gens bei 51% der Europäer, was zu einer verminderten Aktivität des Enzyms führt. Liegt eine homozygote Deletion vor, so findet sich auch ein erhöhtes Risiko für das Auftreten von Urothelkarzinomen (Metastudie von Engel et al, 2002). Weiterhin wird davon ausgegangen, dass Tabakkonsum zu DNA-Schäden führt, die durch Reperaturgene (und Reperaturproteine) korrigiert werden können. Eines dieser Gene ist XRCC1. Dort findet sich ein Arg399Gln Polymorphismus, welcher in homozygoter Ausprägung für eine untersuchten Gruppe aus New Hampshire ein erniedrigtes Risiko zeigte, an einem Harnblasenkarzinom zu erkranken (Kelsey et al, 2004).

### 3.6. Urothelkarzinom in jungen Patienten

Nur sehr wenige Studien finden sich zu Urothelkarzinomen bei jungen Patienten. Während typischerweise der Harnblasentumor ein Karzinom des eher älteren Menschen ist, finden sich diese Karzinome auch selten bei jungen Patienten.

So wurde auch in dieser Arbeit eine Gruppe von Patienten untersucht, die ein Karzinom vor dem 45. Lebensjahr entwickelt haben. Die Hypothese ist, dass insbesondere bei den jungen Patienten eine ausgeprägte genetische Disposition besteht, ein Karzinom zu entwickeln und die exogenen Faktoren zurückstehen. Dies ist aber bisher noch nicht vollständig geklärt.

Hinweise auf die Richtigkeit dieser Hypothese gibt eine Untersuchung von Linn et al, 1998, die eine Überexpression von p53-Gen-Produkt in Urothelkarzinomen insbesondere bei den Patienten fanden, die jünger als 30 Jahre waren. In einer anderen Arbeit von Christensen et al, 1998, wurde eine ausgeprägte Mikrosatelliteninstabilität bei jungen Harnblasenkarzinompatienten gefunden, insbesondere bei papillären Tumoren. Dem widerspricht eine Studie von Giedl et al, 2006, wonach insbesondere sehr junge Patienten mit Harnblasenkarzinom (jünger 18 Jahre, sehr selten) bei einer guten Prognose kaum genetische Instabilitäten zeigen. Auch Untersuchungen des in dieser Arbeit beschriebenen Kollektivs (persönliche Kommunikation Dr. Robert Stöhr, Prof. Arndt Hartmann, Institut für Pathologie, Universität Erlangen) zeigte keine erhöhte Rate einer Mikrosatelliteninstabilität.

## **4. Single Nucleotid Polymorphismus (SNP)**

### *4.1. Allgemeines*

SNPs sind Variationen von Basenpaaren im Genom. So nimmt man an, dass jedes Individuum etwa drei Millionen SNPs hat.

Eben diese SNPs sind es, die wahrscheinlich die verschiedenen Anfälligkeiten für bestimmte Erkrankungen zwischen verschiedenen Individuen bedingen. Vergleicht man nun gesunde Kontrollgruppen mit den Erkrankungsfällen (sog „case-control“-Studie) und betrachtet deren SNPs, so müsste es möglich sein, die Prädispositionen für bestimmte Krankheiten auf eben jene SNPs zurückzuführen (zumindest statistisch).

Man geht davon aus, dass die Nebenwirkungen von Medikamenten auf das Vorhandensein von SNPs zurückgeführt werden kann. Nach Aufspüren der

entscheidenden Polymorphismen könnte man auch Medikamente sicherer machen – so die Theorie.

Über 4 Millionen SNPs sind bisher beschrieben, nur drei Prozent von diesen liegen jedoch in Genen – wenige haben bis dato tatsächliche Relevanz. (Melton, 2003)

#### 4.2. SNPs und Harnblasenkarzinom

In Bezug auf das Urothelkarzinom der Blase finden sich in der Literatur gerade der letzten Jahre vielfältige Publikationen. So scheinen einzelne SNPs durchaus mit einem erhöhten (teilw. auch erniedrigtem) Risiko assoziiert, an einem Urotheltumor zu erkranken und sind somit ein vielversprechender Ansatz, auch die Erkrankungsrisiko und Prognose einer Tumorerkrankung einzuschätzen.

Die folgende Tabelle stellt einige Zusammenhänge in einem kurzen Überblick stickpunktartig dar:

SNP	Autor, Publikationsdatum	Beschriebener Zusammenhang zum Harnblasenkarzinom
TP63-rs715021	Stern et al, 2009	Assoziation zwischen A Allel und Erkrankungsrisiko in einer Population aus Los Angeles und Shanghai Subgruppe (Weiße): Assoziation nur bei nicht-invasiven Tumoren Assoziation zu <i>high risk</i> Tumoren nur bei Patienten älter 56 Jahre
JWA-76GC -454CA -723TG	Li et al, 2007	JWA-76C und -454A beide verbunden mit erhöhtem Erkrankungsrisiko
XRCC1-rs915927  ERCC1-rs967591 -rs735482 -rs2336219	Ricceri et al, 2010	Signifikant erhöhtes Risiko: XRCC1-rs915927 G Allel  Protektiver Effekt durch ERCC1 SNPs: rs967591 rs735482 und rs2336219
XRCC4- rs6869366 -rs7727691 -rs6869366 -rs2075685 -rs2075686 -rs28360071	Chang et al, 2009	XRCC4: rs6869366 signifikanter Risikofaktor  Alle übrigen: kein Zusammenhang

-rs3734091 -rs28360317		
8q24-rs9642880	Kiemeney et al, 2008	Homozygote TT Genotypen zeigen ein 1,5fach erhöhtes Erkrankungsrisiko
MRE11-rs2155209	Choudhury et al, 2008	fraglich erhöhtes Erkrankungsrisiko
XPC 939	Fontana et al, 2008	Erhöhtes Erkrankungsrisiko
MDM2-1797	Wang et al, 2008	GG Genotyp: erhöhtes Erkrankungsrisiko
H19-rs2839698	Verhaegh et al, 2008	TC Genotyp: vermindertes Erkrankungsrisiko, v.a. für nicht-invasive Tumoren (jedoch nicht bei homozygoten Genotypen)
RGS6-rs2074647	Berman et al, 2004	vermindertes Erkrankungsrisiko

**Tab A.8.:** Zusammenhang zwischen verschiedenen SNPs und dem Urothelkarzinom der Blase (Auszug aus der Literatur)

## 5. p53 – „Wächter des Genoms“

Das Tumorsuppressorgen p53 ist ein Mediator von Zellwachstum, Zellarrest und Apoptose. Treten Mutationen oder andere DNA Schäden auf oder kommt es zu zellulärem „Stress“ (wie z.B. Hypoxämie, ionisierende Strahlen, Zytostatika; im Englischen wird die Summe dieser Ereignisse auch als „genotoxic stress“ bezeichnet), so steigen die p53-Spiegel und verhindern den Eintritt der Zelle in die S-Phase des Zellzyklus. Hierdurch gewinnt die Zelle Zeit für DNA Reparaturmaßnahmen, die eine Entartung der Zelle abwenden können (Bond et al, 2007).

Letztendlich wird die Zelle durch p53 auf zwei mögliche Wege vorbereitet: ist der DNA-Schaden zu reparieren, so bleibt die Zelle bestehen, ist dies nicht der Fall, so wird sie in die Apoptose getrieben (Böcker et al, 2001).

Das p53-Gen, das für (das) P53 (Protein)<sup>3</sup> kodiert, befindet sich auf dem Chromosom 17p13 (Böcker et al, 2001). Es besteht aus 393 Aminosäuren und besitzt vier funktionelle Domänen. Den ersten 42 Aminosäuren kommt dabei die Rolle der Transkriptionsaktivatoren zu: sie regulieren somit die Genexpression (Levine, 1997).

<sup>3</sup> Im Folgenden verweist der Großbuchstabe „P“ auf das Protein P53, der kleine Buchstabe „p“ auf das Gen p53.

P53 bindet – unter zellulärem Stress – als Tetramer an die DNA und ist als wichtiger Mediator in die Transkription involviert. So werden zelluläre Mechanismen, wie z.B. Reparatur von DNA, Zell-Zyklus-Arrest, Seneszenz und Apoptose induziert und ermöglichen so der Zelle / dem Organismus auf schädliche Reize zu reagieren. Es wird davon ausgegangen, dass Mutationen in p53 die Tumorgenese beschleunigen: Bei über 50% aller Tumoren des Menschen finden sich Mutationen in p53 (Vasquez et al, 2008; Levine, 1997).

Die Halbwertszeit von P53 ist mit 20 min relativ kurz: bei zellulärem Stress wird die Halbwertszeit jedoch durch Phosphorylierung deutlich erhöht: die intrazellulären Spiegel steigen (Levine, 1997).

Besteht ein Schaden der DNA wird das P53-Protein hochreguliert um der Zelle Zeit zu geben, auf die Störung zu reagieren (siehe oben). Dabei wurden mehrere Gene identifiziert, die in ihrem Promotorbereich Bindungsstellen für p53 besitzen – also auf hohe P53-Spiegel reagieren können: hierzu gehört z.B. das Gen WAF1 (*wild type activating fragment 1*), welches durch Hemmung verschiedener Kinasen den Zyklusablauf der Zelle behindert und in der G1-Phase arretieren lässt. Doch auch bei der Reparatur der beschädigten DNA (die ja wiederum Auslöser der erhöhten P53-Spiegel war) ist p53 beteiligt: über das Gen GADD45 (*growth arrest DNA damage*). Ist schließlich der Schaden an der DNA beseitigt, kommt das Gen MDM2 ins Spiel: dessen Genprodukt inaktiviert p53 – die Zelle kann nun wieder in die S-Phase eintreten.

Wird der Schaden jedoch nicht behoben, so induziert P53 über das Gen BAX die Apoptose (Böcker et al, 2001).

## 6. Bedeutung von MDM2

### 6.1. Negative Regulierung von p53

MDM2 (murine double minute 2) gilt als eine der am besten beschriebenden Knotenpunkte im p53 Regulationsweg. (Bond et al, 2007).

Der Name leitet sich von der Wichtigkeit des MDM2 Proteins in der Maus-Entwicklung her. Menschliches MDM2 Protein hat circa 78% Homologie mit dem Maus-Protein. Das größte menschliche MDM2 (gelegentlich auch als HDM2 bezeichnet) Protein besteht aus 491 Aminosäuren (Bond et al, 2004).

Dabei findet sich am MDM2 eine hydrophobe Tasche, in welche sich eine hydrophobe Stelle des P53 anlagern kann. Das p53 Protein bildet dabei eine alpha Helix-Struktur aus (mit zweieinhalbfacher Windung). Dies geschieht durch Van-der-Waals-Kräfte. Die letztendliche Deaktivierung von P53 funktioniert über zwei Mechanismen: einerseits durch den direkten Block des P53-Petids (durch oben beschriebene Anlagerung), andererseits durch den proteosomalen Abbau (MDM2 wirkt auch als Ubiquitin-Ligase; Freedman et al, 2004).

MDM2 gilt somit als Onkogen; jene onkogene Wirkung entsteht durch die Unterdrückung und Inaktivierung von P53 durch oben beschriebene Bindung.

Das MDM2 Gen besitzt zwei bisher bekannte Promotorenregionen, die intrazellulären Spiegel des Mdm2-Proteins regeln:

Der erste Promotor ist am 5'-Ende zum ersten Exon und regelt die basalen MDM2-Spiegel der Zelle, die nicht durch DNA-Stress beeinflusst werden.

Der zweite Promotor hingegen ist im ersten Intron gelegen. Er enthält eine DNA-Sequenz, die auf p53 reagiert. Durch sie wird die MDM2 Expression nach p53 Aktivierung selbst aktiviert (Bond et al, 2004).

### 6.2. Amplifikation von MDM2

Amplifikation ist eine der möglichen Veränderungen genetischer Information. Es bezeichnet die Vermehrung des üblicherweise in doppelter Ausfertigung vorhandenen

Gens. So werden verschiedene Onkogene in Tumoren amplifiziert und somit aktiviert, wie z.B. HER-2/NEU beim Mammakarzinom (Böcker et al, 2001).

Die Beutung von MDM2 in der negativen Regulierung von p53 sowie die onkogene Wirkung von MDM2 wurden im oberen Abschnitt erläutert.

So war initial in einer spontan transformierten Mauszelllinie (BALB/c) MDM2 als eines von drei Genen identifiziert worden, welches 50fach durch Amplifikation überexprimiert war (Iwakuma et al, 2003).

So konnte Reifemberger et al 1993 zeigen, dass in 8-10% von Glioblastomtumoren MDM2 amplifiziert und somit überexprimiert ist – ohne dass in diesen Fällen p53 Mutationen vorlagen. MDM2 Amplifikation – so die Folgerung – schien eine weitere Möglichkeit der Zelle zu sein, der p53 Regulierung zu entkommen.

Inzwischen ist die Amplifikation von MDM2 in über 10% von etwa 8000 Tumoren identifiziert und bestätigt (Toledo et al, 2007) und in etwa 7% aller Tumoren ohne gleichzeitige p53 Mutation / *wild-type* p53 (Toledo et al, 2006). Zudem ist die Überexpression von MDM2 sowohl mit einer schlechten, aber auch mit einer günstigen Tumorprognose verbunden (Deb 2003).

Dies unterstreicht auch die klinische Relevanz von MDM2.

Eine weitere mögliche Ursache von erhöhten MDM2 Spiegeln sind Polymorphismen in der DNA, im Folgenden soll insb. der SNP309 besprochen werden.

### 6.3. SNP309 in MDM2

Das erste Intron von MDM2 besteht aus 524 Nukleotiden und es wurden dort zwei SNPs gefunden: An der Stelle 309 ein Austausch von G→T und an der Stelle ein Austausch 344 T→A. Der erste SNP an der Stelle 309 ist deutlich häufiger – und dieser ist es auch, der momentan hauptsächlich untersucht wird (auch in dieser Arbeit). Durch Computeralgorithmen wurde herausgefunden, dass die G Variante in SNP309 die Bindungsstelle von Sp1 um ein Nukleotid vergrößert und somit verstärkt. *In vitro* konnte dies dann auch bestätigt werden: Es wurde eine im Vergleich zur T Variante in SNP309 4-fach bessere Bindung von Sp1 zur G Variante von SNP309 festgestellt (Bond et al, 2004). Die Bindung von Sp1 führt wiederum zu erhöhten Spiegeln von MDM2-Protein.

SNP309 scheint somit entscheidend dafür zu sein, wie P53 auf eine zelluläre Stresssituation reagieren kann (Atwal et al, 2007). Aus der G Variante in SNP309 resultieren somit *erhöhte* Spiegel von MDM2 mRNA (Hu et al, 2007).

Bond et al. (2004) zeigten, dass GG SNP309 Zelllinien höhere MDM2 Spiegel erzeugten (mRNA durchschnittlich achtfach höher, Proteinspiegel vierfach höher) als TT SNP309 Zelllinien. Bei heterozygoten TG SNP309 hingegen fand sich durchschnittlich eine nur eine knapp zweifache Erhöhung der MDM2-Spiegel.

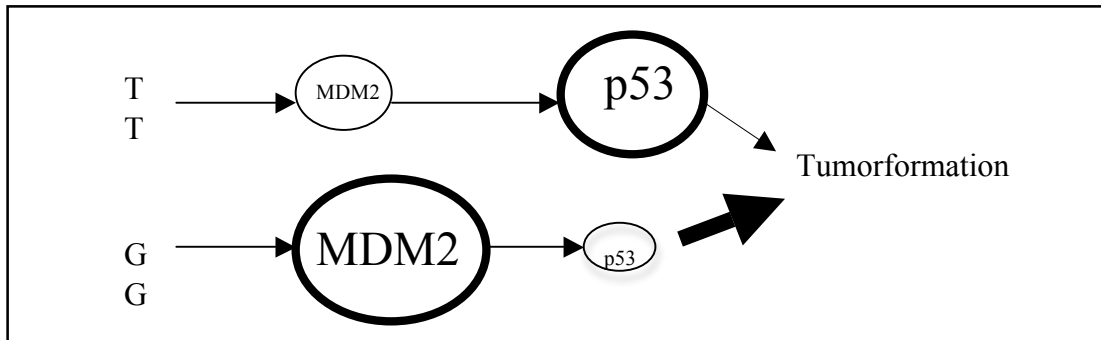
Bereits 1998 zeigten Jones et al., dass Mäuse, die MDM2-Protein „über“-exprimieren, Tumoren in höheren Raten entwickelten und zwar besonders jene Tumoren, die auch Mäuse mit mutiertem p53 entwickelten (Lymphome und Sarkome), was erneut die Interaktion von MDM2 und p53 untermauert.

Homozygote GG MDM2 Zelllinien sind mit einem attenuierten p53 Regelkreis verbunden (Bond et al, 2004) Die Fibroblasten von Li-Fraumeni Patienten, die eine p53 Mutation in einem Allel besaßen, wurden von Bond et al 2005 untersucht: Diejenigen Zellreihen, die den Genotyp TT besaßen, wurden nach „zellulärem Stress“ in der G2 Phase arretiert (eine Wirkung von P53). Bei der Zelllinie mit Genotyp GG war dies *nicht* der Fall – hier war kein Zellzyklusarrest zu beobachten. So scheint die Wirkung von P53 durch erhöhte MDM2-Spiegel – wie sie vor allem beim Genotyp GG entstehen – unterdrückt.

In der selben Studie zeigten Bond et al (2005) auch: In Zelllinien mit dem Genotyp GG in MDM2, waren die Spiegel der mRNA von MDM2 höher als in den Zelllinien mit Genotyp TT. Durch Gabe von Mithramycin A (welches die Sp1 Bindungsstellen an der DNA blockiert), konnte die durch SNP309 G bewirkte Verhinderung der p53-gesteuerten Apoptose rückgängig gemacht werden – Mithramycin A senkte die MDM2-Spiegel.

Tabakrauch ist eine der häufigsten Ursachen für zellulären Stress, der zur Aktivierung von p53 führt. MDM2 SNP 309 ist ein wichtiger Mediator dieser Aktivierung. Im Vergleich haben SNP 309 TT Träger einen 5 bis 14fach erhöhten p53-Spiegel in Reaktion auf ein derartiges Stresssignal. Bei GG SNP309 Trägern ist dieses jedoch nur 2 bis 3fach erhöht. (Hu et al, 2007).

Bond et al. konnten nachweisen, dass MDM2 nur bei GG Trägern *unter Stresseinfluss* zur einer Herunterregulation von p53 führte. Ohne Stressreiz führte MDM2 bei den Zellen zu keiner Senkung der p53-Level.



**B A.2.** Einfluss der SNP309 auf die MDM2 und P53 Spiegel, schematische Darstellung nach Bond et al, 2007: durch die den GG Genotyp in MDM2 entstehen erhöhte MDM2 Spiegel in der Zelle: MDM2 als negativer Regulator von p53 führt zu einer verstärkten Suppression von p53 und dadurch – so die Hypothese – zu einer gesteigerten Tumorformation.

Die Hypothese, die auch diese vorliegende Arbeit untersucht, ist nun, dass homozygote GG SNP309 MDM2 Träger ein erhöhtes Risiko haben, bestimmte Tumore zu entwickeln. Dies liegt daran, dass durch erhöhte Spiegel von MDM2-Protein die Funktion und Wirkung des Tumorsuppressorgens p53 supprimiert werden. Für das Urothelkarzinom gibt es bereits Hinweise, dass die erhöhte Expression von MDM2 eher mit invasiven Urothelkarzinom assoziiert ist (Korkolopoulou et al, 1997; Simon et al, 2002; Wu, 2005). Dies ist insofern konsistent mit den aktuellen Forschungsergebnissen, als besonders die invasiven Urothelkarzinome mit Mutationen von p53 vergesellschaftet sind und MDM2 in den p53 Regelkreis eingreift.

#### 6.4. Bedeutung der Variante G in SNP309 in der Entstehung von Tumoren

Nach seiner Erstbeschreibung 2004 durch Bond et al, wurde SNP309 in MDM2 zuerst für Patienten mit Li-Fraumeni Syndrom untersucht. Die Studie zeigte, dass Patienten, die eine G-Variante in SNP309 besitzen (also Genotyp GG oder GT) signifikant früher einen Tumor entwickelten als Patienten mit Genotyp TT (18 Jahre vs. 27 Jahre, ein *earlier onset* von 9 Jahren).

Die in diesem Zusammenhang ausgearbeitete Hypothese war, dass die G Variante in SNP309 zu einer verminderten Expression (und damit zu einer Suppression) von P53 führt und somit die Karzinogenese begünstigt wird.

Zahlreiche andere Tumoren sind inzwischen auf einen Zusammenhang mit SNP309 in MDM2 untersucht:

So konnten Hong et al 2005 zeigen, dass bei Patienten mit Ösophaguskarzinom der Genotyp GG signifikant häufiger in der Gruppe der Tumorpatienten als in der Kontrollgruppe zu finden war. Jedoch zeigte sich hier kein Einfluss von SNP309 auf Tumorstadium oder Diagnosezeitpunkt (im Sinne eines *early onset*). Interessant ist an dieser Studie auch das Ergebnis, dass Rauchen das Risiko an einem Ösophaguskarzinom zu erkranken beim GG Genotyp zusätzlich erhöht, was die Hypothese, wonach die G Variante in SNP309 MDM2 den p53 Regelkreis ungünstig beeinflusst, untermauert. Die Wirkung von MDM2, so die Hypothese hier, ist besonders deutlich bei bereits durch zellulärem Stress (hier: Rauchen) aktiviertem P53 (siehe auch weiter unten).

Gryshchenko et al 2008 fanden bei der B-CLL eine Assoziation von GG und TG SNP309 mit einem schlechteren Gesamtüberleben. Jedoch zeigte sich hier kein Einfluss auf das Risiko oder den *onset* der malignen Erkrankung; die Autoren definierten MDM2 als zusätzlichen, unabhängigen Risikofaktor, der möglicherweise zur Prognoseeinschätzung herangezogen werden kann.

