

**Aus dem Institut für Klinische Biochemie und Pathobiochemie
der Universität Würzburg**

Vorstand: Professor Dr. rer. nat. Elke Butt

**Histologische, biochemische und statistische
Untersuchungen zur Funktion des Proteins
LASP-1 im Urothelkarzinom der Harnblase**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der

Medizinischen Fakultät

der

Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Nadine Grünemay

aus Bietigheim-Bissingen

Würzburg, Mai 2013

Referent: Frau **Prof. Dr. rer. nat. Elke Butt**
Institut für Klinische Biochemie und Pathobiochemie der
Universität Würzburg

Koreferent: Herr **Prof. Dr. rer. nat. Kai Schuh**
Physiologisches Institut der Universität Würzburg, Lehrstuhl 1

Dekan: Herr **Prof. Dr. med. Matthias Frosch**
Institut für Hygiene und Mikrobiologie der Universität Würzburg

Tag der mündlichen Prüfung: 12. Dezember 2013

Die Promovendin ist Ärztin

Für meinen Vater

INHALTSVERZEICHNIS

1. EINLEITUNG	1
1.1 Das Urothelkarzinom der Harnblase	1
1.2 LASP-1 – Aufbau und Funktion	6
1.3 Zielsetzung der Dissertationsarbeit	11
2. MATERIAL UND METHODEN	12
2.1 Material	12
2.1.1 Chemikalien und Reagenzien	12
2.1.2 Antikörper	13
2.1.2.1 Primärantikörper	13
2.1.2.2 Sekundärantikörper	13
2.1.3 Verbrauchsmaterialien	14
2.1.4 Geräte	15
2.2 Methoden	16
2.2.1 Probengewinnung	16
2.2.1.1 Gewebeproben	16
2.2.1.2. Urinproben	16
2.2.2 Immunhistochemische Methoden	17
2.2.2.1 Nachweis von LASP-1 in Paraffinschnitten	17
2.2.2.2 Zytozentrifugenpräparation	19
2.2.2.3 Nachweis von LASP-1 in Zytozentrifugenpräparaten	20
2.2.3 Histopathologische Befundung der LASP-1-Expression	22
2.2.4 Proteinbiochemische Methoden	25
2.2.4.1 Aufbereitung der Urinproben für die Gel-Elektrophorese	25
2.2.4.2 Denaturierende Gel-Elektrophorese nach Laemmli (1970)	25
2.2.4.3 Western Blot	27

<u>2.2.4.3.1</u>	<u>Transfer auf die Nitrocellulosemembran</u>	27
<u>2.2.4.3.2</u>	<u>Anfärbung der Proteine auf der Nitrocellulose</u>	27
<u>2.2.4.3.3</u>	<u>Detektion spezifischer Proteine mit Antikörpern</u>	28
2.2.5	Statistische Auswertung	29
3.	ERGEBNISSE	30
3.1	Blasenschnittpräparate	30
3.1.1	LASP-1 ist überexprimiert im Urothelkarzinom der Harnblase	30
3.1.2	Beurteilung der Aussagekraft des LASP-1-IRS	33
3.1.3	Keine Korrelation zwischen LASP-1-Expression und verschiedener klinisch-pathologischer Parameter	34
3.2	Western Blot-Analyse der Urinproben	36
3.2.1	LASP-1 ist im Urin von Kontrollpersonen nicht nachweisbar	36
3.2.2	Western Blot-Analyse aus Harnblasenspülflüssigkeitsproben von Blasenkarzinompatienten	36
3.2.3	Western Blot-Analyse aus Spontanurinproben von Blasenkarzinompatienten	37
3.2.4	LASP-1 ist im Urinsediment von Blasenkarzinompatienten nachweisbar	38
3.3	Auswertung der Zytozentrifugenpräparate	40
3.3.1	Zytozentrifugenpräparate aus Spontanurin von Kontrollpersonen	40
3.3.2	Zytozentrifugenpräparate aus Harnblasenspülflüssigkeits- proben von Blasenkarzinompatienten	41
3.3.3	Zytozentrifugenpräparate aus Spontanurinproben von Blasenkarzinompatienten	41
3.3.4	Keine Verbesserung der Sensitivität der Urinzytologie durch immunhistochemische Färbung gegen LASP-1	42