In einer Studie von 2008 untersuchten Kibel et al die Wirkung von SNP309 auf das Prostatakarzinom. Er entdeckte ein erhöhtes Krankheitsrisiko und einen *earlier onset* beim Prostatakarzinom, der besonders ausgeprägt in der fortgeschrittenen Krebserkrankung war. Interessant an dieser Studie ist jedoch, dass der Zusammenhang nicht zur G Variante in SNP309, sondern zur T Variante in SNP309 gezeigt werden konnte. Die Autoren führen dies auf einen (hypothetischen) Hormoneffekt des TT Genotyps zurück: Da beim Prostatakarzinom ein starker Zusammenhang zwischen der Krankheit und dem Einfluss von Androgenen besteht, könnte der Genotyp TT sich als derjenige erweisen, der weniger auf Androgen reagiert und somit die Aggressivität des Tumors erhöht.

Dem gegenüber steht zudem auch die Untersuchung von Stoehr et al 2008, die keinerlei Einfluss von SNP309 auf das Prostatakarzinom (kein erhöhtes Risiko, kein Einfluss auf Histopathologie) fand.

Ein zur bisherigen Datenlage konträres Ergebnis findet sich auch bei Kondo et al, 2008: hier fand sich eine signifikante Korrelation zwischen niedrigen MDM2-Spiegeln, der Anwesenheit von Lebermetastasen und der Invasivität des Tumors – nach der gängigen Hypothese der Suppression von p53 durch hohe MDM2-Spiegel wäre eher das Gegenteil zu erwarten gewesen.

Folgende Tabelle gibt zudem noch einen kurzen Einblick über die zahlreichen Veröffentlichungen zu SNP309 in MDM2 und dessen Zusammenhang zu verschiedenen Tumoren:

<b>Kein signifikanter Einfluss von MDM2 SNP309</b>		
<b>Erkrankung (Populationskohorte)</b>	<b>Autor, Publikationsdatum</b>	
Brust- und Ovarialkarzinome (australische Kohorte)	Campbell et al, 2006	
Lungenkarzinome (chinesische Population)	Hu et al, 2006	
Kolonkarzinome bei Patienten mit Lynch-Syndrom (amerikanische Kohorte)	Sotaama et al, 2005	
Uterine Leiomyosarkome und Plattenepithelkarzinome in Kopf/Hals Bereich (finnische Kohorte)	Alhopuro et al, 2005	
Follikuläres Lymphom	Wrench et al, 2009	
Hauttumore (deutsche Kohorte)	Wilkening et al, Aug 2007	
HCC (taiwanesischer Bevölkerung)	Leu et al, 2009	
CLL (schwedische Kohorte)	Kaderi et al, 2010	
Prostata-Karzinom (amerikanische Kohorte)	Jaboin et al 2009	
Mammakarzinom (tschechische Kohorte)	Krekac et al, 2008	
B-NHL (deutsche Kohorte)	Bittenbring et al, 2008	
<b>Signifikanter Einfluss von MDM2 SNP309</b>		
<b>Erkrankung (Populationskohorte)</b>	<b>Autor, Publikationsdatum</b>	<b>Beschriebener Zusammenhang</b>
Melanom der Haut (italienische Kohorte)	Capasso et al, 2010	Pos. Assoziation mit Breslow Index; <i>nicht</i> assoz. mit Erkrankungsrisiko oder <i>onset</i>
B-CLL (schwedische Kohorte)	Willander et al, 2010	Genotyp GG hat signifikant kürzeres <i>overall survival</i>
HCC (türkische Bevölkerung)	Akkiz et al, 2010	G Allel in HCC Patienten erhöht
Adenokarzinom des Pankreas (deutsche Kohorte)	Grochola et al, 2010	G-Allel zeigt <i>earlier onset</i> von neun Jahren, v.a. in Männern; zudem v.a. bei jüngeren Patienten häufiger die G Variante in SNP309
HCC (japanische Kohorte)	Dharel et al, 2006	Genotyp GG häufiger bei Hepatitis C positiven Patienten im Vgl. zu Hepatitis C negativen mit Tumor. Jedoch kein Einfluss auf Entstehung oder Progress der Leberzirrhose.
Melanom der Haut (amerikanische Kohorte)	Firoz et al, 2009	GG Genotyp im Median 13 Jahre früher als TT und GT Genotyp; Effekt gilt nur für Frauen, nicht für Männer

<i>missed abortion</i> (verhaltener Abort; chinesische Kohorte)	Fang et al, 2009	GG Genotyp mit erhöhtem Risiko eines verhaltenen Aborts vergesellschaftet
Glioblastom (amerikanische Kohorte)	Khatri et al, 2008	GG Genotyp assoziiert mit earlier onset in Patienten mit Tumoren, die wild-type p53 besitzen; keine Assoziation zwischen SNP309 und <i>overall survival</i>
Neuroblastom (italienische Kohorte)	Cattelani et al, 2008	G Allel assoziiert mit aggressiveren Tumoren und erhöhter Prädisposition
Plattenepithelkarzinom in Mund und Rachen (taiwanische Kohorte)	Tu et al, 2008	GG Genotyp mit schlechtem Überleben in fortgeschrittenen Tumoren assoziiert; jedoch kein <i>early onset</i>
Endometriuskarzinom (amerikanische Kohorte)	Terry et al, 2008	Erkrankungsrisiko bei GG Genotyp erhöht, jedoch kein <i>early onset</i>

**Tab A.9.:** Zahlreiche Publikationen in den letzten Jahren beschäftigen sich mit der Assoziation von SNP309 in MDM2 und bestimmten Tumoren. Die Tabelle ist nur ein kleiner Auszug. Da auch die Ethnie eine wichtige Rolle zu spielen scheint (z.B. Hu et al, 2007; s.u.) wurde auch angegeben, aus welcher Kohorte die Patienten entstammen.

### 6.5. Geschlechtsabhängige Wirkung von SNP309 in MDM2

Eine neue Hypothese zur Wirkung von MDM2 fand sich im Jahre 2006: Bond et al zeigte, dass die Diagnose eines diffusen B-Zell-Lymphoms bei Frauen mit dem Genotyp GG in SNP309 durchschnittlich 13 Jahre früher gestellt wurde als bei TT Frauen. Bei männlichen Patienten zeigte sich hingegen *kein* Unterschied. Bond et al begründet dies damit, dass beim B-Zell-Lymphom der Östrogenrezeptor (ER) exprimiert wird und dieser einen Einfluss auf SNP309 nimmt: sollte dies der Fall sein, so müsste dieser Effekt vor allem bei Frauen deutlich werden, die noch nicht in der Menopause (<51 Jahre) sind und tatsächlich fand sich dies für die untersuchte Gruppe. Dies gilt ebenso für die bereits 2004 untersuchte Gruppe von Patienten mit SCCs. Wurden diese nämlich nach Geschlecht aufgeteilt, zeigte sich, dass der Effekt des *early onsets* nur durch den Anteil der Frauen entsteht – GG Frauen wurden durchschnittlich 14 Jahre eher diagnostiziert als TT Frauen. Dies konnte zudem noch für das invasive duktales Mammakarzinom gezeigt werden: von 658 untersuchten Patientinnen hatten 136 erhöhte Östrogenspiegel. Bei diesen zeigte sich, dass der GG Genotyp mit einem durchschnittlich sieben Jahre (Median:11 Jahre) früheren

Auftreten von Karzinomen verbunden war als der TT Genotyp. Wieder gilt dies nur für Frauen, die noch nicht in der Menopause sind (<51 Jahre), was die oben aufgestellte Hypothese untermauert.

Zu einem ähnlichen Ergebnis kamen auch Alhopuro et al, 2005, als er nur bei Kolonkarzinomen einen *early onset* von 2,7 Jahren für SNP309 fanden – diesen aber nur bei weiblichen Patienten.

Auf die letzten beiden Punkte dieses Abschnitts wird zudem in der DISKUSSION erneut eingegangen, wo die aktuelle Literatur zusammen mit den eigenen Daten verglichen wird.

## **7. Zielsetzung der Arbeit**

Ziel der Arbeit ist es, einen möglichen Zusammenhang zwischen den Sequenzpolymorphismus (SNP) 309 im Onkogen MDM2 und einem erhöhten Risiko für das Auftreten von Urothelkarzinomen zu untersuchen, insbesondere auch bei jungen Patienten (Alter kleiner 45 Jahre).

Dazu sollte untersucht werden, ob der Polymorphismus in den einzelnen Gruppen, Geschlechtern, Tumorstadien, Grading-Stadien unregelmäßig verteilt ist. Untersuchungen zu solchen genetisch prädisponierenden Faktoren gibt es bisher viele, am besten untersucht ist das Tumorsuppressorgen p53. Aber auch zu MDM2 gibt es zahlreiche Arbeiten, die teilweise auch eine positive Korrelation konstituieren.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden drei Gruppen auf den SNP309 in MDM2 untersucht und miteinander verglichen (Fall-Kontroll-Studie).

Eine Kontrollgruppe, bestehend aus Nicht-Tumorpatienten; ein Patientenkollektiv mit frühem Auftreten von Urothelkarzinomen (vor dem 45 Lebensjahr); und ein Kollektiv von Patienten mit Urothelkarzinomen mit durchschnittlichem Erkrankungsalter.

Aus dem Vergleich dieser drei Gruppen sollten Rückschlüsse gezogen werden auf den Einfluss von SNP309 in MDM2 auf das Urothelkarzinom.

## B. MATERIAL UND METHODEN

Alle Arbeitsschritte werden hier in der Reihenfolge der Anwendung beschrieben. Dabei wurden während der Aufarbeitung manche der Schritte parallel durchgeführt.

### 1. Vorliegendes Material

Bei Fertigstellung der Arbeit waren 421 Patientenproben ausgewertet.

Dieses Kollektiv lässt sich in drei Gruppen aufteilen:

Eine Gruppe von Patienten, die sich in der Klinik und Poliklinik für Urologie, Regensburg, vorgestellt hatten, jedoch ohne Verdacht auf Malignität, diente als *Kontrollgruppe*. Es handelte sich in dieser Gruppe um Material von 140 Patienten, davon waren alle auswertbar.

Verteilung der Diagnosen bei der Kontrollgruppe:

Anzahl	Diagnose	In Prozent
89	Benigne Prostatahyperplasie (BPH)	63,6 %
22	Zystitis	15,7 %
29	Sonstige (nicht bekannt, Tumor negativ)	20,7 %
Insgesamt 140		

**Tab B.1.** Diagnosen in der Kontrollgruppe

Die zweite untersuchte Gruppe umfasste Patienten, bei denen im statistisch am häufigsten zu erwartenden Erkrankungsalter (also um das 70. Lebensjahr) ein Urothelkarzinom diagnostiziert wurde. Insgesamt wurden 126 Patienten untersucht, davon waren 113 auswertbar.

Die beiden eben benannten Gruppen entstammen einem Kollektiv von Patienten mit und ohne Urothelkarzinom, die vom Lehrstuhl für Pathologie in Regensburg in Zusammenarbeit mit dem Lehrstuhl für Urologie der Universität Regensburg akquiriert wurden.

Die Tumorgruppe aus diesem Kollektiv wird fortan als *Konsequente Fälle* bezeichnet.

<b>Verteilung Grading in der Gruppe <i>Konsequente Fälle</i></b>		
<b>Anzahl n</b>	<b>Grading (G)</b>	<b>In Prozent</b>
39	G1	34,5 %
44	G2	38,9 %
30	G3	26,5 %
<b>113</b>	Insgesamt	

**Tab B.2.** Grading bei den *Konsequenten Fällen*

<b>Tumorstadien in der Gruppe <i>Konsequente Fälle</i></b>		
<b>Anzahl</b>	<b>Tumorstadium</b>	<b>In Prozent</b>
68	pTa	60,2 %
29	pT1	25,7 %
13	>= pT2	11,5 %
3	Unbekannt	2,7 %
<b>113</b>	Insgesamt	

**Tab B.3.** Tumorstadien bei den *Konsequenten Fällen*

Die dritte untersuchte Gruppe waren Patienten, bei denen sich ein Urothelkarzinom vor dem 45. Lebensjahr manifestierte. In dieser Gruppe wurden insgesamt 155 Patienten untersucht, davon waren 111 auswertbar. Fortan wird diese Gruppe als *Junge Patienten* bezeichnet.

Das Material stammt aus Instituten für Pathologie aus ganz Deutschland (Weiden, München, Düsseldorf, Dresden, Essen, Singen, Regensburg, etc.), den USA und der Schweiz (Basel).

<b>Verteilung Grading in der Gruppe <i>Junge Patienten</i></b>		
<b>Anzahl n</b>	<b>Grading (G)</b>	<b>In Prozent</b>
24	G1	21,6 %
29	G2	26,1 %
16	G3	14,4 %
42	unbekannt	37,8 %
<b>111</b>	insgesamt	

**Tab B.4.** Grading bei den *Jungen Patienten*

<b>Tumorstadien in der Gruppe <i>Junge Patienten</i></b>		
<b>Anzahl</b>	<b>Tumorstadium</b>	<b>In Prozent</b>
<b>49</b>	pTa	44,1 %
<b>10</b>	pT1	9,0 %
<b>14</b>	>= pT2	12,6 %
<b>38</b>	unbekannt	34,2 %
<b>111</b>	insgesamt	

**Tab B.5.** Tumorstadien bei den *Jungen Patienten*

Zur Verteilung der Geschlechter in den einzelnen Gruppen gibt folgende Tabelle Aufschluss:

<b>Verteilung der Geschlechter in den einzelnen Gruppen</b>		
<b>(Anzahl)</b>		
	<b>weiblich</b>	<b>männlich</b>
<b>Kontrollgruppe</b>	12	120
<b>Junge Patienten</b>	24	64
<b>Konsequente Fälle</b>	22	90

**Tab B.6.** Geschlechterverteilung in den drei untersuchten Gruppen

Die DNA der Patienten lag zum einen Teil bereits in isolierter Form vor, zum anderen Teil musste diese jedoch noch aus Normalgewebe gewonnen werden.

Das Gewebe für die DNA-Aufarbeitung der Proben wurde dabei durch Mikrodissektion aus Paraffinblöcken gewonnen.

Zudem wurde DNA z.T. auch aus archiviertem Patientenblut (EDTA) gewonnen. DNA aus Tumorgewebe direkt wurde *nicht* untersucht.

## **2. Gewinnung von DNA: Mikrodissektion von Material aus Paraffinblöcken**

### *2.1. Einbettung des Gewebes in Paraffin zur Lagerung*

Für die Mehrzahl der Proben (bes. der *Jungen Patienten*) lag nur Archivmaterial vor. Aus Paraffinblöcken musste deshalb die DNA gewonnen werden.

Dies geschah wie folgt (gemäß der bereits gut etablierten Methode des Instituts für Pathologie, Regensburg; erstmals 1985 von Goelz et al beschrieben): Zuerst erfolgt eine Fixierung der eingegangenen nativen Patientenproben für einige Stunden in Formalinlösung (4%).

Anschließend werden die Präparate in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert. Der Alkohol wiederum wird mit Xylol entfernt. Nun können die Präparate in Paraffin gegossen und archiviert werden.

Von den auf diese Weise gefertigten Blöcken werden mehrere Schnitte mit einer Schichtdicke von 10 µm und ein Schnitt mit 2 µm Dicke hergestellt. Diese Schnitte werden nun auf saubere Objektträger aufgebracht und dann im Brutschrank bei 42-45°C getrocknet.

## *2.2. Entparaffinierung*

Um die DNA aus den Proben gewinnen zu können, müssen diese wiederum vom Paraffin gereinigt werden.

Hierzu erfolgt eine Inkubation der Schnitte bei 72°C für 30 min, hierbei schmilzt das Paraffin und löst sich von dem Gewebe ab. Anschließend werden die Schnitte noch bis zu 5 min in ein Xylol-Bad gestellt. Durch das Bad in einer absteigenden Alkoholreihe (je bis etwa 2 min) erfolgt die endgültige Entfernung des Paraffins. Die Schnitte sind nun zum Bearbeiten bereit.

In 70%-igem Alkohol kann die Lagerung der Schnitte bis zu etwa einer Woche erfolgen. So ist hier nicht zwingend die sofortige Weiterverarbeitung notwendig.

## *2.3. HE-Färbung der Schnitte*

Der 2 µm dünne Schnitt aus dem Paraffinblock (s.o.) dient als Vergleichsschnitt für die Mikrodissektion. Er wird mittels HE-Färbung angefärbt: das Zytoplasma wird rot, Zellkerne hingegen blau dargestellt.

Mittels eines Folienstifts werden auf dem Objektträger die Tumorareale bzw. tumorfreies Normalgewebe durch einen Pathologen (Facharzt) markiert. Dies macht anschließend eine bessere Zuordnung möglich.

Dieser HE-gefärbte und mit Folienstift markierte Schnitt dient als Referenz für die anschließende Mikrodissektion. So können im Vergleich der zu dissezierenden (entparaffinierten) Schnitte mit dem HE-gefärbten Vergleichsschnitt die Strukturen genauer

identifiziert und disseziert werden. Zudem bringt dies eine große Zeitersparnis, da nicht jeder Schnitt einzeln und völlig neu bewertet werden muss.

HE Färbung (Protokoll des Instituts für Pathologie, Regensburg):

1. 10 min Xylol
2. Dehydrierung in absteigender Alkoholreihe (mit je 100%, 96%, 80%, 60%)
3. 1 min im destillierten Wasser
4. 10 min in Hämatoxylin
5. 25 min Bläuen in warmen Leitungswasser
6. wenige Sekunden in Eosin
7. Spülen in Leitungswasser (kalt, 2x)
8. Aufsteigende Alkoholreihe (mit je 60%, 80%, 96%, 100%)
9. Xylol-Bad
10. Eindeckeln mit Entellan und Deckglas

#### *2.4. Mikrodissektion und anschließende Isolierung der DNA*

Die zu dissezierenden Schnitte werden mittels Methylenblau eingefärbt, wodurch eine Unterscheidung von Zellkern und Zytoplasma und somit eine leichtere Orientierung möglich ist.

Unter dem Stereomikroskop werden bei der Mikrodissektion die wie oben beschrieben gekennzeichneten Areale aufgesucht und unter Verwendung einer sterilen Nadel (*Microlance*) entfernt und in ein mit 80  $\mu$ l *tissue-puffer* befüllte 1,5 ml Eppendorf Cups eingebracht. Der Referenzschnitt dient dabei als Hilfsmittel und macht ein genaues Aufsuchen des zu dissezierenden Materials möglich (s.o.).

Aus der so entstandenen Lösung in den Eppendorf Cups (bestehend aus dem *tissue-puffer* und dem gewonnenen Gewebe) wird die DNA isoliert.

Dies erfolgt unter Zuhilfenahme des „MagNa Pure LC“- Gerätes der Firma „Roche Applied Sciences“ (vollautomatische Gewinnung der DNA).

Die aus dem Gerät entnommenen DNA-Proben können direkt weiterbearbeitet oder zur Zwischenlagerung im Gefrierschrank gegeben werden.

Auch diese Methodik wurde gemäß den Protokollen des Instituts für Pathologie, Regensburg, durchgeführt.

### **3. PCR, Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus (RFLP) und Vermessung mit Hilfe der Kapillarelektrophorese**

#### *3.1 Allgemeines (vgl. Böcker et al., 2001)*

Mittels RFLP wurde ermittelt, welche Variante des SNP in dem untersuchten Gewebe vorliegt. Eine Unterscheidung zwischen heterozygoter oder homozygoter Variante ist so auf einfache Weise möglich.

Durch den Verdau mit spezifischen Restriktionsendonukleasen entstehen verschieden lange Reaktionsprodukte (Fragmente), abhängig vom Genotyp in dem vorliegenden SNP. Anschließend werden diese Fragmente mittels Kapillarelektrophorese aufgetrennt und gemessen. So ist eine eindeutige Zuordnung des Genotyps möglich, da dieser durch die Länge der entstehenden Fragmente exakt definiert ist.

Eine vorangehende PCR des Untersuchungsmaterials ist notwendig, um die DNA aus den zu untersuchenden Proben auf eine ausreichende (und somit „messbare“) Menge zu erhöhen.

Erstmalig beschrieben wurde die PCR durch Mullis et al. Das Ziel ist die Vervielfältigung einer ausgewählten DNA-Sequenz.

Benötigt wird:

- die vier Desoxyribonukleotidtriphosphate (dNTPs),
- ein Primer-Paar, welche den gesuchten DNA-Abschnitt an der 3' und 5'-Seite flankieren und
- eine hitzestabile Polymerase.

Ein PCR-Zyklus ist aus drei Einzelschritten zusammengesetzt, die nacheinander erfolgen. Jeder dieser Zyklen verdoppelt die Zahl der Kopien.

1. *Denaturierung*: Trennung der DNA Stränge der zu untersuchenden DNA durch Erhitzen auf 94°C für etwa 1min.
2. *Annealing*: „Anlagerung“ (Hybridisierung) der Primer mit der zu untersuchenden DNA bei der jeweils spezifischen Temperatur (in der hier dargestellten Arbeit: 61°C).
3. *Extension* der Primer bei 72°C durch Anlagerung der komplementären Nukleotide (dNTPs) an das freie 3'-Ende in Richtung des zu untersuchenden DNA Abschnitts.

### 3.2 Standard – PCR (Protokoll des Instituts für Pathologie, Regensburg)

PCR-Zutaten	Konzentration	Menge
Template-DNA		3-5 µl
Reaktionspuffer	10 x	2,5 µl
DMSO		1,2 µl
dNTPs	10 mM	0,5 µl
Primer	15 µM	0,83 µl
Taq-Polymerase	5 U/µl	0,2 µl
H <sub>2</sub> O Nanopure		13,3-15,3 µl
<b>Gesamt</b>		<b>25 µl</b>

**Tab B.7.** Master - Mix für die Standard - PCR - Reaktion

Verwendung fand das bereits etablierte Protokoll des Instituts für Pathologie, Regensburg.

Abhängig von der Probenzahl, wurde die oben angegebene Menge (die ja nur einer einzelnen Probe entspricht) vervielfältigt. Bei den meisten Proben wurden 3 µl Template-DNA eingesetzt. War ein Lauf mit dieser DNA-Menge unergiebig, wurde er mit 5 µl Template-DNA wiederholt (dementsprechend wurde der Anteil H<sub>2</sub>O Nanopure reduziert), was in vielen Fällen zu auswertbaren Ergebnissen führte.

Die Reagenzien (ohne Template-DNA) wurden zusammengegeben (zum sog. Master-Mix) und zentrifugiert. Anschließend erfolgte die gleichmäßige Verteilung auf 1,5 ml Eppendorf-Cups.

In diese Cups wurde schließlich die entsprechende Menge DNA zugegeben, erneut gemischt und zentrifugiert (6000 U/min).

Folgendes Protokoll durchliefen die Proben dann im Thermocycler:

Schritt	Operation
1	94°C, 2min
2	1°C/s auf 94°C
3	94°C, 1min
4	1°C/s auf 61°C
5	61°C, 1min ( <b>Annealing-Temperatur</b> )
6	1°C/s auf 72°C

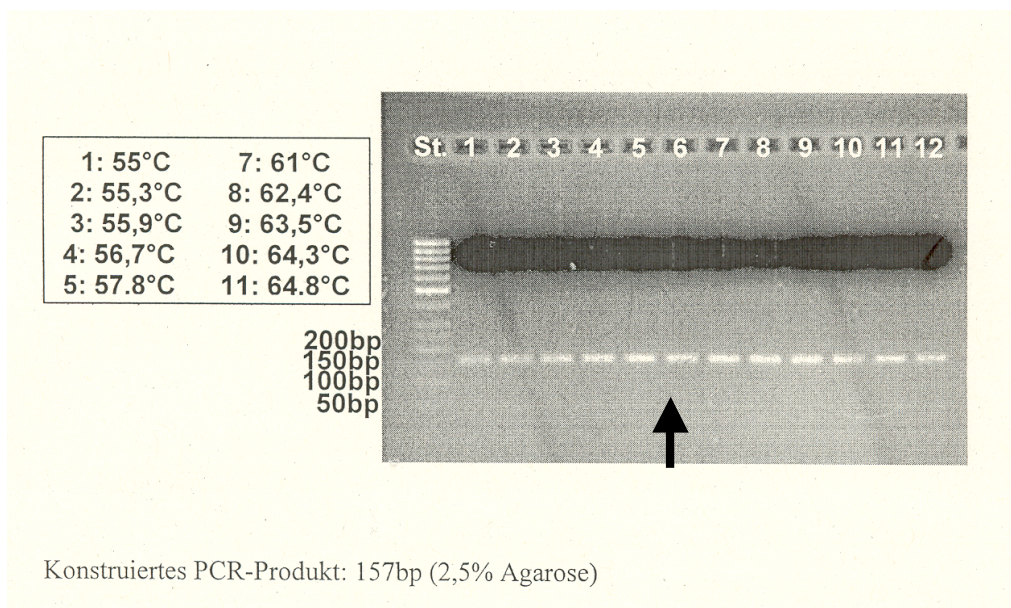
7	72°C, 1min
8	Gehe zu 2, <b>34 Mal</b>
9	72°C, 8min
10	4°C für immer

**Tab B.8.** Standard - PCR - Programm bei der Annealing-Temperatur von 61°C

Nach Beendigung des Reaktionszykluses erfolgte die Lagerung der Proben im Kühlschrank bei 4°C bis zur weiteren Verarbeitung oder die sofortige Weiterverarbeitung, was eine flexible Aufarbeitung der Proben möglich machte.

Zur Etablierung der verwendeten Annealing-Temperatur wurde eine Gradienten-PCR durchgeführt. Hierzu wurde ein konstruiertes PCR-Produkt (157 bp; entsprechend der Länge der zu untersuchenden PCR-Produkte) auf 2,5% Agarose verwendet und für mehrere Annealingtemperaturen zwischen 55°C und 64,8°C ausgetestet. Es ergab sich bei den meisten Annealingtemperaturen ein annehmbares Ergebnis.

Ausgewählt wurde schließlich die Temperatur 61°C.



**B B.1.** Gradienten-PCR zur Etablierung der PCR-Annealingtemperatur: die schließlich verwendete Annealing-Temperatur war 61°C (schwarzer Pfeil).

### 3.3 Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus-Analyse (RFLP-Analyse)

Ein gut etabliertes Verfahren zur Charakterisierung unterschiedlicher Nukleotidsequenzen ist die Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus-Analyse (kurz: RFLP-Analyse). Sie dient der Genotypisierung zweier homologer Allele.

Das Prinzip ist wie folgt: Der zu untersuchende SNP kann in zwei möglichen Varianten vorliegen. Die verwendete Restriktionsendonuklease erkennt und schneidet nur eine der beiden. Das vorhandene PCR-Produkt (das aus der zu untersuchenden DNA-Sequenz gewonnen wurde) wird also von der Endonuklease geschnitten, sofern eine der zu untersuchenden Varianten vorliegt. Das PCR-Produkt bleibt vollständig (und wird *nicht* geschnitten), wenn genau *die andere* der beiden Varianten vorliegt. Es entsteht im Folgenden ein typisches *Fragmentmuster*, welches eine genaue Aussage über die vorhandenen zwei Allele erlaubt und somit Rückschlüsse auf den bestehenden SNP zulässt.

Im Falle dieser Arbeit wurde für die Untersuchung von SNP309 bei MDM2 die Endonuklease *MspAII* verwendet. Als Schnittsequenz erkennt diese 5'-CTGC-3'. Liegt also in SNP 309 das G-Nukleotid vor, so schneidet die Endonuklease das 157 bp große PCR-Produkt in zwei Produkte von 106 bp und 51 bp. Liegt in SNP309 das T-Nukleotid vor, so wird das PCR-Produkt *nicht* geschnitten und bleibt 157bp groß.

Da nur der Primer am 5'-Ende fluoreszenzmarkiert ist, nicht jedoch der Primer am 3'-Ende, ist bei dem durch das Restriktionsenzym geschnittenen PCR-Produkt *nur eines* der beiden entstehenden Stücke leuchtend. Das 106 bp große Stück ist in diesem Fall *nicht* fluoreszenzmarkiert und wird deshalb vom ABI *nicht* gemessen.

Da das 157 bp große PCR-Produkt, bei dem SNP309 T vorliegt, durch das Restriktionsenzym gar nicht geschnitten wird, ist es natürlich ebenfalls fluoreszenzmarkiert.

Somit erscheinen in der ABI Auswertung:

- Bei homozygoten TT-Trägern: ein Signal (*peak*) bei etwa 157bp (Wert kann leicht schwanken, abhängig vom verwendeten Standard): keines der PCR-Produkte der beiden Allele wird geschnitten, das DNA-Produkt bleibt 157 bp lang und ist fluoreszenzmarkiert.
- Bei heterozygoten TG-Trägern: zwei Signale (*peaks*) bei etwa 51 bp und 157 bp: nur eines der PCR-Produkte der beiden Allele wird geschnitten; somit entsteht ein fluoreszenzmarkiertes, 51 bp langes DNA-Produkt und ein 106 bp langes DNA-Produkt,

welches nicht fluoreszenzmarkiert ist (und somit auch nicht als Signal vermessen wird), sowie ein fluoreszenzmarkiertes, unverändert 157 bp langes DNA-Produkt.

- Bei homozygoten GG-Trägern: wieder nur ein Signal (*peak*, entspr. den homozygoten TT-Trägern), jedoch bei etwa 51bp: beide PCR-Produkte beider Allele werden geschnitten.

Somit ist durch grafische Darstellung der einzelnen Banden ein genauer Rückschluss auf den Genotyp möglich (Grafik hierzu siehe weiter unten).

Restriktionsansatz für den Restriktionsverdau:

0,5 µl Endonuklease
3,0 µl Puffer
0,3 µl BSA
6,2 µl H <sub>2</sub> O

**Tab B. 9.** Protokoll Restriktionsverdau

Es wurde der von „New England Biolabs“ (Frankfurt / Main, Deutschland) mitgelieferte Puffer 4 benutzt, ebenso das von derselben Firma mitgelieferte BSA.

Die Angaben aus **Tab. B.9.** wurden mit der jeweiligen Probenanzahl des Ansatzes multipliziert und in einem 1,5 ml Eppendorf-Cup vorgelegt und gründlich gemischt.

Je 10 µl Mix wurden anschließend auf die entsprechende Anzahl 0,5ml-Eppendorf-Cups aufgeteilt und daraufhin je 20 µl PCR-Produkt zugefügt.

Daraufhin erfolgte die Inkubation nach folgendem Protokoll (Restriktionsverdau):

<i>MspAII</i>
37°C für 12 h
93°C für 5 min.
Abkühlen auf 8°C

**Tab B. 10.** Protokoll Restriktionsverdau

3.4 Exakte Darstellung der DNA-Abschnitte des PCR-Produkts mit SNP 309 in MDM2 inklusive der Schnittstelle von MspAII

...GTTCGGAGGTCTCCGCGGGAGTTCAGGGTAAAGGGTCACGGGGGCGGGGG  
 CTGCGGGGCGCT(T/G)CGGCGCGGGAGGTCCGGATGATCGCAGGTGCCTG  
 TTCGGGTCACTAGTGTGAACGCTGCGCGTAGTCTGGGCGGGATTGGGCCGG  
 TTCAGTGGGCAGGTTGACTCAGCTTTT...

entnommen aus: Sotamaa et al, 2005

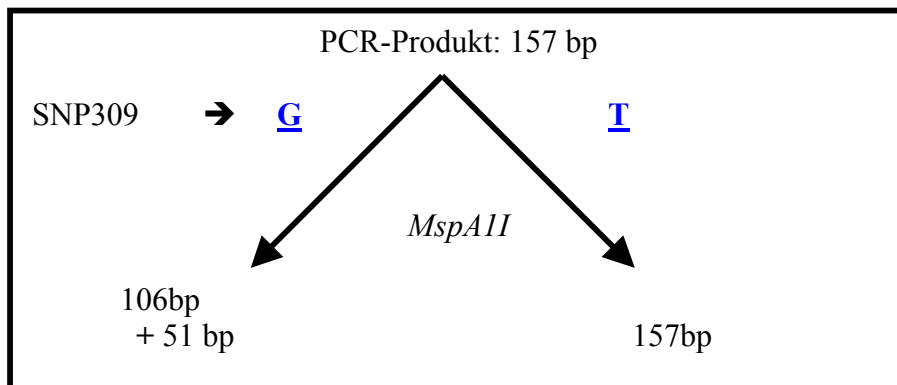
...CAGT...: Primer

...CGCG...: Primer, fluoreszenzmarkiert

T/G: SNP309 MDM2

CGGCGC: zu amplifizierende DNA-Sequenz

Grafische Darstellung der Endonukleaseaktivität:



**B B.2.** Grafische Darstellung der Endonukleaseaktivität, abhängig von SNP309 in MDM2: das PCR-Produkt umfasst 157 bp. Liegt bei SNP309 die G Variante vor, so schneidet *MspAII* das PCR-Produkt und es entstehen zwei neue Produkte. Da nur einer der verwendeten Primer fluoreszenzmarkiert ist, ist auch nur eines (51bp) der beiden Produkte „leuchtend“. Liegt in SNP309 die T Variante vor, schneidet *MspAII* gar nicht. Das PCR Produkt bleibt 157 bp lang.

Liegt nun die Variante G in SNP309 vor, so schneidet *MspAII* das PCR-Produkt in zwei Teile, von denen eines fluoreszenzmarkiert ist (siehe **B B.2.**). Liegt T in SNP309 vor, so wird das Produkt nicht geschnitten.

## 4. ABI Analyse

### 4.1.) Elektrophorese und Kapillarelektrophorese – Prinzip und verwendete Materialien

(aus Kleparnik et Bocek, 2007)

Geladene Teilchen werden bei der Elektrophorese in einem Medium in einem elektrischen Feld bewegt.

Von der Ladung des Teilchens, seiner Größe sowie der Spannungsgröße des elektrischen Feldes ist die Geschwindigkeit abhängig, mit der sich das zu untersuchende Teilchen in dem Medium bewegt (und somit auch die Strecke, die es in einer bestimmten Zeit zurücklegt). Eine Auftrennung nach den eben genannten Faktoren ist die Folge. Zudem lässt die Elektrophorese sehr gut automatisieren.

Auch DNA-Fragmente (PCR-Produkte) können durch die ihnen anhaftenden negativ geladenen Phosphatgruppen aufgetrennt werden.

Bei der Kapillarelektrophorese werden die Proben durch Kapillaren von ca 10-100 cm Länge und 25-100 µm Breite geführt.

In dieser Arbeit fand das Kapillarelektrophoresegerät *ABI Prism® 3100-Avant Genetic Analyzer* der Firma *Applied Biosystems* Verwendung.

Die Messung der *peaks* in Basenzahl und Höhe wird objektiv gegen einen Standard gemessen und macht Ergebnisse sehr gut vergleichbar. Es erlaubt die Fragment- bzw. Sequenzanalyse (beide Methoden fanden in dieser Arbeit ihre Anwendung) von bis zu 96 Proben pro Lauf (4 Proben / h). Zudem können die Daten auf elektronischen Speichermedien gesichert werden, was große praktische Relevanz hat.

### 4.2 Fragmentanalyse im ABI Prism® 3100-Avant Genetic Analyzer

Die Fragmentanalyse dient dazu:

- 1.) eine Mischung von DNA-Fragmenten ihrer Länge nach aufzutrennen,
- 2.) die Länge der einzelnen Fragmente in Basenpaaren (bp) zu ermitteln,
- 3.) ein Profil der Auftrennung zu erstellen und
- 4.) die ungefähre (relative) Konzentration jedes Fragments in der Probe angeben.

Damit die DNA-Fragmente detektiert werden können, müssen bei dem PCR-Ansatz fluoreszenzmarkierte Primer verwendet werden. So ist jeder (gemessene) PCR-Strang mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert. Verwendet man verschiedene Farbstoffe für verschiedenen Primer, so ist auch eine Analyse mehrerer PCR-Produkte möglich.

Der Primer dieser Arbeit war *fam*-markiert (blau); die Farbe der Markierung ist letztendlich für die Vermessung unerheblich.

Die verdauten PCR-Produkte werden auf folgende Art auf die ABI-Analyse vorbereitet:

Der Elektrophorese-Ansatz (12 µl *Hi-Di<sup>TM</sup>Formamid* und 0,5 µl *GS 400 HD Rox*) wurde in eine 96-well-Platte vorgelegt und dazu jeweils 1 µl des PCR-Produktes zugefügt. Bei 94°C wurden die Proben 3 min denaturiert und auf 4 °C abgekühlt.

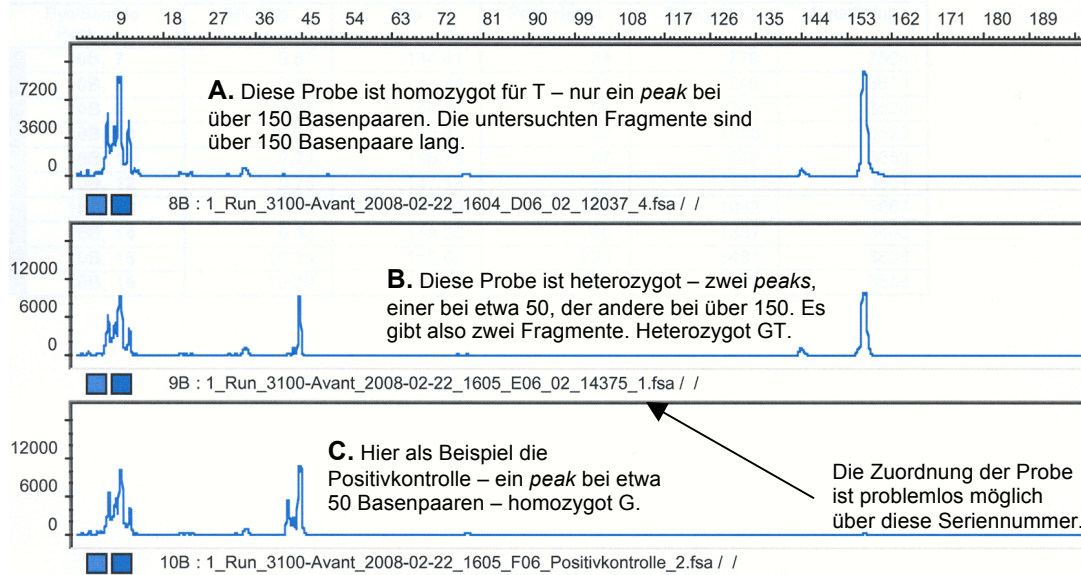
Nach Einbringen in das Gerät und dem Anlegen eines elektrischen Feldes wandert die Probe in den Kapillaren, wobei die kürzeren Fragmente schneller wandern als die längeren.

In der Detektionskammer angelangt, werden die Fragmente durch einen Laser bestrahlt, wodurch die Fluoreszenz angeregt wird. Das abgestrahlte Fluoreszenzlicht wird detektiert, nach Wellenlänge selektiert und schließlich auf die Detektionskamera (CCD, *charge-coupled device*) fokussiert. Hier geschieht die Umrechnung in elektronische Daten und die Speicherung auf einem elektronischen Medium. Mit der *3100-Avant Data Collection Software* geschieht die Auswertung.

Die Daten werden hier als sog. Elektropherogramm dargestellt: auf der y-Achse wird die relative Farbstoffkonzentration angegeben, die x-Achse stellt die Basen-Länge (Anzahl der bp) der Fragmente dar.

In dieser Arbeit wurde für die Auswertung folgende Einstellungen vorgenommen: Da sich die Länge der Basenpaare aus dem PCR-Produkten im Bereich bis zu 200bp bewegten, wurde dies als Richtwert für die x-Achse eingestellt. Auf der y-Achse wird die Intensität eingestellt, jedoch variabel abhängig von der Intensität der jeweiligen Probe.

Um eine einwandfreie Zuordnung aller Proben möglich zu machen, wurde unter jeder Probe die Eingangsnummer aus dem Institut für Pathologie Regensburg eingetragen. Mit Hilfe dieser Codennummer ist eine eindeutige Zuordnung der Proben möglich.



**B B.3.** Typische Daten der RFLP-Analyse im ABI: Dargestellt sind der Reihe nach alle drei möglichen Ergebnisse. **A.** Genotyp TT, **B.** Genotyp GT (heterozygot) und **C.** Genotyp GG.

Mit Hilfe der ABI-Software lässt sich die Auswertung am Computer erstellen. Liegen nur kleine Fragmente nach dem Restriktionsverdau vor (bei Genotyp GG), so wird nur ein *peak* bei etwa 50 Basenpaaren angezeigt (dies unterliegt leichten Schwankungen, die abhängig vom verwendeten Standard sind). Sind zwei *peaks* erkenntlich, einer bei etwa 50, der andere bei etwa 150, so liegt der heterozygote Genotyp GT vor. Ist nur ein *peak* bei etwa 150 vorhanden, so sind ist die Probe der homozygote Genotyp TT.

## 5. Sequenzierung

(nach dem Protokoll des Instituts für Pathologie, Regensburg)

Die Ergebnisse, die mittels RFLP gewonnen wurden, wurden einer Prüfung mittels Sequenzierung der untersuchten DNA unterzogen, um somit die Zuverlässigkeit der RFLP-Methode zu ermitteln.

Folgende Schritte sind dazu nötig:

1. PCR: ausführlich weiter oben im Text beschrieben.

2. PEG-Fällung: Reinigung der PCR-Produkte (unter anderem von freien dNTPs und Primern); dies ermöglicht eine bessere Darstellung der Ergebnisse in der Elektrophorese.
3. Agarose-Gel-Elektrophorese: zur Klärung, ob das gewünschte PCR-Produkt tatsächlich vorhanden ist; zum Aufdecken von Kontaminationen; zur Einschätzung der in der folgenden Sequenz-Reaktion benötigten Menge an Template-DNA anhand eines Vergleichs zwischen Banden und Marker.
4. Sequenz-Reaktion n. Sanger
5. Ethanol-fällung: zur Reinigung der Produkte
6. ABI 3100-Analyzer: Elektrophorese; anschließend Detektion der Fluoreszenzsignale; Ausdruck der farbigen Chromatogramme zum Vergleich mit den Grafiken der Kapillarelektrophorese (siehe ERGEBNISSE)

## 6. Software

Als Textverarbeitungsprogramm diente *Microsoft Word (für Mac, Version 12.0.0)*. Die statistischen Berechnungen (und auch die Grafiken aus den kommenden Kapiteln) wurden mit *SPSS (Version 16.0)* durchgeführt.

## C. ERGEBNISSE

In dieser Arbeit wurde die Verteilung von SNP309 in MDM2 für das Urothelkarzinom untersucht.

Um eine Aussage treffen zu können, ob sich dieser auf die Entstehung von Harnblasenkarzinomen und besonders auf die vorzeitige Tumorgenese (entspricht dem *earlier onset*, bei Patienten jünger 45 Jahre) auswirkt, wurden drei verschiedene Gruppen untersucht und miteinander verglichen:

Zum einen eine *Kontrollgruppe* mit Patienten, die keine Tumorerkrankung hatten.

Zum anderen eine Gruppe von Patienten mit Urothelkarzinom (pTa – pT3), die im statistisch erwarteten Alter erkrankten (zwischen circa 60 und 75 Jahren; im Weiteren *Konsekutive Fälle* genannt).

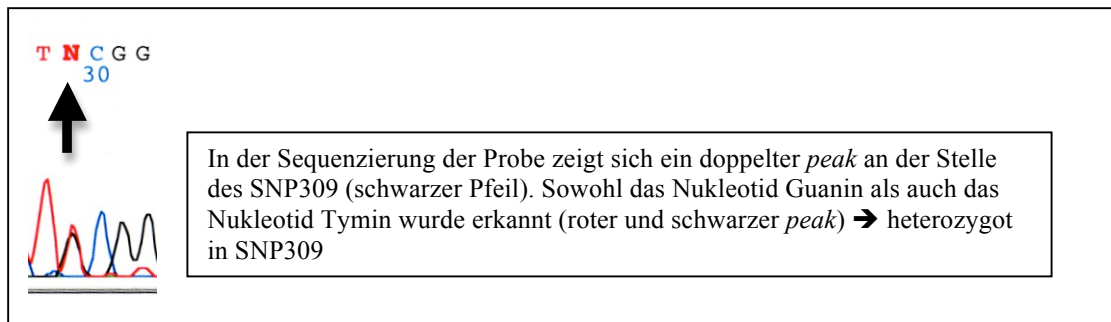
Und schließlich eine Gruppe von Patienten mit Urothelkarzinomen, die alle jünger als 45 Jahre waren (im Folgenden als *Junge Patienten* bezeichnet).

Im Vergleich dieser drei Gruppen kann entschieden werden, ob der Nukleotidpolymorphismus 309 in MDM2 eine Prädisposition darstellt, um an einem Urothelkarzinom zu erkranken und auch inwiefern sich dieser Polymorphismus darauf auswirkt, dass ein Harnblasenkarzinom *früher* entsteht.