3.4 Vergleich der Western Blot-Analyse mit den Zytozentrifugenpräparaten	44
3.4.1 Vergleich der Western Blot-Analyse und der Zytozentrifugenpräparate aus Spontanurin von Kontrollpersonen	44
3.4.2 Vergleich der Western Blot-Analyse und der Zytozentrifugenpräparate aus Harnblasenspülflüssigkeitsproben von Blasenkarzinompatienten	45
3.4.3 Vergleich der Western Blot-Analyse und der Zytozentrifugenpräparate aus Spontanurinproben von Blasenkarzinompatienten	46
3.4.4 Auswertung des Vergleichs der Western Blot-Analyse mit den Zytozentrifugenpräparaten	47
4. DISKUSSION	48
5. ZUSAMMENFASSUNG	58
6. APPENDIX	61
6.1 TNM-Klassifikation	61
6.2 Urin-basierte Tumormarker	62
6.3 Rohdaten der histologischen Blasenschnitte	63
6.4 Rohdaten der Urinproben	64
7. LITERATURVERZEICHNIS	66
8. ABKÜRZUNGEN	76
9. DANKSAGUNG	
10. CURRICULUM VITAE	

1. EINLEITUNG

1.1 Das Urothelkarzinom der Harnblase

Mit 386300 geschätzten Neuerkrankungen pro Jahr ist Blasenkrebs die neunthäufigste Krebsursache weltweit [2, 23, 38]. Männer sind etwa dreimal häufiger betroffen als Frauen (weltweit geschätzte Neuerkrankungen pro Jahr: 297300 ♂, 89000 ♀) [2, 23]. Etwa 60 % der Neuerkrankten mit männlichem Geschlecht (177.800 pro Jahr) leben in den entwickelten Ländern, weshalb das Harnblasenkarzinom in den Industrienationen sogar auf dem vierten Platz der häufigsten Krebsneuerkrankungen des Mannes liegt [2]. Das Lebenszeitrisko, an Blasenkrebs zu erkranken, liegt in Deutschland bei 4,4 % für den Mann und im Gegensatz dazu nur bei 1,6 % für die Frau. Allerdings tritt die Krankheit meist im höheren Lebensalter auf (mittleres Erkrankungsalter in Deutschland: 72 für ♂, 74 für ♀) [78]. Jedes Jahr sterben geschätzte 150200 Betroffene an einem Karzinom der Harnblase [2, 23, 38]. In den entwickelten Ländern ist das Blasenkarzinom mit geschätzten 55000 Verstorbenen pro Jahr für etwa 3,6 % der krebisbedingten Todesfälle unter den Männern verantwortlich und belegt damit den siebten Platz unter den häufigsten Krebstodesursachen [2]. Bei einer stagnierenden, teilweise sogar rückläufigen Inzidenz sind die Mortalitätsraten in den letzten 20 Jahren deutlich gesunken, so dass die durchschnittliche relative 5-Jahres-Überlebensrate heute in Deutschland bei 78,2 % liegt [2, 78].

Zu den Risikofaktoren für die Entwicklung eines Blasenkrebses gehören das Tabakrauchen, die Exposition gegenüber aromatischen Aminen und polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffen, die Schistosomiasis, die Chemotherapie mit Cyclophosphamid und die Bestrahlung, wobei das Rauchen in 30 bis 66 % der Fälle mit dem Auftreten eines Harnblasenkarzinoms assoziiert ist und somit den bedeutendsten Risikofaktor darstellt [1, 8, 20, 33,

42, 64, 67, 68]. Neben diesen auf den Organismus einwirkenden äußeren Risikofaktoren können auch genetische Dispositionen Auslöser der Erkrankung sein. Hierunter fallen die genetischen Polymorphismen der N-Acetyltransferase und der Glutathion-S-Transferase M1: beides sind Enzyme, die an der Detoxifikation aromatischer Amine beziehungsweise polyzyklischer aromatischer Kohlenwasserstoffe beteiligt sind. So weiß man heute, dass ein „langsamer“ Acetylierungsstatus ebenso wie eine homozygote Deletion des GSTM1-Gens ein höheres Risiko mit sich bringt, an Blasenkrebs zu erkranken [25, 54, 56]. Außerdem scheint es eine erbliche Variante des Urothelkarzinoms zu geben, wie familiär gehäuft auftretende Harnblasenkrebskrankungen vermuten lassen [41].

In Europa handelt es sich bei über 95 % der Blasenkrebsfälle histologisch um Urothelkarzinome, weshalb dieser häufigste histologische Typ im Focus dieser Dissertationsarbeit steht [18, 67].