### 1. Kontrolle der Ergebnisse der RFLP-Analyse durch Sequenzierung

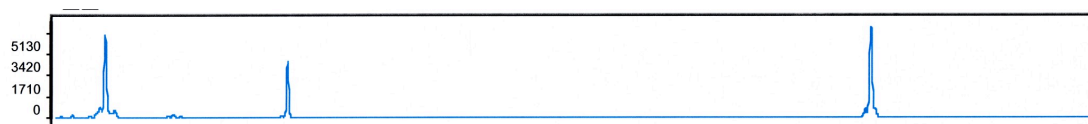
Um die Validität der Ergebnisse der RFLP-Analyse zu überprüfen, wurde bei neun Proben eine DNA Sequenzierung durchgeführt, die in 100% der Fälle ein übereinstimmendes Ergebnis brachte. Somit kann davon ausgegangen werden, dass die Daten der RFLP richtig sind.

Die Ergebnisse in der Übersicht:



**B C.1.** Ergebnis der Sequenzierung einer heterozygoten DNA-Probe

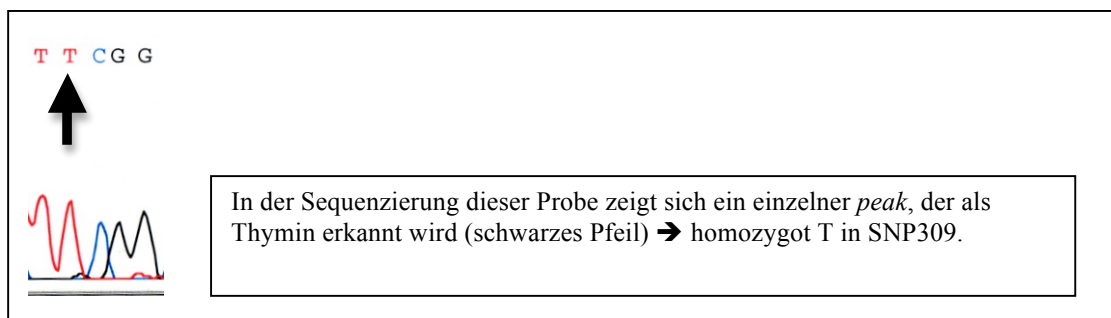
In der RFLP-Analyse (**B C.2.**) am ABI zeigt sich bei der gleichen Probe ebenfalls ein zweifacher *peak* bei 51bp und 157bp (vgl. Material und Methoden). Dies spricht für eine heterozygote Präsentation in SNP309:



**B C.2.** RFLP-Analyse von einer in SNP309 heterozygoten DNA-Probe

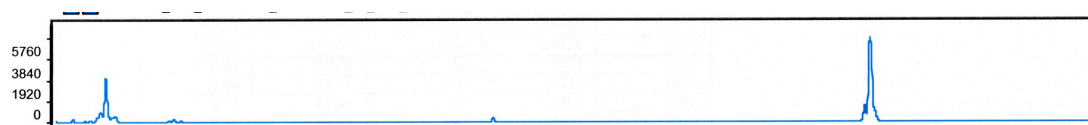
Die Sequenzierung einer in SNP309 homozygoten Probe kann zwei verschiedene Ergebnisse erbringen:

1.) Einerseits kann der homozygote Genotyp TT in SNP309 vorliegen:



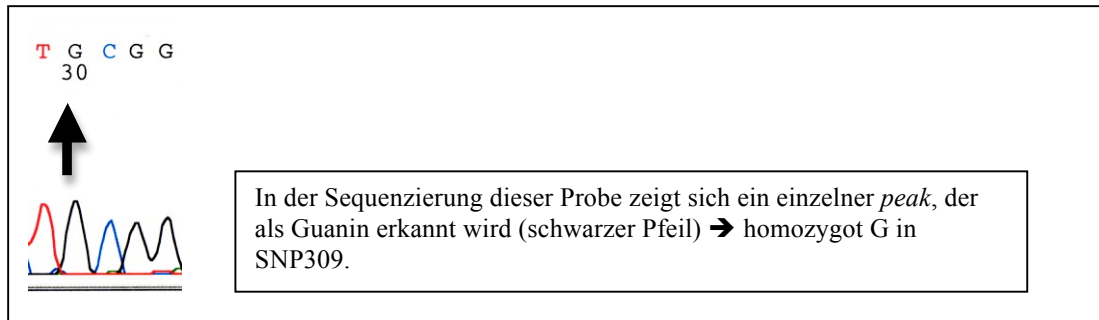
**B C.3.** Beispiel für TT SNP309 in der Sequenzierung

In der RFLP-Analyse (**B C.4.**) zeigt sich ein einzelner *peak* bei etwa 157bp. Dies spricht für eine homozygote Präsentation in SNP309:



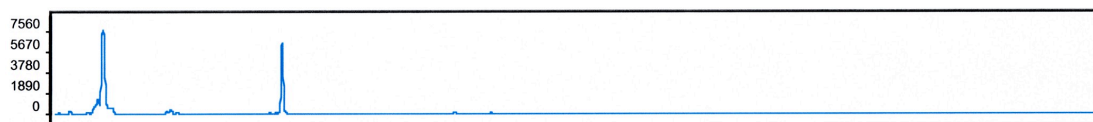
**B C.4.** RFLP-Analyse für TT SNP309 (vgl. auch Material und Methoden-Teil)

2.) Andererseits kann der homozygote Genotyp GG SNP309 vorliegen:



**B C.5.** Beispiel für GG SNP309 in der DNA-Sequenzierung

In der RFLP-Analyse (**B C.6.**) zeigt sich ein einzelner *peak* bei etwa 51bp. Dies spricht für eine homozygote Präsentation in SNP309:

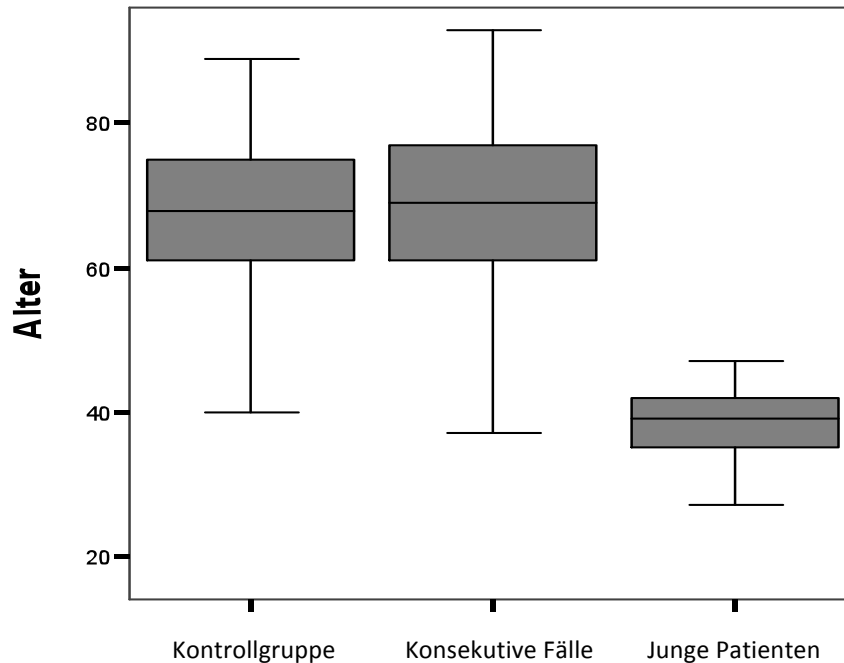


**B C.6.** RFLP-Analyse für GG SNP309 (vgl. auch Material und Methoden-Teil)

Zusammenfassend lässt sich festhalten: Die RFLP-Analyse lieferte mit der Sequenzierung übereinstimmende Ergebnisse.

## 2. Altersverteilung und Verteilung der Tumorstadien in den drei untersuchten Gruppen

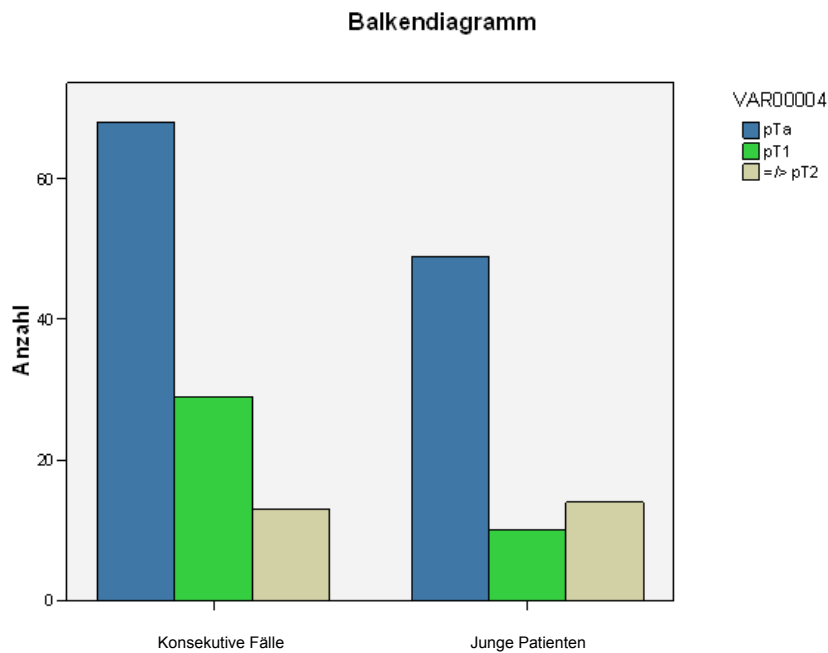
Vergleicht man das Alter der Gruppe der *Konsekutiven Fälle* und der *Jungen Patienten* mit dem der *Kontrollgruppe*, so zeigt sich dieser graphische Zusammenhang (**B C.7.**):



**B C.7.** Altersverteilung in den drei untersuchten Gruppen

In der Grafik (**B C.7.**) deutlich zu erkennen ist, dass sich *Konsekutive Fälle* und *Kontrollgruppe* im Median annähern: das durchschnittliche Alter der Gruppe der *Konsekutiven Fälle* entspricht dem der *Kontrollgruppe*. Im Mann-Whitney-U-Test:  $p=0,458$ , d.h. es besteht *kein* signifikanter Unterschied zwischen dem Alter der Patienten in der Gruppe der *Konsekutiven Fälle* und der *Kontrollgruppe*. Deutlich zu erkennen ist weiterhin, dass das Alter der *Jungen Patienten* unter 45 Jahren liegt.

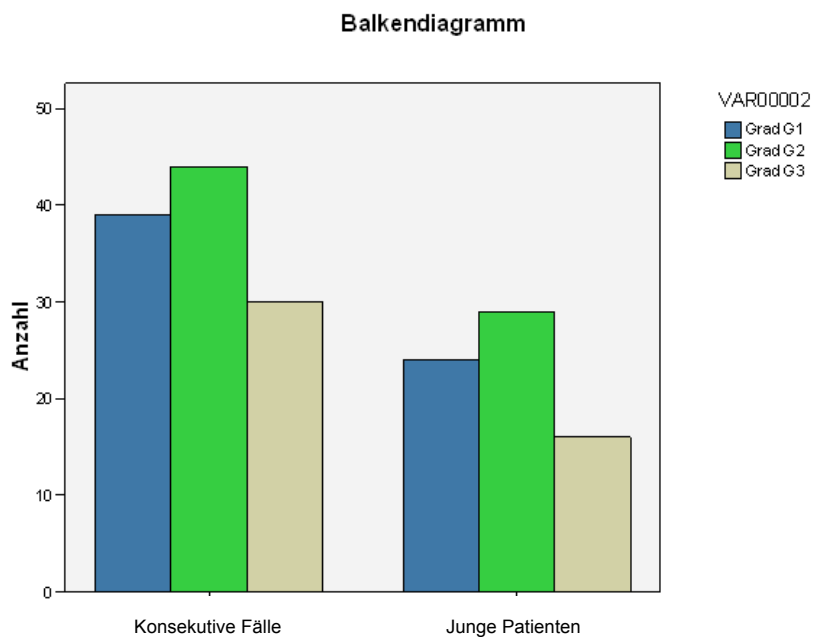
Auch die Verteilung der Tumorstadien (**B C.8.**) in beiden Tumorgruppen (*Konsekutive Fälle* und *Junge Patienten*) wurden untersucht und es zeigte sich in ihrer Verteilung *kein* signifikanter Unterschied (Exakter Test nach Fischer:  $p=0,076$ ).



**B C.8.** Verteilung der Tumorstadien in den beiden Tumorgruppen

Im Weiteren wurde die Verteilung von MDM2 SNP309 in Bezug auf Grading (G1, G2, G3) der Tumoren in den einzelnen Gruppen untersucht (**B C.9.**).

Auch hier zeigte sich *keine* signifikante Häufung einer Variante in einer der Gruppen (Exakter Test nach Fischer:  $p=0,889$ ).



**B C. 9.** Verteilung MDM2 SNP309 in Bezug auf das Grading in beiden Tumorgruppen

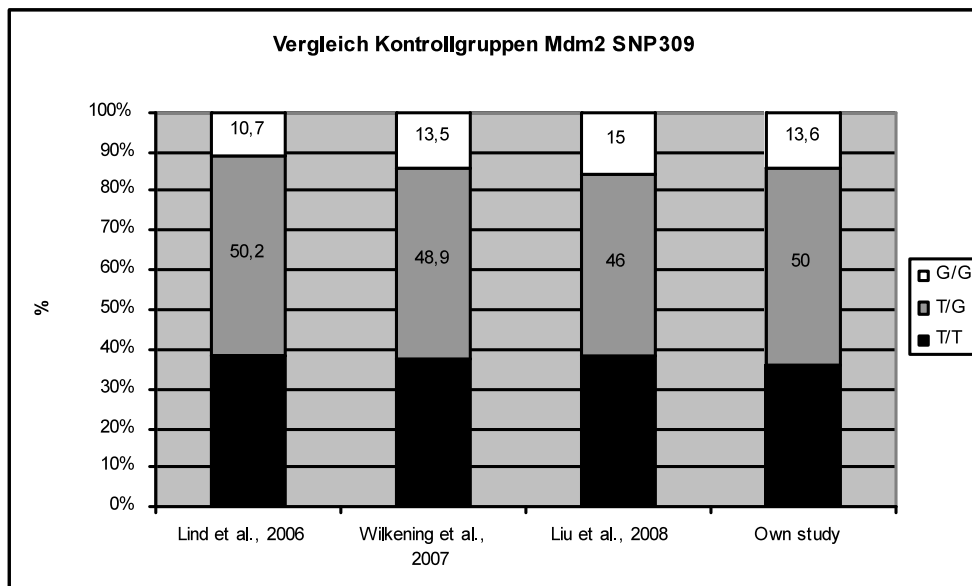
Diese Daten zeigen, dass die Kollektive miteinander vergleichbar sind, da sich die beiden Gruppen hinsichtlich der histopathologischen Charakteristika nicht signifikant unterscheiden.

### 3. Kontrollgruppe

<i>Kontrollgruppe</i>			
<b>MDM2 SNP 309</b>	<b>TT</b> (Anzahl Patienten/ in Prozent)	<b>TG (heterozygot)</b> (Anzahl Patienten/ in Prozent)	<b>GG</b> (Anzahl Patienten/ in Prozent)
Anzahl der Patientendaten / in Prozent	<b>51 / 36,4%</b>	<b>70 / 50%</b>	<b>19 / 13,6%</b>
Angabe in Anzahl der auswertbaren Patientendaten			

**Tab. C.1.** Verteilung von SNP309 in der Kontrollgruppe

Die Daten aus unserer Kontrollgruppe wurden mit Kontrollgruppen aus der Literatur verglichen. Dabei zeigte sich eine den Daten der Literatur entsprechende Verteilung. Dies wird in folgender Abbildung (**B C.10**) deutlich:



**B C.10.** Vergleich der Kontrollgruppen MDM2 SNP 309 aus der Literatur mit der eigenen Untersuchung

Dabei zeigt sich eine Verteilung (**B C.10.**), die recht gut den Ergebnissen in der Literatur entspricht. Somit kann die Zusammensetzung der in dieser Arbeit verwendeten Kontrollgruppe als repräsentativ für die kaukasische Bevölkerung angesehen werden.

Die Geschlechterverteilung in der Kontrollgruppe, soweit bekannt:

<u>Kontrollgruppe – Verteilung Geschlecht</u>			
<b>MDM2 SNP309</b>	<b>TT</b>	<b>TG</b>	<b>GG</b>
Anzahl der weiblichen Patienten / in Prozent*	4 / 6,9%	6 / 6,9%	2 3,4%
Anzahl der männlichen Patienten / in Prozent*	44 / 16,1%	60 / 21,9%	16 / 5,8%

\* bezogen auf die Gesamtzahl (58 Frauen, 274 Männer) aller untersuchten Patienten, bei denen das Geschlecht bekannt war

**Tab C. 2.** Verteilung der Geschlechter in der Kontrollgruppe

#### 4. Tumorgruppen: Junge Patienten und Konsekutive Fälle

In den folgenden Tabellen sind die gesamten Ergebnisse der Analyse des SNP309 in MDM2 zusammengefasst. Es erfolgte eine Aufgliederung nach Tumorstadium und Grading, abhängig vom gemessenen Genotyp des SNP309.

Dabei zeigen sich für die Gruppe der *Jungen Patienten* folgende Ergebnisse:

<u>Junge Patienten</u> (Patienten mit Urothelkarzinom vor dem 45. Lebensjahr)					
<b>Tumorstadium</b>	<b>SNP 309 MDM2</b>				
	<b>TT</b>	<b>TG</b>	<b>GG</b>	<b>(TG+GG)</b>	<b>insgesamt</b>
<b>pTa</b>	<b>18</b>	<b>21</b>	<b>10</b>	(31)	<b>49</b>
<b>pT1</b>	<b>1</b>	<b>7</b>	<b>2</b>	(9)	<b>10</b>
<b>≥ pT2</b>	<b>4</b>	<b>10</b>	<b>0</b>	(10)	<b>14</b>
<b>unbekannt</b>	<b>12</b>	<b>12</b>	<b>14</b>	(26)	<b>38</b>
<b>insgesamt</b>	<b>35</b>	<b>50</b>	<b>26</b>	<b>(76)</b>	<b>111</b>
<b>Grading</b>					
<b>G1</b>	<b>8</b>	<b>9</b>	<b>7</b>	(16)	<b>24</b>
<b>G2</b>	<b>9</b>	<b>16</b>	<b>4</b>	(20)	<b>29</b>
<b>G3</b>	<b>5</b>	<b>10</b>	<b>1</b>	(11)	<b>16</b>
<b>unbekannt</b>	<b>13</b>	<b>15</b>	<b>14</b>	(29)	<b>42</b>
Angabe in Anzahl der auswertbaren Patientendaten					

**Tab C.3.** Aufteilung SNP309 in den *Jungen Patienten*

Für die Gruppe der *Konsekutiven Fälle* zeigte sich:

<u>Konsekutive Fälle</u> (Patienten mit Urothelkarzinom in „normalem“ Erkrankungsalter (ca 70J.))					
Tumorstadium	SNP 309 MDM2				
	TT	TG	GG	(TG+GG)	insgesamt
pTa	28	26	14	(40)	68
pT1	7	18	4	(22)	29
≥ pT2	3	6	4	(10)	13
unbekannt	2	1	0	(1)	3
<b>insgesamt</b>	<b>40</b>	<b>51</b>	<b>22</b>	<b>(73)</b>	<b>113</b>
<b>Grading</b>					
G1	17	16	6	(22)	39
G2	13	21	10	(31)	44
G3	10	14	6	(20)	30
unbekannt	0	0	0	(0)	0

Angabe in Anzahl der auswertbaren Patientendaten

Tab C.4. Aufteilung von SNP309 in den *Konsekutiven Fällen*

Für die Geschlechterverteilung in den Tumorgruppen gilt, soweit bekannt:

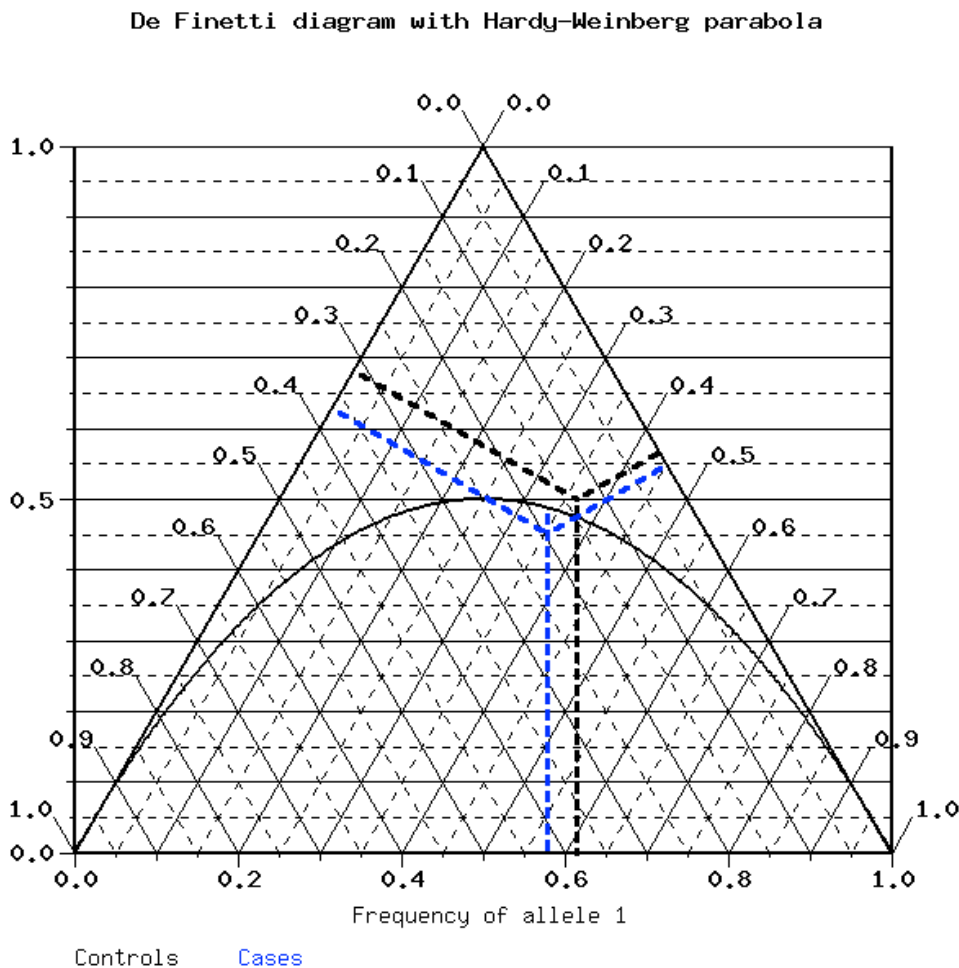
<u>Tumorgruppen – Verteilung Geschlechter</u>				
MDM2 SNP309		TT	TG	GG
Junge Patienten	Anzahl der weiblichen Patienten / in Prozent*	14 / 24,1%	7 / 12,1%	3 / 5,2%
	Anzahl der männlichen Patienten / in Prozent*	18 / 6,6%	34 / 12,4%	12 / 4,4%
Konsekutive Fälle	Anzahl der weiblichen Patienten / in Prozent*	8 / 13,8%	9 / 15,5%	5 / 8,6%
	Anzahl der männlichen Patienten / in Prozent*	31 / 11,3%	42 / 15,3%	17 / 6,2%

\* bezogen auf die Gesamtzahl (58 Frauen, 274 Männer) aller untersuchten Patienten, bei denen das Geschlecht bekannt war

Tab C.5. Geschlechterverteilung in den Tumorgruppen

## 5. Hardy-Weinberg Gleichgewicht

Die Überprüfung der Gruppen im Hardy-Weinberg Gleichgewicht kam zu folgendem Ergebnis:



### B C. 11. Hardy-Weinberg Gleichgewicht der untersuchten Gruppen

Dabei zeigt sich für die einzelnen Gruppen:

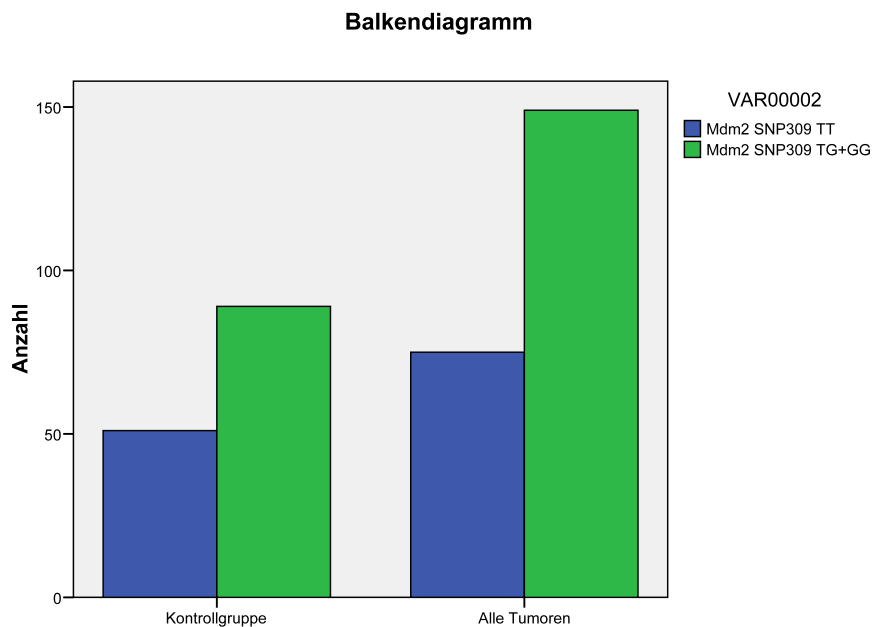
Bei der *Kontrollgruppe* ein p-Wert von 0,594 (nach Elston & Forthofer, 1977), bei den *Konsekutiven Fällen* ein p-Wert = 0,443 und bei den *Jungen Patienten* ein p-Wert = 0.443.

Somit kann davon ausgegangen werden, dass die Verteilung der Genotypen im Hardy-Weinberg-Gleichgewicht liegt.

## 6. Ergebnisse der statistischen Auswertung

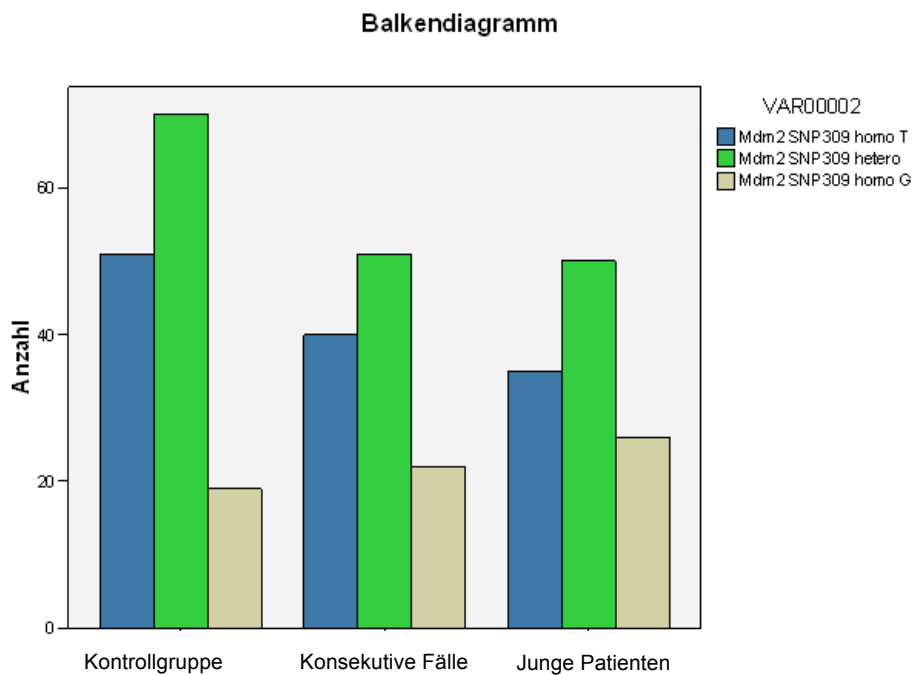
6.1. SNP309 nimmt keinen Einfluss auf das Risiko, an einem Urothelkarzinom zu erkranken.

Die G Variante in MDM2 SNP309 (ob homozygot mit dem Genotyp GG oder heterozygot mit TG) bringt *kein* erhöhtes Gesamtrisiko mit sich, an einem Harnblasenkarzinom zu erkranken. (**B C.12.**; Exakter Test nach Fischer:  $p=0,573$ . Die Odds Ratio [OR] beträgt 1,138 mit einem 95% Konfidenzintervall [95% CI]: 0,732-1,771.) Für diese Aussage wurden beide Tumorgruppen (also *Junge Patienten* und *Konsequente Fälle*) zusammengefasst.



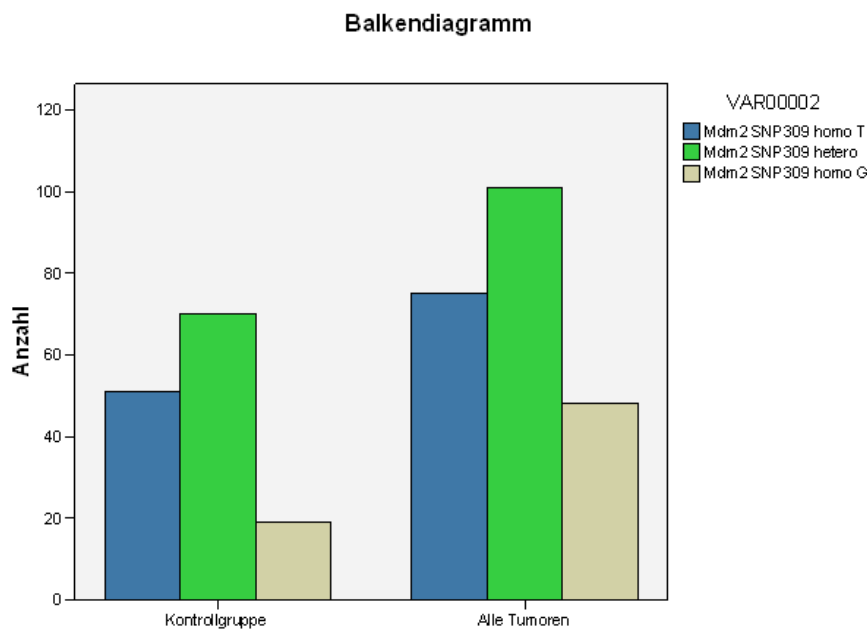
**B C.12.** Erkrankungsrisiko für alle Tumoren im Vergleich zur Kontrollgruppe

Betrachtet man die Verteilung des Genotyps von SNP309 in den drei einzelnen Gruppen getrennt, so ergibt sich auch hier *kein* signifikanter Unterschied (**B C.13.**). Dies gilt insbesondere auch für die *Jungen Patienten*. Es kann *nicht* behauptet werden, dass die G SNP 309 Variante (sowohl heterozygot GT als auch homozygot GG) in *Jungen Patienten* gehäuft auftritt. (Chi Quadrat nach Pearson:  $p=0,371$ .)



**B C.13.** Verteilung des Genotyps von MDM2 SNP309 in den drei Gruppen

Betrachtet man nun die Verteilung der einzelnen Genotypen (TT und GT und GG gesondert) von SNP309 in der Kontrollgruppe und der großen Gruppe aller Tumoren (also wieder *Konsekutive Fälle* und *Junge Patienten* zusammen, ohne Berücksichtigung des Alters), so zeigt sich auch hier, dass es *keinen* signifikanten Unterschied in der Verteilung gibt (**B C.14.;** Exakter Test nach Fischer:  $p=0,173$ ). Es kann also *nicht* von einer Häufung einer SNP 309 Variante (TT oder TG oder GG) in MDM2 bei Patienten mit Harnblasenkarzinom ausgegangen werden.



**B C.14.** Verteilung der Genotypen von MDM2 SNP309 in der Kontrollgruppe und der Gruppe aller Tumoren

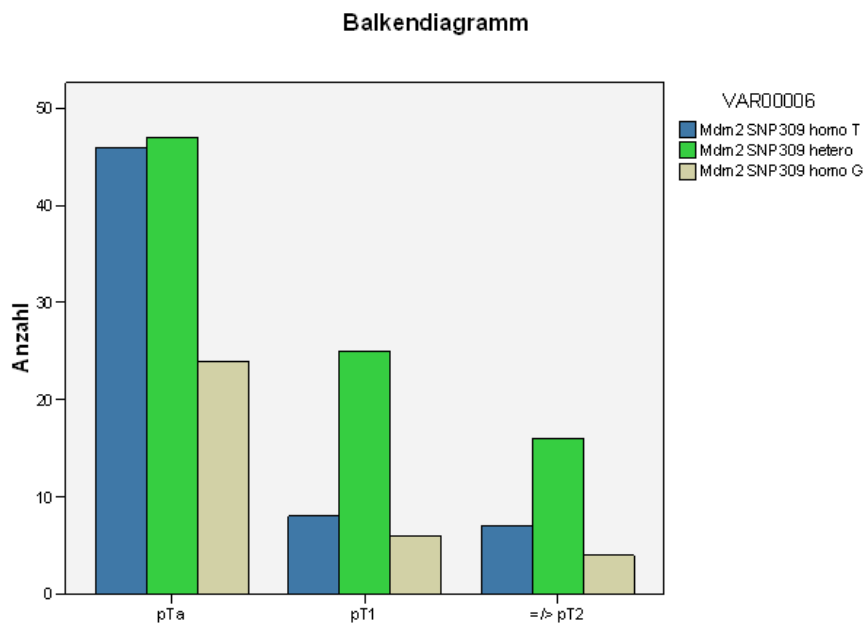
Zusammenfassend lässt sich also hiermit sagen, dass es bei den Tumorgruppen zu keiner signifikanten Häufung einer der Varianten des SNP309 in MDM2 (TT oder GT oder GG) kommt. Die Verteilung des Genotyps ist also in den drei Gruppen nicht signifikant unterschiedlich. Es ist also davon auszugehen, dass der SNP309 in MDM2 in keinem signifikanten Zusammenhang mit dem Risiko, an einem Urothelkarzinom zu erkranken, steht.

### 6.2. Signifikante Häufung von SNP309 G bei invasiven Tumoren.

Im Weiteren wurden die Tumorstadien im Bezug auf MDM2 SNP309 untersucht. Hierzu wurden für die Berechnungen immer beide Tumorgruppen zusammengefasst (*Konsequitive Fälle* und *Junge Patienten* zusammen entsprechen der Gruppe aller Tumoren).

Folgende Ergebnisse wurden gefunden:

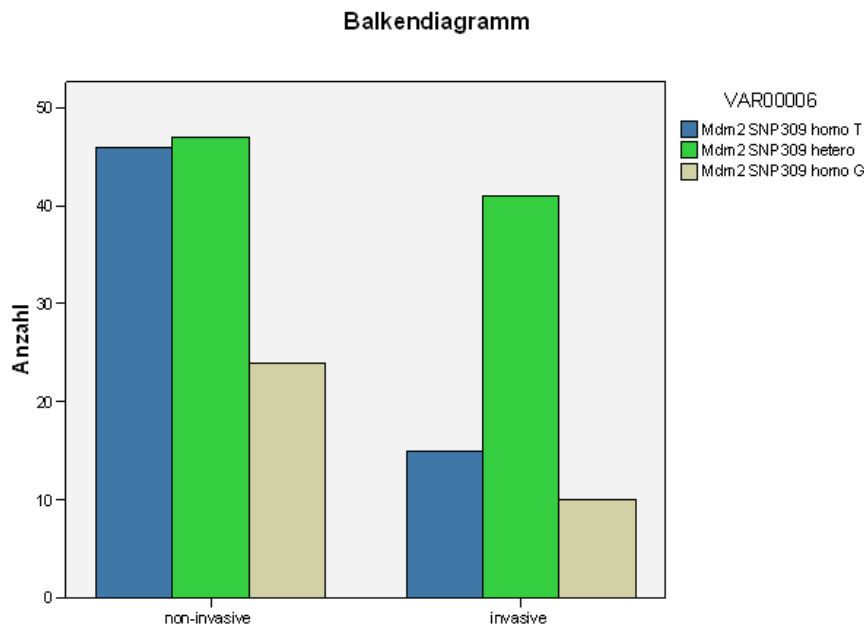
Die Verteilung von SNP309 bezüglich der einzelnen Tumorstadien (pTa vs. pT1 vs. pT2) aller Tumoren zeigt keine signifikanten Unterschiede (**B C.15.**; Chi-Quadrat nach Pearson:  $p=0,071$ ).



**B C. 15.** SNP Verteilung bezüglich Tumorstadium aller Tumoren (Junge Patienten + Konsekutive Fälle)

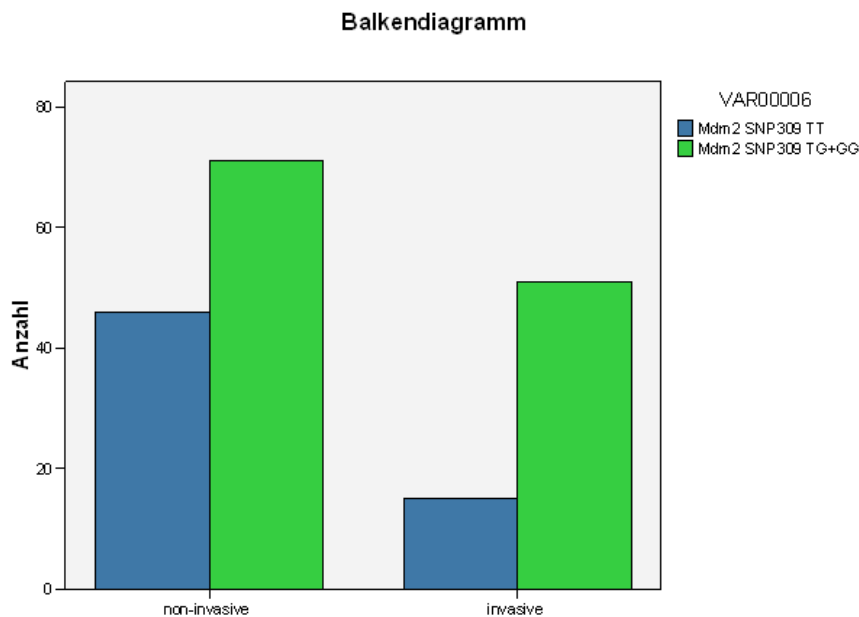
Der Wert des Chi-Quadrat Tests nach Pearson (und auch die oben abgebildete Grafik) zeigt allerdings hier schon eine Tendenz zu 0,05.

Vergleicht man die Genotypen von SNP309 – also homozygot GG und TT sowie heterozygot TG - zwischen invasiven ( $pT \geq 1$ ) und nicht-invasiven Tumoren (pTa), so zeigt sich hier *ein* signifikanter Unterschied (**B C.16.**; Exakter Test nach Fischer:  $p=0,016$ ). Die TG Variante in MDM2 SNP309 zeigt sich gehäuft in den *invasiven* Tumorstadien ( $T \geq 1$ ).



**B C.16.** Vergleich SNP309 invasive und nicht-invasive Tumoren

Diese Beobachtung zeigt sich ebenfalls, wenn man die G Varianten in MDM2 SNP309 betrachtet (also TG und GG zusammen; **B C.17.**). Bei invasiven Tumoren ( $T \geq 1$ ) liegt im Vergleich zu nicht-invasiven Tumoren *wieder eine* Häufung der G SNP 309 Variante (GT und GG zusammen) vor. (Exakter Test nach Fischer:  $p=0,023$ ; OR: 2,203, 95% CI: 1,111-4,369).

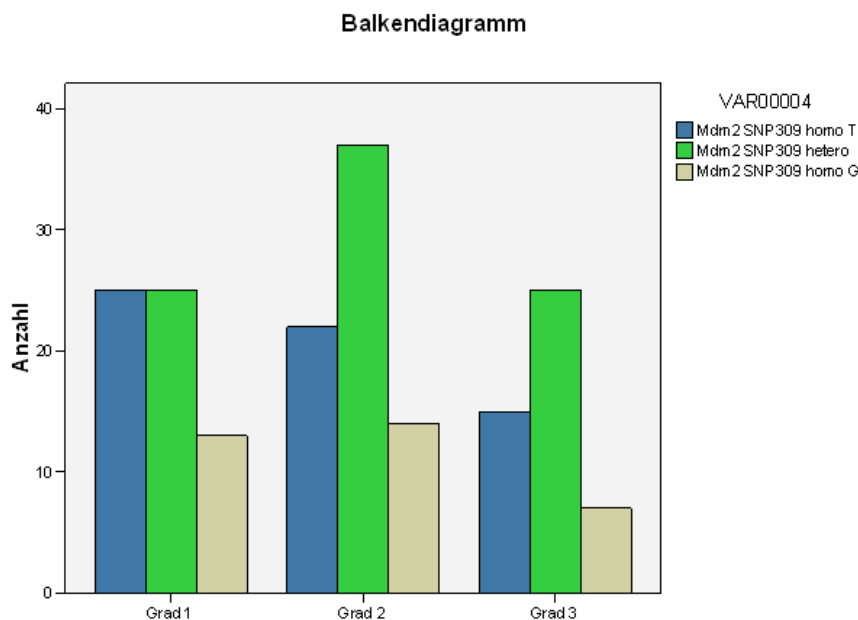


**B C.17.** Vergleich SNP 309: invasive ( $pT \geq 1$ ) vs. nicht-invasive ( $pTa$ ) Tumoren

Zusammenfassend lässt sich also festhalten, dass der SNP309 G in MDM2 *einen* signifikanten Einfluss auf das Tumorstadium nimmt. Bei invasiv-wachsenden Tumoren ist eine statistische Häufung der G Variante des SNP309 zu beobachten.

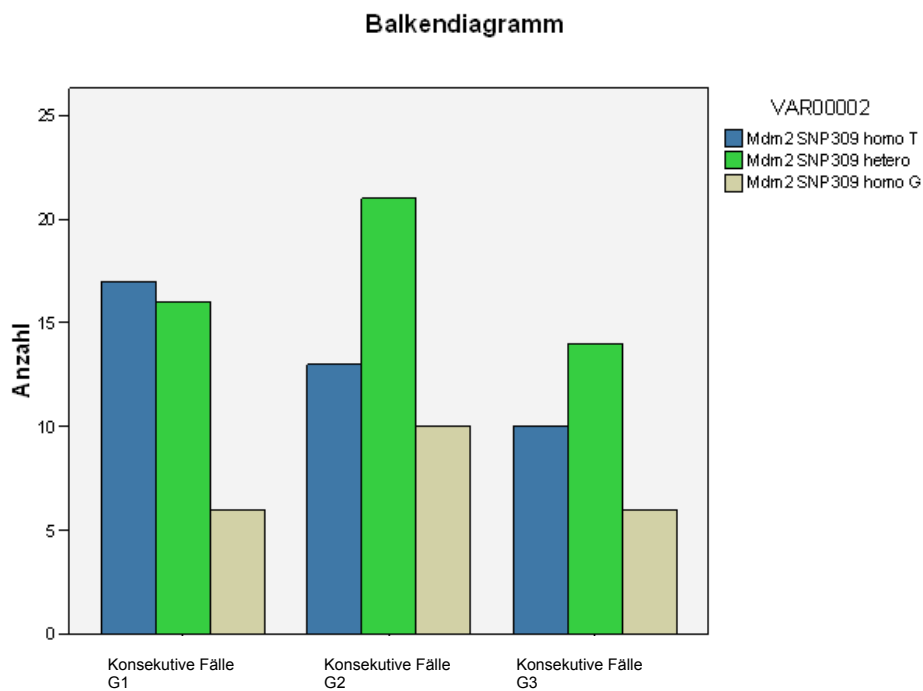
### 6. 3. Kein Einfluss von SNP309 auf Differenzierung (Grading) von Urothelkarzinomen

Betrachtet man zunächst die Verteilung von MDM2 SNP309 in Bezug auf das Grading in der großen Gruppe aller Tumoren (also *Junge Patienten* und *Konsekutive Fälle* gemeinsam, ohne Bezug auf das Alter), so zeigt sich hier *keine* signifikante Häufung einer Variante. (**B C.18.**; Chi-Quadrat nach Pearson:  $p=0,604$ )



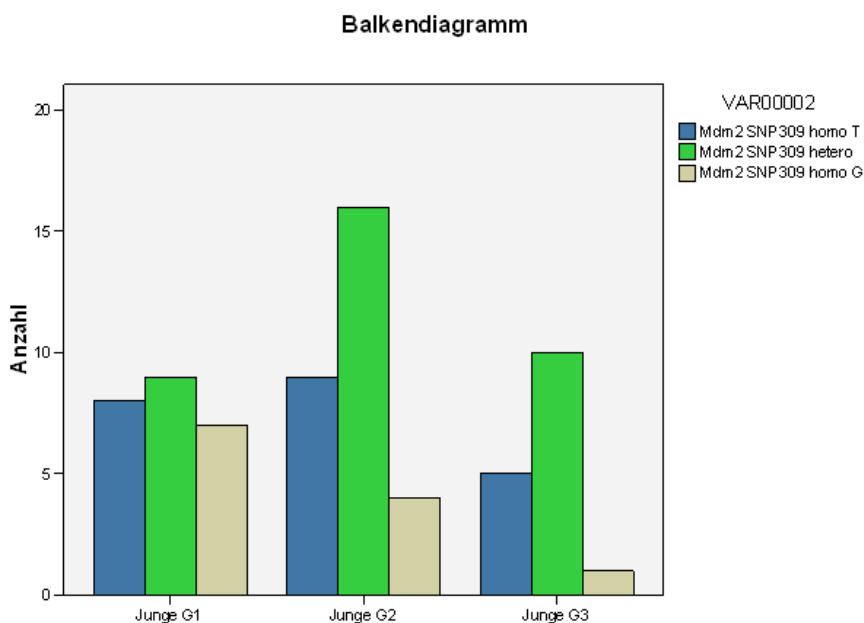
**B C. 18.** Verteilung MDM2 SNP309 in Bezug auf Grading bei allen Tumoren

In der Gruppe der *Konsekutiven Fälle* (also in der Tumorgruppe derer, die im normalen Alter an Harnblasenkarzinom erkranken) findet sich ebenfalls *keine* signifikante Häufung einer Variante von MDM2 SNP309 (**B C.19.**; Chi-Quadrat nach Pearson:  $p=0,743$ ).