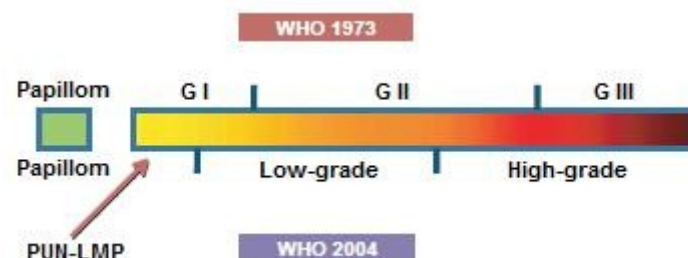


Abbildung 1: Vergleich der WHO-Klassifikationssysteme von 1973 und 2004

oben: WHO-Klassifikation von 1973; unten: WHO-Klassifikation von 2004. Der horizontale Streifen repräsentiert den Verlauf des Gradings von niedrig (links) zu hoch (rechts). PUN-LMP = papillary urothelial neoplasm of low malignant potential. [Abbildung aus 95]

Das histopathologische Grading des Blasenkarzinoms wird nach der WHO-Klassifikation von 2004 vorgenommen. Abbildung 1 stellt sowohl die alte WHO-Klassifikation von 1973 als auch das neue Klassifikationssystem von 2004 im direkten Vergleich dar. Es ist bemerkenswert, dass die differenzierte Klassifikation von 1973 durch eine pauschalere abgelöst wurde. Seit 2004 wird nur noch zwischen low-grade und high-grade Tumoren unterschieden. Die neu

geschaffene Kategorie PUN-LMP beschreibt papilläre hochdifferenzierte Läsionen mit minimalen, die Schichtdicke betreffende und zytologische Atypien, die in der Regel keine Progression zeigen, aber auch nicht als benigne einzustufen sind [21, 22]. Auch wenn die WHO-Klassifikation von 2004 heute allgemein gültig ist, ist die alte Einteilung in G1 bis G3 im deutschsprachigen Raum noch verbreitet.

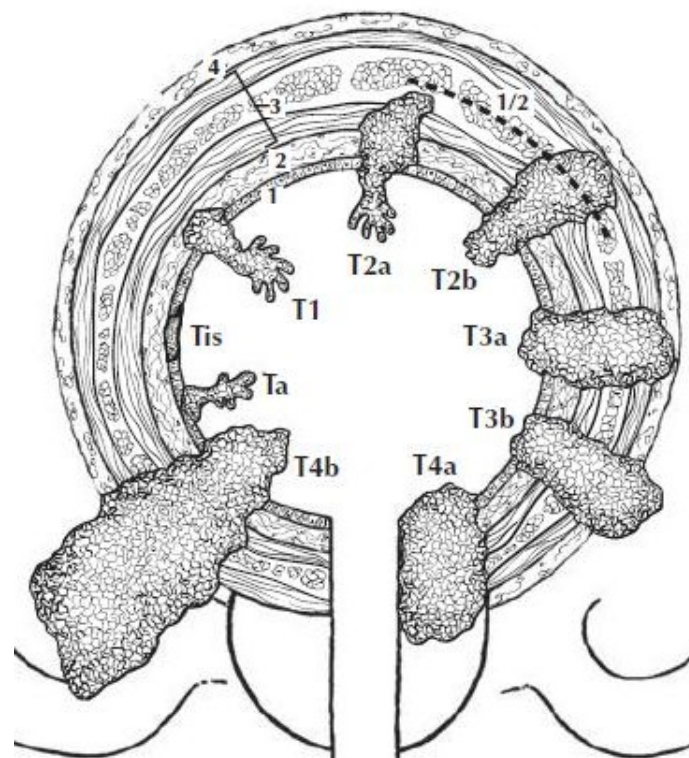


Abbildung 2: Illustration der Tumorausdehnung

T = Tumor bzw. Ausdehnung des Primärtumors; 1 = Urothel; 2 = Lamina propria und subepitheliales Bindegewebe; 3 = Muskularis; 4 = perivesikales Fett. [Abbildung aus 27]