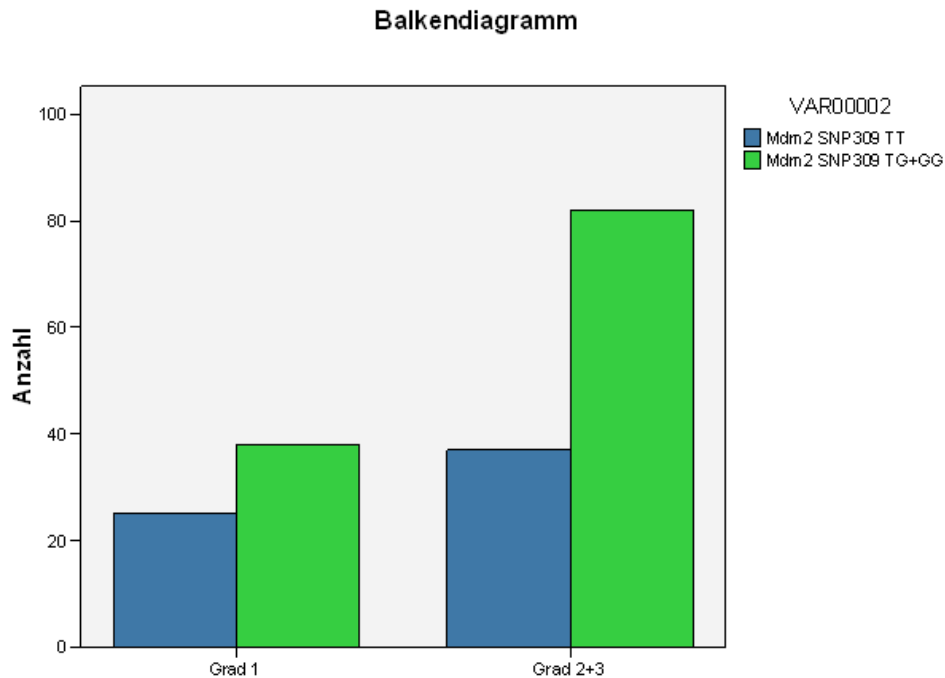
**B C.19.** *Konsequente Fälle:* Verteilung MDM2 SNP309 in Bezug auf das Grading

Das gleiche Ergebnis zeigt sich auch, wenn man das Grading in der Gruppe der Jungen Patienten in Bezug zur Verteilung des Genotyps in MDM2 SNP309 setzt. Auch hier ist *keine* signifikante Häufung zu erkennen (**B C.20.**; Chi-Quadrat nach Pearson:  $p=0,330$ ).



**B C.20.** *Junge Patienten:* Verteilung MDM2 SNP309 in Bezug auf das Grading

Schließlich fand sich auch, dass das Vorkommen zumindest einer G Variante (also GG oder TG) die Differenzierung von Harnblasenkarzinomen nicht beeinflusst Exakter Test nach Fischer:  $p=0,225$ ; OR 1,458; 95% CI 0,771-2,756).

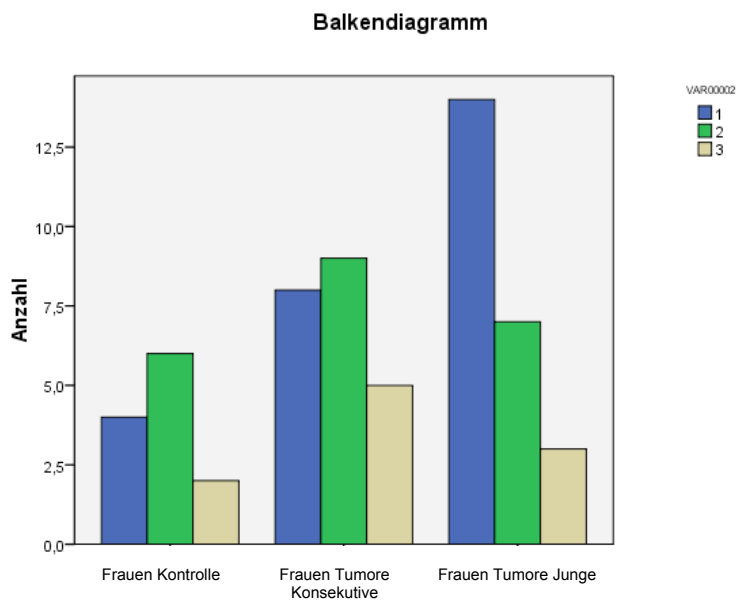


**B C. 21.** Verteilung MDM2 in Bezug auf G1 und G2+3 bei allen Tumoren

Zusammenfassend lässt sich also sagen, dass nach den vorliegenden statistischen Berechnungen MDM2 SNP309 *keinen* Einfluss auf die Differenzierung / das Grading von Urothelkarzinomen nimmt. Dies gilt sowohl für die Gruppe der Patienten im normalen Erkrankungsalter (*Konsekutive Fälle*), wie auch für die *Jungen Patienten* (Tumor vor dem 45 Lebensjahr).

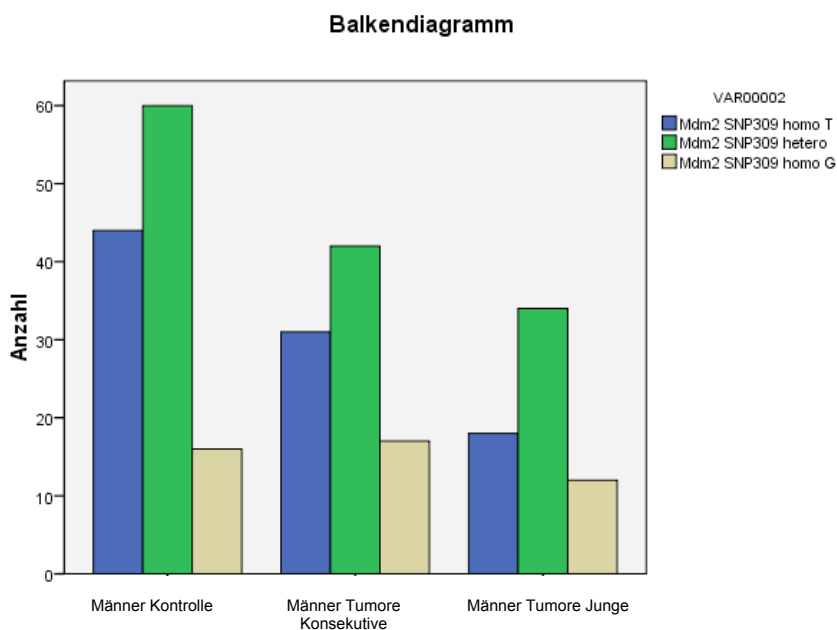
#### 6.4. Kein Zusammenhang zwischen Geschlecht der Patienten und dem Auftreten von SNP309

Untersucht man nur die weiblichen Patienten aus allen drei Gruppen, so zeigt sich hier *keine* signifikante Häufung einer Variante des SNP309 in MDM2 (**B C.22.**; Chi-Quadrat nach Pearson = 0,521).



**B C.22.** Verteilung von SNP309 in MDM2 in Bezug auf das weibliche Geschlecht

Gleiches gilt für die männlichen Patienten in allen drei Gruppen: auch hier ist keine Variante von SNP309 signifikant gehäuft in einer der Gruppen zu finden (**B C.23.**; Chi-Quadrat nach Pearson = 0,625).

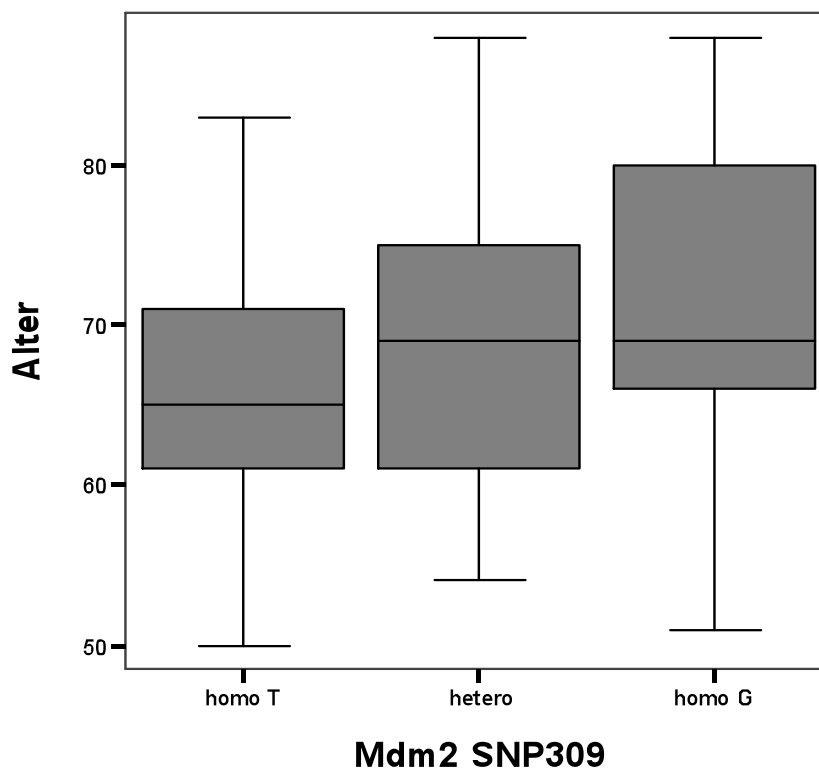


**B C.23.** Verteilung von SNP309 in MDM2 in Bezug auf das männliche Geschlecht

Zusammenfassend lässt sich also sagen, dass die Verteilung von SNP309 in den einzelnen Gruppen statistisch unabhängig vom Geschlecht war.

### 6.5. Keine Assoziation zwischen der G Variante in SNP309 und dem Erkrankungsalter bei nicht-invasiven Tumoren

In einer Arbeit von Sanchez-Carbayo et al, die 2007 publiziert wurde, und eine sehr ähnliche Fragestellung untersuchte wie diese Arbeit, zeigte sich, dass bei papillären, nicht-invasiven Urothelblasenkarzinomen (pTa) mit dem Genotyp GG in MDM2 SNP309 das Erkrankungsalter niedriger war als bei der Vergleichsgruppe. Für die in dieser Arbeit gewonnenen Daten zeigt sich dieser Zusammenhang jedoch nicht (B C.24.; Kruskal-Wallis:  $p=0,362$ ).



**B C.24.** Erkrankungsalter bei Ta Urothelkarzinomen in Bezug auf MDM2 SNP309

Der homozygote G Genotyp ist für die in dieser Arbeit publizierten Daten *nicht* mit einem *early onset* der papillären, nicht-invasiven Urothelkarzinomen verbunden.

## D. DISKUSSION

Seit der Entdeckung des Single Nucleotid Polymorphismus 309 in MDM2 im Jahre 2004 durch Bond et al ist dieser von mehreren Arbeitsgruppen intensiv beforscht worden (vgl. auch EINLEITUNG).

MDM2 spielt eine entscheidende Rolle als negativer Regulator im Regelkreis von p53 und sein Zusammenhang mit verschiedenen Karzinomen ist bereits dokumentiert.

Ziel dieser Arbeit war es, den Einfluss von SNP309 MDM2 auf die Tumorgenese, den Zeitpunkt des Auftretens, die Tumorstadien und die Differenzierung des Urothelkarzinoms aufzuzeigen, insbesondere auch bei jungen Patienten mit einem Erkrankungsalter unter 45 Jahren. Ferner sollte ermittelt werden, ob sich SNP309 bei einem der beiden Geschlechter gehäuft findet. Dabei scheint SNP309 bei Betrachtung der in dieser Arbeit gewonnen Daten nur einen Einfluss auf das *Tumorstadium* zu nehmen (und somit bei invasiv-wachsenden Tumoren eine Rolle zu spielen).

Dass der Effekt von SNP309 vor allem bei den invasiv-wachsenden Tumoren zu Tage tritt, ist durchaus konsistent mit dem derzeitigen Verständnis der Pathogenese des Urothelkarzinoms.

Wie in der EINLEITUNG schon angesprochen, sind vor allem muskel-invasive Tumore mit p53 Mutationen verknüpft. So findet sich bei diesen Tumoren oft eine Überexpression von p53, die auf Mutationen zurückzuführen ist (Smith et al, 2003).

Nach dem allgemeinen Verständnis ist das G-Allel in SNP309 mit erhöhten Spiegeln von MDM2 vergesellschaftet, was wiederum zu einer Hemmung von P53 führt (Bond et al, 2004) und somit die Karzinogenese begünstigen kann. Möglicherweise ist dieser Effekt bei muskel-invasiven Tumoren ausgeprägter als bei nicht-invasiven Tumoren, die hauptsächlich über andere molekularpathologische Veränderungen getriggert werden.

Zum Einfluss von SNP309 oder einer Überexpression von MDM2 auf das Urothelkarzinom finden sich bereits andere Publikationen in der Literatur:

Sanchez-Carbayo et al untersuchten im Jahre 2007 wie die vorliegende Arbeit ebenfalls den Einfluss von SNP309 bei 141 Patienten mit Urothelkarzinom. Dabei zeigte sich in Bezug auf

SNP309 wie in den hier dargestellten Daten keine signifikante Erhöhung des Risikos an einem Urothelkarzinom zu erkranken. Damit ist – in Übereinstimmung mit den in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnissen – davon auszugehen, dass der Genotyp in SNP309 tatsächlich auf das Erkrankungsrisiko *keinen* Einfluss nimmt.

So beobachtet die Studie von Sanchez-Carbayo et al weiterhin *keine* signifikante Beziehung zwischen Tumorstadium und SNP309, wobei nach Angabe der Autoren viele Patienten mit Genotyp GG und TG in SNP309 invasivere Tumoren hatten (jedoch nicht signifikant). Dennoch gehen auch Sanchez-Carbayo in ihrer Publikation von einem Zusammenhang zwischen SNP309 und der Invasivität des Tumors aus.

Diesbezüglich konnte in den eigenen Daten eine signifikante Häufung der G Variante in SNP309 bei Patienten mit invasiv-wachsenden Tumoren gezeigt werden.

Die Aussage von Sanchez-Carbayo et al hingegen, wonach Patienten mit dem Genotyp GG früher papilläre Tumoren (pTa) entwickeln als Patienten mit Genotyp TT konnte in dieser Arbeit *nicht* bestätigt werden – für die hier aufgeführten Daten existiert dieser Zusammenhang nicht, wie weiter oben dargestellt (unter ERGEBNISSE).

Die in beiden Studien untersuchten Gruppen waren eher klein (Sanchez-Carbayo et al: 141 Patienten; eigene Studie: 224 Patienten mit Tumoren untersucht), deshalb wird sich eine Auflösung dieser Widersprüchlichkeit erst ergeben, wenn man größere Gruppen untersuchen kann.

Horikawa et al konnten 2008 zeigen, dass für die japanische Bevölkerung keine Assoziation zwischen SNP309 und dem Erkrankungsrisiko für das Urothelkarzinom besteht. Soweit auch konsistent mit den eigenen Daten aus einer kaukasischen Populationskohorte.

Zugleich fanden die Autoren jedoch bei homozygoten TT SNP309 Trägern ein längeres rezidivfreies Intervall. Dieser Zusammenhang war jedoch nicht signifikant ( $p=0,0749$ ). Die Schlussfolgerung hieraus war, dass die G Variante möglicherweise mit einem aggressiveren Wachstum des Tumors assoziiert sein könnte – ein Zusammengang, der die Daten dieser Arbeit stützt: auch hier sind der Variante G (also Genotyp GG oder GT in SNP309) mit einem invasiven Wachstum des Urothelkarzinoms signifikant assoziiert.

Zu einem ähnlichen Ergebnis kommen Gönül et al (2008): zwar war in der untersuchten Gruppe (türkische Bevölkerung, 87 Patienten) bei *high grade* Urotheltumoren eine erhöhte MDM2-Expression nachweisbar, diese war jedoch nicht signifikant. So zeigten Tumoren mit

Lamina propria Infiltration eine erhöhte Expression von MDM2 im Vergleich zu nicht-invasiven Tumoren (Ta).

In den in dieser Arbeit dargestellten Daten findet sich – im Gegensatz zu der Studie von Gönül et al – eine Signifikanz bei invasiv-wachsenden Tumoren und der G Variante in SNP309 – jenem Polymorphismus, der für eine erhöhte MDM2-Spiegel verantwortlich gemacht wird. Dies ist auch insofern passend, als gerade der p53 Regelkreis mit den invasiv-wachsenden (hochmalignen) Tumoren eng verknüpft ist (siehe EINLEITUNG), denn Mutationen in p53 finden sich gehäuft bei invasiv-wachsenden Tumoren (Smith et al, 2003).

Der Zusammenhang zwischen der Expression von MDM2 und invasiv-wachsenden Tumoren ist bei Gönül et al nicht signifikant; so kommt der Autor zu der Schlussfolgerung, dass die MDM2 Expression beim Urothelkarzinom als Progressionsmarker wohl keine Rolle spielt.

Hier wird möglicherweise eine Neuevaluation notwendig sein, wobei jedoch anzumerken ist, dass in der Studie von Gönül et al und in der hier beschriebenen Arbeit zwei unterschiedliche Zusammenhänge untersucht wurden: Gönül et al untersuchten die Expression von MDM2 (anhand immunhistochemischer Färbungen), in den eigenen Daten wurde der Genotyp in SNP309 untersucht, welcher nach der gängigen Hypothese mit erhöhten MDM2 Spiegel vergesellschaftet ist.

Insofern sind die Ergebnisse beider Studien nur unter Vorbehalt vergleichbar.

Ebenfalls mit der Expression von MDM2 in Urothelkarzinomen beschäftigten sich Tuna et al 2003: Die Autoren kommen zu der Schlussfolgerung, dass MDM2 und p53 wertvolle Parameter sind, um ein mögliches Rezidiv eines Urothelkarzinoms vorherzusagen (80 Patienten untersucht). Die Autoren fanden heraus, dass vor allem bei Patienten mit Rezidivtumoren und *high grade* Tumoren eine niedrige MDM2 Expression gemessen wird und gehen deshalb davon aus, dass die Expression von MDM2 ein frühes Ereignis in der Entstehung von Urothelkarzinomen ist. Dies ist den in dieser Arbeit gewonnenen Daten schwer vergleichbar (da hier nicht die Expression von MDM2, sondern der SNP309 untersucht wurde) und auch nicht konsistent mit den Daten von Gönül et al, 2008.

Shinohara et al untersuchten 2009 den Zusammenhang zwischen SNP309 in MDM2 und dem codon27 in TP53 und Radiochemotherapie (RCT) beim Urothelkarzinom. Es fand sich kein Zusammenhang zwischen Ansprechen der RCT und dem SNP, jedoch zeigten Träger der G-Variante in SNP309 (Genotyp GG und GT) ein höheres krankheitsspezifisches Überleben nach RCT. Die Autoren mutmaßen, dass der Effekt auf einer verminderten p53-abhängigen

DNA-Reparaturkapazität beruht. Dieser Artikel stützt zudem die Bedeutung von SNP309 in der Prognoseeinschätzung beim Urothelkarzinom.

Erwähnenswert in diesem Zusammenhang ist noch eine weitere Studie über SNP309 in MDM2 und seinen Einfluss auf das Urothelkarzinom: So zeigen in der Untersuchung von Onat et al, 2006 homozygote Träger der G-Variante in SNP309 ein erhöhtes Risiko, an einem Harnblasenkarzinom zu erkranken.

Wie jedoch beschrieben (Hu et al, 2007, s.u.) scheint die Ethnie durchaus einen Einfluss auf die Verteilung des Genotyps in SNP309 zu nehmen – vielleicht lässt sich so die Abweichung der von Onat et al aufgestellten Daten erklären, die eine türkische Population untersuchten.

Dies ist zudem für Patienten mit Urothelkarzinom die einzige Studie, die eine positive Korrelation zwischen SNP309 und einem erhöhten Erkrankungsrisiko zeigen konnte.

Dies macht umso mehr deutlich, dass eine definitive Aussage über den Zusammenhang zwischen SNP309 in MDM2 und dem Urothelkarzinom nur in großen Vergleichsstudien möglich sein wird – und unter Berücksichtigung der Bevölkerungsgruppen.

Die bereits in der Einleitung erwähnte These, wonach die Östrogenspiegel einen entscheidenden Einfluss auf die MDM2-Wirkung besitzen, konnte in dieser Arbeit nicht nachvollzogen werden – es zeigte sich keine signifikante Häufung der G Variante in SNP309 bei weiblichen Patienten. Jedoch muss an dieser Stelle erwähnt werden, dass der Frauenanteil in den in dieser Arbeit untersuchten Gruppen sehr gering war; somit kann ein Einfluss nicht definitiv ausgeschlossen werden. Eine endgültige Aussage wird zu diesem Thema erst durch die Untersuchung größerer Gruppen möglich sein.

Der Östrogen-assoziierten MDM2-Wirkung widerspricht zudem eine Studie von Wilkening et al, Aug 2007: Für das Basalzellkarzinom der Haut fand sich ebenfalls kein Zusammenhang zwischen SNP309 und dem Erkrankungsrisiko, dem *early onset* und dem Geschlecht. Auch hier gilt somit, dass sich Daten, die für ein spezielles Karzinom gewonnen wurden, nicht auf andere übertragen lassen.

Es könnte also durchaus sein, dass der geschlechtsspezifische Effekt von MDM2 beim Urothelkarzinom nicht zu Tage tritt.

Dem gegenüber steht allerdings eine Publikation von McGrath et al, 2006: In einer epidemiologischen Studie wurden 336 Fälle von Urothelkarzinom in einer Kohorte über einen

Zeitraum von 26 Jahren untersucht. Es fand sich ein signifikanter Zusammenhang zwischen dem Risiko, an einem Harnblasenkarzinom zu erkranken und einer frühen Menopause (<45 Jahre).

Jedoch handelt es sich hier um eine epidemiologische Studie - molekulargenetische Zusammenhänge wurden nicht untersucht, insofern ist auch hier eine Einordnung der eigenen Daten schwierig.

In einer Metastudie von 2007 verglichen Hu et al 25 Studien zu MDM2 SNP309 miteinander. Dabei fand sich ein signifikant erhöhtes Risiko bei Patienten mit Genotyp GG SNP309 für Tumoren generell, im speziellen aber für das Lungenkarzinom und Tumoren, die mit Nikotinabusus assoziiert sind (wie auch das Urothelkarzinom). Dies wird vor allem damit erklärt, dass MDM2 ein entscheidender negativer Mediator von p53 ist – insbesondere, wenn das Tumorsuppressorgen durch zellulären Stress (wie z.B. Rauchen) bereits aktiviert ist: homozygote TT SNP309 Zellen haben bis zu 14-fach erhöhte P53 Spiegel unter Stress, wohingegen homozygote GG SNP309 Zellen nur eine etwa 3-fache Erhöhung zeigen (Bond et al, 2005). Hu et al fanden auch einen deutlichen Zusammenhang zwischen SNP309, dem Erkrankungsrisiko und der Ethnie: ein erhöhtes Risiko für die Entwicklung von Tumoren fand sich bei Asiaten, nicht jedoch bei Europäern und Afrikanern. Dies unterstreicht deutlich die Wichtigkeit der Ethnie bei der Interpretation der bisher publizierten Daten.

Die in dieser Arbeit vorgestellten Daten stammen von Patienten v.a. aus Deutschland und der Schweiz, insofern können die signifikanten Zusammenhänge auch nur auf die kaukasische Population angewandt werden.

Insgesamt kommt Hu et al zu dem Schluss, dass MDM2 SNP309 als „*low-penetrance susceptibility*“ Tumormarker bezeichnet werden kann – SNP309 hat einen Einfluss auf die Genese vieler Tumoren, dieser ist aber vermutlich weniger ausgeprägt als ursprünglich vermutet.

In einer weiteren Metastudie von Wilkening et al (Nov 2007) wurden 36 Studien miteinander verglichen: es fand sich lediglich ein (geringer) Einfluss von SNP309 auf das Lungenkarzinom: Patienten mit homozygotem GG Genotyp haben ein leicht erhöhtes Erkrankungsrisiko im Vergleich zu Patienten mit Genotyp TT. Dies gilt nicht für Patienten mit Kolonkarzinom oder Mammakarzinom. Jedoch macht der Autor deutlich, dass weder ein *earlier onset*, noch ein Einfluss von SNP309 auf die Prognose der drei untersuchten Tumoren

ausgeschlossen werden kann. Insgesamt sehen Wilkening et al den Einfluss von SNP309 als gering an.

Interessant an dem Kollektiv dieser Arbeit ist zudem auch die Tumorgruppe der *Jungen Patienten*. Urothelkarzinome sind bei jungen Patienten sehr selten. Trotzdem stellt sich die Frage der Karzinogenese bei diesem speziellen Patientenkollektiv. So konnte – wie schon eingangs beschrieben – beim Kollektiv dieser Arbeit keine erhöhte Mikrosatelliteninstabilität gefunden werden (persönliche Kommunikation Dr. R. Stöhr, Prof. A. Hartmann, Universität Erlangen, Daten hier nicht gezeigt). Auch eine erhöhte Prävalenz der G Allels in SNP309 findet sich bei diesem Patientengut nicht. Die eigenen, hier vorgestellten Daten sind – nach bestem Wissen – derzeit die einzigen zu SNP309 in MDM2 und jungen Patienten ( $\leq 45$  Jahre) mit Urothelkarzinom.

Unter Berücksichtigung der aktuellen Datenlage lässt sich sagen, dass der Einfluss von SNP309 in MDM2 auf das Erkrankungsrisiko bei Urothelkarzinomen wahrscheinlich ein eher geringer ist (insbesondere auch bei Patienten jünger 45 Jahre).

Dennoch scheint die G Variante in SNP309 mit invasiv-wachsenden (hoch-malignen) Tumoren assoziiert, was auch konsistent wäre zu der bisher angenommenen engen Verflechtung zwischen dem p53 Regelkreis und den invasiv-wachsenden Urothelkarzinom, da MDM2 ein maßgeblicher negativer Regulator von p53 ist und somit die Wirkung von P53 negativ beeinflussen kann.

## E. ZUSAMMENFASSUNG

Ziel dieser Arbeit war es, den Einfluss des Sequenzpolymorphismus (SNP) 309 (T zu G) im Onkogen MDM2 auf das Urothelkarzinom zu untersuchen.

So nimmt die G Variante des SNP309 in MDM2 bei vielen malignen Erkrankungen Einfluss auf das Erkrankungsrisiko und auf den Diagnosezeitpunkt des Tumors.

Die Hypothese hierzu ist, dass die G Variante in SNP309 zu erhöhten Spiegeln von MDM2 führt, welches über eine Suppression von P53 eine vermehrte Entstehung von Tumoren begünstigen könnte.

In Rahmen einer Fall-Kontroll-Studie wurde die DNA dreier Kollektive untersucht: eine Kontrollgruppe (n=140), bestehend aus tumorfreien Patienten; eine Gruppe von Urothelkarzinompatienten (n=113), die im epidemiologisch zu erwartenden Alter an diesem Tumor erkrankten (Alter bei Diagnose über 45 Jahren) und eine dritte Gruppe von Karzinompatienten (n=111), die den Tumor sehr früh entwickelt haben (Alter bei Diagnose unter 45 Jahren). Die DNA wurde für den Zweck der Untersuchung aus Gewebe-Paraffinblöcken (Normalgewebe) oder direkt aus EDTA-Blut gewonnen.

Die DNA wurde durch PCR vervielfältigt. Die Auswertung der PCR-Produkte erfolgte durch Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus (RFLP) mittels Kapillarelektrophorese.

Zur Kontrolle der Ergebnisse wurde eine Sequenzierung beliebig ausgewählter Proben durchgeführt.

Für die hier gewonnenen Daten gilt, dass SNP309 in MDM2 nur einen Einfluss auf das Tumorstadium des Urothelkarzinoms nimmt: so zeigt sich die G Variante in SNP309 signifikant gehäuft bei invasiv-wachsenden Tumoren ( $\geq pT1$ ). Dies gilt für alle Tumorpatienten, unabhängig vom Alter beim Auftreten der Erkrankung (n=224).

Andere signifikante Zusammenhänge fanden sich nicht: so nimmt SNP309 keinen signifikanten Einfluss auf den Entstehungszeitpunkt der Urothelkarzinome (*early onset*), auf das Erkrankungsrisiko, auf die Differenzierung der Tumoren (Grading). Insbesondere auch bei jungen Patienten (Alter bei Diagnose unter 45 Jahren) zeigen sich keine signifikanten Zusammenhänge. Auch zeigt der SNP309 in der Verteilung auf die Geschlechter keinen signifikanten Unterschied.

Zusammenfassend legen diese Daten nahe, dass Urothelkarzinom-Patienten mit G Variante in SNP309 im Onkogen MDM2 möglicherweise aggressiver wachsende Tumoren haben.

## F. AUSBLICK

Ob und inwieweit der SNP309 in MDM2 Einfluss auf die Entstehung von Urothelkarzinomen nimmt, kann nicht abschließend bewertet werden, da mehrere unterschiedliche Ergebnisse aus unterschiedlichen Studien vorliegen.

Übereinstimmend lässt sich sagen, dass SNP309 vermutlich – zumindest in der kaukasischen Bevölkerung – keinen Einfluss auf den Entstehungszeitpunkt oder das Erkrankungsrisiko nimmt. Bezüglich der Invasivität des Tumors finden sich unterschiedliche Aussagen.

Für das Urothelkarzinom scheint der Einfluss eher gering – doch gänzlich ausgeschlossen werden kann dieser nicht, da sich doch in den einzelnen Studien (und auch in dieser Arbeit) signifikante Zusammenhänge finden. Somit scheint es einen Einfluss von MDM2 auf den Blasen-tumor zu geben, dieser mag jedoch wenig ausgeprägt sein.

So finden sich aber auch in den gesamten Publikationen zu MDM2 durchaus widersprüchliche Ergebnisse – was zu einer uneinheitlichen Bewertung der Wichtigkeit von SNP309 führt.

Dies unterstreicht nachdrücklich die Wichtigkeit, in großen Metastudien Vergleiche anzustellen, um mit großen Kollektiven verlässlichere Aussagen treffen zu können.

Da die SNPs generell von großem Interesse für die wissenschaftliche Forschung sind – und für viele Karzinome tatsächlich von signifikanter Relevanz – werden sich in Zukunft vielleicht neue Möglichkeiten eröffnen mit den Ergebnissen umzugehen: sei es, die individuelle Prognose von Tumoren besser einschätzen zu können, oder eventuell auch therapeutisch auf bestimmte Karzinome differenzierter reagieren zu können.

## G. Verzeichnis der verwendeten Literatur

Die hier verwendeten Literaturangaben entsprechen der Zitierweise aus [www.pubmed.com](http://www.pubmed.com). Sie sind alphabetisch (nach dem Namen des Erstautors, Herausgebers) aufgeführt.

- Akkiz H, Sümbül AT, Bayram S, Bekar A, Akgöllü E: „MDM2 promoter polymorphism is associated with increased susceptibility to hepatocellular carcinoma in Turkish population.“ *Cancer Epidemiol.* 2010 Aug; 34 (4): 448-52.
- Alhopuro P, Ylisaukko-Oja SK, Koskinen WJ, Bono P, Arola J, Järvinen HJ, Mecklin JP, Atula T, Kontio R, Mäkitie AA, Suominen S, Leivo I, Vahteristo P, Aaltonen LM, Aaltonen LA: „The MDM2 promoter polymorphism SNP309T-->G and the risk of uterine leiomyosarcoma, colorectal cancer, and squamous cell carcinoma of the head and neck.“; *J Med Genet.* 2005 Sep; 42(9): 694-8.
- Atwal GS, Bond GL, Metsuyanım S, Papa M, Friedman E, Distelman-Menachem T, Ben Asher E, Lancet D, Ross DA, Sninsky J, White TJ, Levine AJ, Yarden R: „Haplotype structure and selection of the MDM2 oncogene in humans.“; *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007 Mar 13; 104 (11): 4524-9.
- Babjuk M, Oosterlinck W, Sylvester R, Kaasinen E, Böhle A, Palou J: Guidelines on TaT 1 (Non-muscle invasive) Bladder Cancer; EAU 2008
- Babjuk M, Oosterlinck W, Sylvester R, Kaasinen E, Böhle A, Palou J, Rouprêt M: Guidelines on TaT 1 (Non-muscle invasive) Bladder Cancer; EAU 2010
- Berman DM, Wang Y, Liu Z, Dong Q, Burke LA, Liotta LA, Fisher R, Wu X: „A functional polymorphism in RG56 modulates the risk of bladder cancer.“ *Cancer Res.* 2004 Sep 15; 64 (18): 6820-6.
- Bittenbring J, Parisot F, Wabo A, Mueller M, Kerschenmeyer L, Kreuz M, Truemper L, Landt O, Menzel A, Pfreundschuh M, Roemer K: „MDM2 gene SNP309 T/G and p53 gene SNP72 G/C do not influence diffuse large B-cell non-Hodgkin lymphoma onset or survival in central European Caucasians.“; *BMC Cancer.* 2008 Apr 23; 8: 116.
- Böcker W, Denk H, Heitz PU (Hrsg.): „Pathologie“; Urban & Fischer 2001, 2. Auflage; S. 180-181.
- Bond GL, Hu W, Bond EE, Robins H, Lutzker SG, Arva NC, Bargonetti J, Bartel F, Taubert H, Wuerl P, Onel K, Yip L, Hwang SJ, Strong LC, Lozano G, Levine AJ: „A single nucleotide polymorphism in the MDM2 promoter attenuates the p53 tumor suppressor pathway and accelerates tumor formation in humans.“; *Cell.* 2004 Nov 24; 119(5): 591-602.
- Bond GL, Hu W, Levine A: „A single nucleotide polymorphism in the MDM2 gene: from a molecular and cellular explanation to clinical effect.“; *Cancer Res.* 2005 Jul 1; 65 (13): 5481-4.

- Bond GL, Menin C, Bertorelle R, Alhopuro P, Aaltonen LA, Levine AJ: „MDM2 SNP309 accelerates colorectal tumour formation in women.“; *J Med Genet.* 2006 Dec; 43 (12): 950-2.
- Bond GL, Levine AJ: „A single nucleotide polymorphism in the p53 pathway interacts with gender, environmental stresses and tumor genetics to influence cancer in humans.“ *Oncogene.* 2007 Feb 26; 26 (9): 1317-23.
- Cairns P, Proctor AJ, Knowles MA: „Loss of heterozygosity at the RB locus is frequent and correlates with muscle invasion in bladder carcinoma.“; *Oncogene.* 1991 Dec; 6 (12): 2305-9.
- Campbell IG, Eccles DM, Choong DY; „No association of the MDM2 SNP309 polymorphism with risk of breast or ovarian cancer.“; *Cancer Lett.* 2006 Aug 28; 240(2): 195-7.
- Cattelani S, Defferrari R, Marsilio S, Bussolari R, Candini O, Corradini F, Ferrari-Amorotti G, Guerzoni C, Pecorari L, Menin C, Bertorelle R, Altavista P, McDowell HP, Boldrini R, Dominici C, Tonini GP, Raschellà G, Calabretta B: „Impact of a single nucleotide polymorphism in the MDM2 gene on neuroblastoma development and aggressiveness: results of a pilot study on 239 patients.“; *Clin Cancer Res.* 2008 Jun 1; 14 (11): 3248-53.
- Capasso M, Ayala F, Avvisati RA, Russo R, Gambale A, Mozzillo N, Ascierio PA, Iolascon A: „MDM2 SNP309 and p53 Arg72Pro in cutaneous melanoma: association between SNP309 GG genotype and tumor Breslow thickness.“ *Hum Genet.* 2010 Aug; 55 (8): 518-24.
- Chang CH, Chang CL, Tsai CW, Wu HC, Chiu CF, Wang RF, Liu CS, Lin CC, Bau DT: „Significant association of an XRCC4 single nucleotide polymorphism with bladder cancer susceptibility in Taiwan.“ *Anticancer Res.* 2009 May; 29 (5): 1777-82.
- Chapman EJ, Harnden P, Chambers P, Johnston C, Knowles MA. „Comprehensive analysis of CDKN2A status in microdissected urothelial cell carcinoma reveals potential haploinsufficiency, a high frequency of homozygous co-deletion and associations with clinical phenotype.“ *Clin Cancer Res.* 2005 Aug15; 11 (16): 5740-7.
- Choudhury A, Elliott F, Iles MM, Churchman M, Bristow RG, Bishop DT, Kiltie AE: „Analysis of variants in DNA damage signalling genes in bladder cancer.“ *BMC Med Genet.* 2008 Jul 18; 9: 69.
- Christensen M, Jensen MA, Wolf H, Orntoft TF: „Pronounced microsatellite instability in transitional cell carcinomas from young patients with bladder cancer.“; *Int J Cancer.* 1998 Aug 21; 79 (4): 396-401.
- Cordon-Cardo C, Wartinger D, Petrylak D, Dalbagni G, Fair WR, Fuks Z, Reuter VE: „Altered expression of the retinoblastoma gene product: prognostic indicator in bladder cancer.“ *Natl Cancer Inst.* 1992 Aug 19; 84(16): 1251-6.

- Dharel N, Kato N, Muroyama R, Moriyama M, Shao RX, Kawabe T, Omata M: „MDM2 promoter SNP309 is associated with the risk of hepatocellular carcinoma in patients with chronic hepatitis C.“; *Clin Cancer Res.* 2006 Aug 15; 12(16): 4867-71.
- Deb SP: „Cell cycle regulatory functions of the human oncoprotein MDM2.“ *Mol Cancer Res.* 2003 Dec; 1 (14): 1009-16.
- Drenckhahn (Hrsg.): „Benninghoff Drenckhahn Anatomie – Makroskopische Anatomie“, Band 1, 17. Auflage, Urban & Fischer Verlag, 2008, S. 794-5.
- Engel LS, Taioli E, Pfeiffer R, Garcia-Closas M, Marcus PM, Lan Q, Boffetta P, Vineis P, Autrup H, Bell DA, Branch RA, Brockmüller J, Daly AK, Heckbert SR, Kalina I, Kang D, Katoh T, Lafuente A, Lin HJ, Romkes M, Taylor JA, Rothman N: „Pooled analysis and meta-analysis of glutathione S-transferase M1 and bladder cancer: a HuGE review.“; *Am J Epidemiol.* 2002 Jul 15; 156 (2): 95-109.
- Esrig D, Elmajian D, Groshen S, Freeman JA, Stein JP, Chen SC, Nichols PW, Skinner DG, Jones PA, Cote RJ: „Accumulation of nuclear p53 and tumor progression in bladder cancer.“; *N Engl J Med.* 1994 Nov 10; 331(19): 1259-64.
- Fang Y, Kong B, Yang Q, Ma D, Qu X: „MDM2309 polymorphism is associated with missed abortion.“; *Hum Reprod.* 2009 Jun; 24 (6): 1346-9.
- Firoz EF, Warycha M, Zakrzewski J, Pollens D, Wang G, Shapiro R, Berman R, Pavlick A, Manga P, Ostrer H, Celebi JT, Kamino H, Darvishian F, Rolnitzky L, Goldberg JD, Osman I, Polsky D: „Association of MDM2 SNP309, age of onset, and gender in cutaneous melanoma.“; *Clin Cancer Res.* 2009 Apr 1; 15 (7): 2573-80.
- Fletcher O, Easton D, Anderson K, Gilham C, Jay M, Peto J: „Lifetime risks of common cancers among retinoblastoma survivors.“; *J Natl Cancer Inst.* 2004 Mar 3; 96 (5): 357-63.
- Fontana L, Bosviel R, Delort L, Guy L, Chalabi N, Kwiatkowski F, Satih S, Rabiau N, Boiteux JP, Chamoux A, Bignon YJ, Bernard-Gallon DJ: „DNA repair gene ERCC2, XPC, XRCC1, XRCC3 polymorphisms and associations with bladder cancer risk in a French cohort.“ *Anticancer Res.* 2008 May-Jun; 28 (3B): 1853-6.
- Freedman DA, Wu L, Levine AJ: „Functions of the MDM2 oncoprotein.“ *Cell Mol Life Sci.* 1999 Jan; 55(1): 96-107.
- Giedl J, Wild PJ, Stoehr R, Junker K, Boehm S, van Oers JM, Zwarthoff EC, Blaszyk H, Fine SW, Humphrey PA, Dehner LP, Amin MB, Epstein JI, Hartmann A: „Urothelial neoplasms in individuals younger than 20 years show very few genetic alterations and have a favourable clinical outcome.“; *Verh Dtsch Ges Pathol.* 2006; 90: 253-63.
- Goebell PJ, Vom Dorp F, Rödel C, Frohneberg D, Thüroff JW, Jocham D, Stief C, Roth S, Knüchel R, Schmidt KW, Kausch I, Zaak D, Wiesner C, Miller K, Sauer R, Rübber H: „Nichtinvasives und invasives Harnblasenkarzinom - Diagnostik und Therapie“; *Der Urologe*; Juli 2006; 45 (7): 873-886.