Das Staging, also die Stadieneinteilung des Harnblasenkarzinoms, wird mithilfe der TNM-Klassifikation bestimmt [siehe 6. Appendix Tabelle 14]. Zum besseren Verständnis der T-Stadien ist in Abbildung 2 die Ausdehnung des Primärtumors illustriert. Dabei versteht man unter dem Stadium Ta einen nicht invasiven papillären Tumor. Tis steht für das Carcinoma in situ, welches ebenfalls auf das Urothel beschränkt ist. T1-Tumoren infiltrieren die Lamina propria und das subepitheliale Bindegewebe, während T2-Tumoren bereits bis in die Muskulatur vordringen. Im Stadium T3 ist die Muskulatur überschritten

und das perivesikale Fettgewebe infiltriert. Das Stadium T4 beschreibt die Invasion anderer Organe wie etwa der Prostata, des Uterus, der Vagina oder der Becken- beziehungsweise der Bauchwand [27]. Das pathologische Stadium ist einer der wichtigsten prognostischen Faktoren beim Blasenkrebs; umso bedeutender ist deshalb ein exaktes Staging für die Therapieentscheidung [42, 50]. Vor allem die Diagnose eines T1-Tumors scheint häufig Probleme zu bereiten und untersucherabhängigen Schwankungen zu unterliegen [9, 51].

70 % der Urothelkarzinome der Harnblase präsentieren sich bei der Erstdiagnose als oberflächliche Tumoren in den Stadien Ta, Tis und T1, die restlichen 30 % gehören bei der Erstdiagnose bereits zu den muskelinvasiven Tumoren in den Stadien T2 bis T4 [42].

Das häufigste Symptom beim Harnblasenkarzinom ist die schmerzlose Hämaturie, die bei nahezu allen Patienten entweder als Mikro- oder Makrohämaturie, beziehungsweise intermittierend, auftritt. Weitere Symptome, mit denen sich der Blasenkrebs präsentiert, sind Dysurie, häufiges Wasserlassen und Harndrang. Flankenschmerzen, Extremitätenödeme oder ein palpabler Tumor können ebenfalls auf ein Karzinom der Blase hinweisen. Gewichtsverlust und Knochenschmerzen sind dagegen selten und meistens Zeichen einer bereits fortgeschrittenen Erkrankung [42].

Als Goldstandard in der Diagnostik eines Blasenkrebs gilt die Zystoskopie, die Abnormalitäten in der Harnblase sichtbar macht und bereits wichtige zusätzliche Informationen wie Größe, Lokalisation und Gestalt des Tumors liefern kann [42]. Von sämtlichen verdächtigen Läsionen innerhalb der Blase sollten Biopsien entnommen werden, um die Diagnose zu sichern [12, 42]. Darüber hinaus wird die Diagnostik eines Harnblasenkarzinoms durch eine sogenannte Urinzytologie sinnvoll ergänzt [12]. Vor allem bei der Erkennung von high-grade Tumoren ist die zytologische Untersuchung des Urins sehr hilfreich, da mit ansteigendem Grading und fortgeschrittenen Tumorstadium die Sensitivität der Zytologie zunimmt [26, 52, 70]. In diesem Zusammenhang spielt die Urinzytologie besonders bei der Detektion eines Carcinoma in situ, welches

zu den high-grade Läsionen gehört, aber mittels Zystoskopie nicht immer zu erkennen ist, eine wesentliche Rolle [26, 98]. Im Gegensatz hierzu ist die zytologische Urinanalyse bei low-grade Tumoren mit einer durchschnittlichen Sensitivität zwischen 12 und 26 % ungenügend [52]. Da sowohl die Zystoskopie als auch die Zytologie Schwächen bei der Detektion aufweisen, ist es eine wichtige Aufgabe, die Diagnostik vor allem auch im Hinblick auf die notwendige Nachsorge zu verbessern.

Da die Überlebenschance bei Blasenkrebs entscheidend von einer Diagnose im frühen Stadium abhängt, wäre ein funktionierendes und aussagekräftiges Blasenkrebs-Screening ein großer Fortschritt [59]. Ein idealer Screening-Test sollte billig, nicht invasiv und von hoher Spezifität, Sensitivität und Genauigkeit sein. Aus diesem Grund wurden in den letzten Jahren zahlreiche Urin-basierte Tumormarker entwickelt, die allein oder in Kombination mit einer anderen Methode die Sensitivität für die Detektion eines Harnblasenkarzinoms erhöhen und eine frühe, nicht invasive Diagnose ermöglichen sollen [52, 59, siehe 6. Appendix Tabelle 15].

Ein solcher neuer Marker könnte das bereits bei verschiedenen Tumorentitäten beschriebene LASP-1 sein [28].