- Gönül II, Akyürek N, Dursun A, Küpeli B: „Relationship of Ki67, TP53, MDM-2 and BCL-2 expressions with WHO 1973 and WHO/ISUP grades, tumor category and overall patient survival in urothelial tumors of the bladder.“; *Pathol Res Pract.* 2008; 204 (10): 707-17.
- Goelz SE, Hamilton SR, Vogelstein B: „Purification of DNA from formaldehyde fixed and paraffin embedded human tissue.“; *Biochem Biophys Res Commun.* 1985 Jul 16;130(1):118-26.
- Goode EL, Ulrich CM, Potter JD: „Polymorphisms in DNA repair genes and associations with cancer risk.“; *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2002 Dec; 11(12): 1513-30.
- Grochola LF, Müller TH, Bond GL, Taubert H, Udelnow A, Würfl P: „MDM2 SNP309 associates with accelerated pancreatic adenocarcinoma formation.“ *Pancreas.* 2010 Jan; 39 (1): 76-80
- Gryshchenko I, Hofbauer S, Stoecher M, Daniel PT, Steurer M, Gaiger A, Eigenberger K, Greil R, Tinhofer I: „MDM2 SNP309 is associated with poor outcome in B-cell chronic lymphocytic leukemia.“; *J Clin Oncol.* 2008 May 10; 26(14): 2252-7.
- Gu L, Zhu N, Findley HW, Zhou M: „MDM2 antagonist nutlin-3 is a potent inducer of apoptosis in pediatric acute lymphoblastic leukemia cells with wild-type p53 and overexpression of MDM2.“ *Leukemia.* 2008 Apr; 22(4): 730-9. Epub 2008 Feb 14.
- Hafner C, Knuechel R, Stoehr R, Hartmann A: „Clonality of multifocal urothelial carcinomas: 10 years of molecular genetic studies.“ *Int J Cancer.* 2002 Sep 1; 101 (1): 1-6.
- Hartmann A, Schlake G, Zaak D, Hungerhuber E, Hofstetter A, Hofstaedter F, Knuechel R: „Occurrence of chromosome 9 and p53 alterations in multifocal dysplasia and carcinoma in situ of human urinary bladder.“; *Cancer Res.* 2002 Feb 1; 62 (3): 809-18.
- Hofstädter F: „Urothelial carcinoma. Does surgical pathology learn from molecular pathology?“; *Pathologe.* 2008 Nov; 29 Suppl 2: 145-8.
- Hong Y, Miao X, Zhang X, Ding F, Luo A, Guo Y, Tan W, Liu Z, Lin D: „The role of P53 and MDM2 polymorphisms in the risk of esophageal squamous cell carcinoma.“; *Cancer Res.* 2005 Oct 15; 65(20): 9582-7.
- Horikawa Y, Nadaoka J, Saito M, Kumazawa T, Inoue T, Yuasa T, Tsuchiya N, Nishiyama H, Ogawa O, Habuchi T: „Clinical implications of the MDM2 SNP309 and p53 Arg72Pro polymorphisms in transitional cell carcinoma of the bladder.“; *Oncol Rep.* 2008 Jul; 20 (1): 49-55.
- Hu Z, Ma H, Lu D, Qian J, Zhou J, Chen Y, Xu L, Wang X, Wei Q, Shen H: „Genetic variants in the MDM2 promoter and lung cancer risk in a Chinese population.“; *Int J Cancer.* 2006 Mar 1; 118(5): 1275-8.
- Hu Z, Jin G, Wang L, Chen F, Wang X, Shen H: „MDM2 promoter polymorphism SNP309 contributes to tumor susceptibility: evidence from 21 case-control studies.“; *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2007 Dec; 16(12): 2717-23.

- Iwakuma T, Lozano G: „MDM2, an introduction.“; *Mol Cancer Res.* 2003 Dec; 1 (14): 993-1000.
- Jaboin JJ, Hwang M, Perez CA, Cooper C, Chen H, Ye C, Cai Q, Wills ML, Lu B: „No evidence for association of the MDM2-309 T/G promoter polymorphism with prostate cancer outcomes.“ *Urol Oncol.* 2009 Jun 11.
- Jones SN, Hancock AR, Vogel H, Donehower LA, Bradley A: „Overexpression of Mdm2 in mice reveals a p53-independent role for Mdm2 in tumorigenesis.“; *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998 Dec 22; 95(26): 15608-12.
- Kaderi MA, Mansouri M, Zainuddin N, Cahill N, Gunnarsson R, Jansson M, Kimby E, Aleskog A, Lundin J, Glimelius B, Melbye M, Juliusson G, Jurlander J, Rosenquist R: „Lack of association between the MDM2 promoter polymorphism SNP309 and clinical outcome in chronic lymphocytic leukemia.“ *Leuk Res.* 2010 Mar; 34 (3): 335-9.
- Kelsey KT, Park S, Nelson HH, Karagas MR: „A population-based case-control study of the XRCC1 Arg399Gln polymorphism and susceptibility to bladder cancer.“; *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2004 Aug; 13(8): 1337-41.
- Khatri RG, Navaratne K, Weil RJ: „The role of a single nucleotide polymorphism of MDM2 in glioblastoma multiforme.“; *J Neurosurg.* 2008 Nov; 109 (5): 842-8.
- Kibel AS, Jin CH, Klim A, Luly J, A Roehl K, Wu WS, Suarez BK: „Association between polymorphisms in cell cycle genes and advanced prostate carcinoma.“; *Prostate.* 2008 Aug 1; 68(11): 1179-86.
- Kiemeny LA, Schoenberg M: „Familial transitional cell carcinoma.“; *J Urol.* 1996 Sep; 156(3): 867-72.
- Kiemeny LA, Thorlacius S, Sulem P, Geller F, Aben KK, Stacey SN, Gudmundsson J, Jakobsdottir M, Bergthorsson JT, Sigurdsson A, Blondal T, Witjes JA, Vermeulen SH, Hulsbergen-van de Kaa CA, Swinkels DW, Ploeg M, Cornel EB, Vergunst H, Thorgeirsson TE, Gudbjartsson D, Gudjonsson SA, Thorleifsson G, Kristinsson KT, Mouy M, Snorraddottir S, Placidi D, Campagna M, Arici C, Koppova K, Gurzau E, Rudnai P, Kellen E, Polidoro S, Guarrera S, Sacerdote C, Sanchez M, Saez B, Valdivia G, Ryk C, de Verdier P, Lindblom A, Golka K, Bishop DT, Knowles MA, Nikulasson S, Petursdottir V, Jonsson E, Geirsson G, Kristjansson B, Mayordomo JI, Steineck G, Porru S, Buntinx F, Zeegers MP, Fletcher T, Kumar R, Matullo G, Vineis P, Kiltie AE, Gulcher JR, Thorsteinsdottir U, Kong A, Rafnar T, Stefansson K: „Sequence variant on 8q24 confers susceptibility to urinary bladder cancer.“ *Nat Genet.* 2008 Nov; 40 (11): 1307-12.
- Kleparník K, Bocek P: „DNA diagnostics by capillary electrophoresis.“ *Chem Rev.* 2007 Nov; 107 (11): 5279-317. Epub 2007 Oct 31. Review.
- Knowles MA: „Molecular pathogenesis of bladder cancer“ *Int J Clin Oncol.* 2008 Aug; 13 (4): 287-97.
- Kondo I, Iida S, Takagi Y, Sugihara K: „MDM2 mRNA expression in the p53 pathway may predict the potential of invasion and liver metastasis in colorectal cancer.“; *Dis Colon Rectum.* 2008 Sep; 51 (9): 1395-402.

- Korkolopoulou P, Christodoulou P, Kapralos P, Exarchakos M, Bisbiroula A, Hadjiyannakis M, Georgountzos C, Thomas-Tsagli E: „The role of p53, MDM2 and c-erb B-2 oncoproteins, epidermal growth factor receptor and proliferation markers in the prognosis of urinary bladder cancer.“ *Pathol Res Pract.* 1997; 193 (11-12): 767-75.
- Krekac D, Brozkova K, Knoflickova D, Hrstka R, Muller P, Nenutil R, Vojtesek B: „MDM2SNP309 does not associate with elevated MDM2 protein expression or breast cancer risk.“; *Oncology.* 2008; 74 (1-2): 84-7.
- Leu JD, Lin IF, Sun YF, Chen SM, Liu CC, Lee YJ: „Association between MDM2-SNP309 and hepatocellular carcinoma in Taiwanese population.“ *World J Gastroenterol.* 2009 Nov 28;15 (44): 5592-7
- Levine AJ: „p53, the cellular gatekeeper for growth and division.“; *Cell.* 1997 Feb 7; 88 (3): 323-31.
- Li G, Zhai X, Zhang Z, Chamberlain RM, Spitz MR, Wei Q: „MDM2 gene promoter polymorphisms and risk of lung cancer: a case-control analysis.“; *Carcinogenesis.* 2006 Oct; 27(10): 2028-33.
- Li CP, Zhu YJ, Chen R, Wu W, Li AP, Liu J, Liu QZ, Wei QY, Zhang ZD, Zhou JW: „Functional polymorphisms of JWA gene are associated with risk of bladder cancer.“ *J Toxicol Environ Health A.* 2007 Jun; 70 (11): 876-84.
- Lind H, Zienolddiny S, Ekstrøm PO, Skaug V, Haugen A: „Association of a functional polymorphism in the promoter of the MDM2 gene with risk of nonsmall cell lung cancer.“; *Int J Cancer.* 2006 Aug 1; 119 (3): 718-21.
- Lindgren D, Liedberg F, Andersson A, Chebil G, Gudjonsson S, Borg A, Månsson W, Fioretos T, Höglund M: „Molecular characterization of early-stage bladder carcinomas by expression profiles, FGFR3 mutation status, and loss of 9q.“ *Oncogene.* 2006 Apr 27; 25 (18): 2685-96.
- Linn JF, Sesterhenn I, Mostofi FK, Schoenberg M: „The molecular characteristics of bladder cancer in young patients.“; *J Urol.* 1998 May; 159(5): 1493-6.
- Liu G, Wheatley-Price P, Zhou W, Park S, Heist RS, Asomaning K, Wain JC, Lynch TJ, Su L, Christiani DC: „Genetic polymorphisms of MDM2, cumulative cigarette smoking and nonsmall cell lung cancer risk.“; *Int J Cancer.* 2008 Feb 15; 122 (4): 915-8.
- Marcus PM, Hayes RB, Vineis P, Garcia-Closas M, Caporaso NE, Autrup H, Branch RA, Brockmøller J, Ishizaki T, Karakaya AE, Ladero JM, Mommsen S, Okkels H, Romkes M, Roots I, Rothman N: „Cigarette smoking, N-acetyltransferase 2 acetylation status, and bladder cancer risk: a case-series meta-analysis of a gene-environment interaction.“; *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2000 May; 9 (5): 461-7.
- McGrath M, Michaud DS, De Vivo I: „Hormonal and reproductive factors and the risk of bladder cancer in women.“; *Am J Epidemiol.* 2006 Feb 1; 163 (3): 236-44.
- Melton L: „On the trail of SNPs“; *Nature* 2003 April; 422: 917-23.

- Mitra AP, Datar RH, Cote RJ: „Molecular pathways in invasive bladder cancer: new insights into mechanisms, progression, and target identification.“; *J Clin Oncol.* 2006 Dec 10; 24 (35): 5552-64.
- Onat OE, Tez M, Özcelik T, Törüner G: „MDM2 T309G Polymorphism is Associated with Bladder Cancer“; *Anticancer Res.* 2006 Sep-Oct; 26 (5A): 3473-5
- Otto T, Rübber H: „Prävention des Harnblasenkarzinoms.“; *Urologe* 2004; 43: 562–564
- Reifenberger G, Liu L, Ichimura K, Schmidt EE, Collins VP: „Amplification and overexpression of the MDM2 gene in a subset of human malignant gliomas without p53 mutations.“ *Cancer Res.* 1993 Jun 15; 53 (12): 2736-9.
- Ricceri F, Guarrera S, Sacerdote C, Polidoro S, Allione A, Fontana D, Destefanis P, Tizzani A, Casetta G, Cucchiara G, Vineis P, Matullo G: „ERCC1 haplotypes modify bladder cancer risk: a case-control study.“ *DNA Repair (Amst).* 2010 Feb 4; 9 (2): 191-200.
- Riede, UN, Werner M, Schaefer HE; *Allgemeine und spezielle Pathologie, 5. Auflage, Thieme Verlag, 2004, Stuttgart*
- Rieger-Christ KM, Mourtzinis A, Lee PJ, Zaghera RM, Cain J, Silverman M, Libertino JA, Summerhayes IC: „Identification of fibroblast growth factor receptor 3 mutations in urine sediment DNA samples complements cytology in bladder tumor detection.“; *Cancer.* 2003 Aug 15; 98 (4): 737-44.
- Rubin R, Strayer DS: „Rubin’s Pathology“, 5th edition, Lippincott Williams & Wilkins, 2008
- Sanchez-Carbayo M, Socci ND, Kirchoff T, Erill N, Offit K, Bochner BH, Cordon-Cardo C: „A polymorphism in HDM2 (SNP309) associates with early onset in superficial tumors, TP53 mutations, and poor outcome in invasive bladder cancer.“; *Clin Cancer Res.* 2007 Jun 1; 13 (11): 3215-20.
- Seitz M, Zaak D, Knüchel-Clarke R, Stief C: „Urinary bladder tumours. The new 2004 WHO classification“; *Urologe A.* 2005 Sep; 44 (9): 1073-86.
- Shinohara A, Sakano S, Hinoda Y, Nishijima J, Kawai Y, Misumi T, Nagao K, Hara T, Matsuyama H: „Association of TP53 and MDM2 polymorphisms with survival in bladder cancer patients treated with chemoradiotherapy.“ *Cancer Sci.* 2009 Dec; 100 (12): 2376-82.
- Simon R, Struckmann K, Schraml P, Wagner U, Forster T, Moch H, Fijan A, Bruderer J, Wilber K, Mihatsch MJ, Gasser T, Sauter G: „Amplification pattern of 12q13-q15 genes (MDM2, CDK4, GLI) in urinary bladder cancer.“; *Oncogene.* 2002 Apr 11; 21 (16): 2476-83.
- Smith ND, Rubenstein JN, Eggen SE, Kozlowski JM: „The p53 tumor suppressor gene and nuclear protein: basic science review and relevance in the management of bladder cancer.“ *J Urol.* 2003 Apr; 169 (4): 1219-28.

- Sotamaa K, Liyanarachchi S, Mecklin JP, Järvinen H, Aaltonen LA, Peltomäki P, de la Chapelle A: „p53 codon 72 and MDM2 SNP309 polymorphisms and age of colorectal cancer onset in Lynch syndrome.“; *Clin Cancer Res.* 2005 Oct 1; 11 (19 Pt 1): 6840-4.
- Steinmaus CM, Nuñez S, Smith AH: „Diet and bladder cancer: a meta-analysis of six dietary variables.“; *Am J Epidemiol.* 2000 Apr 1; 151 (7): 693-702.
- Stenzl A, Cowan NC, De Santis M, Jakse G, Kuczyk M, Merseburger AS, Ribal MJ, Sherif A, Witjes JA: *Guidelines on Bladder Cancer Muscle-invasive and Metastatic, EAU 2008*
- Stenzl A, Cowan NC, De Santis M, Kuczyk M, Merseburger AS, Ribal MJ, Sherif A, Witjes JA: *Guidelines on Bladder Cancer, EAU 2010*
- Stern MC, Van Den Berg D, Yuan JM, Conti DV, Gago-Dominguez M, Pike MC, Xiang YB, Gao YT, Cortessis VK: „Sequence variant on 3q28 and urinary bladder cancer risk: findings from the Los Angeles-Shanghai bladder case-control study.“ *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2009 Nov; 18 (11): 3057-61
- Stoehr R, Wissmann C, Suzuki H, Knuechel R, Krieg RC, Klopocki E, Dahl E, Wild P, Blaszyk H, Sauter G, Simon R, Schmitt R, Zaak D, Hofstaedter F, Rosenthal A, Baylin SB, Pilarsky C, Hartmann A: „Deletions of chromosome 8p and loss of sFRP1 expression are progression markers of papillary bladder cancer.“; *Lab Invest.* 2004 Apr; 84(4): 465-78.
- Stoehr R, Zietz S, Burger M, Filbeck T, Denzinger S, Obermann EC, Hammerschmied C, Wieland WF, Knuechel R, Hartmann A: „Deletions of chromosomes 9 and 8p in histologically normal urothelium of patients with bladder cancer.“; *Eur Urol.* 2005 Jan; (1): 58-63.
- Stoehr R, Hitzenbichler F, Kneitz B, Hammerschmied CG, Burger M, Tannapfel A, Hartmann A: „Mdm2-SNP309 polymorphism in prostate cancer: no evidence for association with increased risk or histopathological tumour characteristics.“; *Br J Cancer.* 2008 Jul 8; 99(1): 78-82. Epub 2008 Jun 24.
- Spruck CH 3rd, Ohneseit PF, Gonzalez-Zulueta M, Esrig D, Miyao N, Tsai YC, Lerner SP, Schmütte C, Yang AS, Cote R, et al.: „Two molecular pathways to transitional cell carcinoma of the bladder.“; *Cancer Res.* 1994 Feb 1; 54 (3): 784-8.
- Terry K, McGrath M, Lee IM, Buring J, De Vivo I: „MDM2 SNP309 is associated with endometrial cancer risk.“ *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2008 Apr; 17 (4): 983-6.
- Toledo F, Wahl GM: „Regulating the p53 pathway: in vitro hypotheses, in vivo veritas.“; *Nat Rev Cancer.* 2006 Dec; 6 (12): 909-23.
- Toledo F, Wahl GM: „MDM2 and MDM4: p53 regulators as targets in anticancer therapy.“; *Int J Biochem Cell Biol.* 2007; 39 (7-8): 1476-82.
- Travis LB, Curtis RE, Glimelius B, Holowaty EJ, Van Leeuwen FE, Lynch CF, Hagenbeek A, Stovall M, Banks PM, Adami J, et al.: „Bladder and kidney cancer following cyclophosphamide therapy for non-Hodgkin's lymphoma.“; *J Natl Cancer Inst.* 1995 Apr 5; 87 (7): 524-30.

- Tu HF, Chen HW, Kao SY, Lin SC, Liu CJ, Chang KW: „MDM2 SNP 309 and p53 codon 72 polymorphisms are associated with the outcome of oral carcinoma patients receiving postoperative irradiation.“; *Radiother Oncol.* 2008 May; 87(2): 243-52.
- Tuna B, Yörükoğlu K, Tüzel E, Güray M, Mungan U, Kirkali Z: „Expression of p53 and mdm2 and their significance in recurrence of superficial bladder cancer.“; *Pathol Res Pract.* 2003; 199 (5): 323-8.
- Van Rhijn BW, van der Kwast TH, Vis AN, Kirkels WJ, Boevé ER, Jöbsis AC, Zwarthoff EC: „FGFR3 and P53 characterize alternative genetic pathways in the pathogenesis of urothelial cell carcinoma.“; *Cancer Res.* 2004 Mar 15; 64 (6): 1911-4.
- Vazquez A, Bond EE, Levine AJ, Bond GL: „The genetics of the p53 pathway, apoptosis and cancer therapy“; *Nat Rev Drug Discov.* 2008 Dec; 7(12): 979-87.
- Verhaegh GW, Verkleij L, Vermeulen SH, den Heijer M, Witjes JA, Kiemeny LA: „Polymorphisms in the H19 gene and the risk of bladder cancer.“ *Eur Urol.* 2008 Nov; 54 (5): 1118-26.
- Vineis P, Marinelli D, Autrup H, Brockmoller J, Cascorbi I, Daly AK, Golka K, Okkels H, Risch A, Rothman N, Sim E, Taioli E: „Current smoking, occupation, N-acetyltransferase-2 and bladder cancer: a pooled analysis of genotype-based studies.“; *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2001 Dec; 10(12): 1249-52.
- Wang M, Zhang Z, Zhu H, Fu G, Wang S, Wu D, Zhou J, Wei Q, Zhang Z: „ A novel functional polymorphism C1797G in the MDM2 promoter is associated with risk of bladder cancer in a Chinese population.“ *Clin Cancer Res.* 2008 Jun 1; 14 (11): 3633-40.
- Willander K, Ungerback J, Karlsson K, Fredrikson M, Söderkvist P, Linderholm M: „MDM2 SNP309 promoter polymorphism, an independent prognostic factor in chronic lymphocytic leukemia.“ *Eur J Haematol.* 2010 Sep; 85 (3): 251-6.
- Wilkening S, Hemminki K, Rudnai P, Gurzau E, Koppova K, Försti A, Kumar R: „No association between MDM2 SNP309 promoter polymorphism and basal cell carcinoma of the skin.“; *Br J Dermatol.* 2007 **Aug**; 157(2): 375-7. Epub 2007 Jun 6.
- Wilkening S, Bermejo JL, Hemminki K: „MDM2 SNP309 and cancer risk: a combined analysis.“; *Carcinogenesis.* 2007 **Nov**; 28(11): 2262-7. Epub 2007 Sep 7.
- Wrench D, Waters R, Carlotti E, Iqbal S, Matthews J, Calaminici M, Gribben J, Lister TA, Fitzgibbon J: „Clinical relevance of MDM2 SNP 309 and TP53 Arg72Pro in follicular lymphoma.“ *Haematologica* 2009.
- Wu XR: „Urothelial tumorigenesis: a tale of divergent pathways “; *Nat Rev Cancer.* 2005 Sep; 5 (9): 713-25.

## **H. ANHANG**

### **1. Danksagungen**

Ohne die folgenden Personen wäre ein Gelingen dieser Arbeit sicher nicht möglich gewesen:

Allen voran möchte ich meinem Doktorvater Professor Arndt Hartmann für die Bereitstellung des interessanten Themas danken, zudem dafür, dass er mir sein Labor zur Verfügung stellte und das nötige Vertrauen in mich setzte, diese Arbeit durchzuführen.

Sehr herzlich danken möchte ich Dr. Robert Stöhr für die ausgezeichnete Betreuung meiner Arbeit. Er begleitete mich nicht nur mit allerlei Ratschlägen und Informationen, sondern hatte auch für Fragen und Anliegen egal welcher Art immer ein offenes Ohr.

Auch möchte ich den MTAs vielmals Danke sagen. Für die unkomplizierte Unterstützung bei der Laborarbeit in der Phase der Einarbeitung und für die entgegengebrachte Geduld. Ohne sie wäre es im Labor nur halb so schön: Monika Kerscher, Nina Niessl, Andrea Lieschke, Stefanie Götz, Kerstin Meier.

Schließlich gilt auch meinen Eltern großer Dank: ohne Ihre Unterstützung über diese gesamte Zeit wäre Vieles undenkbar gewesen.

## 2. Curriculum vitae - Florian Hitzenbichler

Geburtsdatum            08. Mai 1981 in Freyung  
Staatsangehörigkeit    deutsch

### Schulbildung

1987 – 1991    Besuch der Grundschule in Freyung  
1991 – 2000    Besuch des Gymnasiums Freyung, Abitur 2000  
2001 – 2001    Zivildienst am Krankenhaus Freyung

### Studium

2001 – 2003    **Vorklinischer Studienabschnitt** Humanmedizin an der Universität Regensburg  
Sept. 2003    Ärztliche Vorprüfung  
2003 – 2008    **Klinischer Studienabschnitt** Humanmedizin an der Universität Regensburg  
2007 – 2008    **Praktisches Jahr**, Wahlfach: Gynäkologie und Geburtshilfe  
                  **Ärztliche Prüfung** am 02.12.2008

seit Okt. 2006    **Zweitstudium der Philosophie** (Magister) an der Universität Regensburg  
                  21.10.2008 **Zwischenprüfung**

08.12.2008    **Approbation als Arzt**

### Ärztliche Tätigkeit

seit Jan. 09    Assistenzarzt an der Klinik und Poliklinik für Innere Medizin 1 der Universität  
                  Regensburg

Florian Hitzenbichler  
Regensburg, Januar 2012