1.2 LASP-1 – Aufbau und Funktion

LASP-1 ist ein Akronym und steht für LIM and SH3 Protein 1. Diese einzigartige Proteinstruktur, bestehend aus einer N-terminalen LIM-Domäne und einer C-terminalen SH3-Domäne, machte LASP-1 zum ersten Vertreter einer neuen Untergruppe der LIM-Domäne-enthaltenden Proteine. Das zugehörige Gen wurde erstmals 1995 von TOMASETTO ET AL. in einer cDNA-Datenbank aus axillären Lymphknotenmetastasen von Brustkrebs identifiziert. Das Gen liegt auf der q12-q21-Region von Chromosom 17, wo auch das c-erbB-2-Proto-onkogen lokalisiert ist, welches in vielen Tumorentitäten, wie zum Beispiel Brustkrebs, amplifiziert ist [90, 91].

Northern Blot Analysen ergaben, dass LASP-1-mRNA in normalem Gewebe ubiquitär auf einem basalen Level vorhanden ist [91]. Eine physiologisch erhöhte Expression von LASP-1 wurde sowohl im zentralen Nervensystem, in sekretorischen Geweben wie den duktalem Epithelzellen des Pankreas und der Parotis als auch im Epithel des distalen Tubulus beziehungsweise des Sammelrohres der Niere, in Leukozyten, in Myoepithelien, und in glatten Gefäßmuskelzellen nachgewiesen [14, 29, 30, 69].

In verschiedenen Tumorentitäten (wie Mammakarzinom, Ovarialkarzinom, Colonkarzinom, hepatozelluläres Karzinom und Medulloblastom) liegt dagegen eine pathophysiologische Überexpression vor [29, 31, 90, 91, 93, 96, 101].

Darüber hinaus wurde in Brustkrebsgewebe eine vermehrte Expression von LASP-1-mRNA und auf Proteinebene festgestellt [29, 91], allerdings ist diese Überexpression nicht auf Genamplifikation zurückzuführen [24].

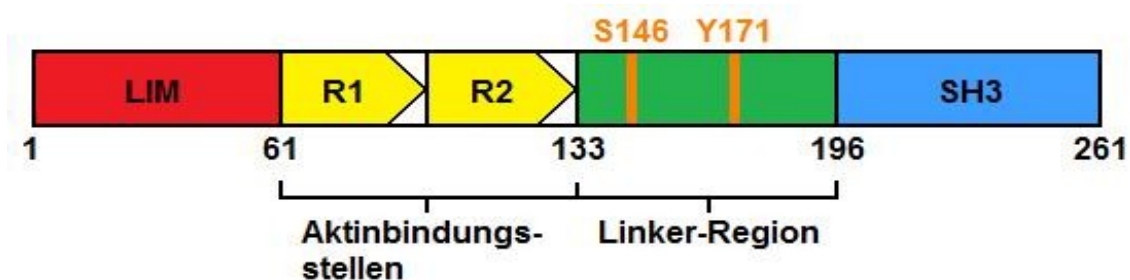


Abbildung 3: Schematische Darstellung der Proteinstruktur von humanem LASP-1
[Abbildung modifiziert nach 28, 83]

LASP-1 besteht aus 261 Aminosäuren und hat ein molekulares Gewicht. Protein-Interaktionen beteiligt [4, 19, 28, 82, 91]. Außerdem konnte nachgewiesen werden, dass das Zink-Finger-Modul der LIM-Domäne morphologisch eine unabhängige Faltungseinheit darstellt, welche möglicherweise direkt an DNA binden könnte [34].

RAMAN ET AL. identifizierten CXCR2, einen Chemokinrezeptor, als Bindungspartner für die LIM-Domäne. LASP-1 scheint hierbei eine Schlüsselkomponente der CXCR2-Chemosynapse darzustellen, wodurch gerichtete Zellmigration ermöglicht wird. Darüber hinaus bindet LASP-1 ebenso die C-terminale Domäne von CXCR1, CXCR3 und CXCR4, weshalb LASP-1 vermutlich als ein genereller Mediator von CXC-Chemokin vermittelter Chemotaxis angesehen werden kann [71].

Der LIM-Domäne folgen zwei Nebulin-ähnliche Aktinbindungsstellen (R1 und R2), welche die Bindung an Aktinfilamente (F-Aktin), jedoch nicht an Aktin-Monomere (G-Aktin), ermöglichen, und somit die direkte Interaktion zwischen LASP-1 und dem Aktinzytoskelett in Zellausläufern, jedoch nicht entlang der Aktinstressfasern, vermitteln [11, 13, 40, 63, 83]. Mittels der Nebulin-ähnlichen Aktinbindungsstellen interagiert LASP-1 auch mit Krp 1, einem fokalen Adhäsionsprotein, was für die Verlängerung von Pseudopodien und der daraus folgenden Gewebeinvasion notwendig zu sein scheint [86].

Wie in Abbildung 3 zu sehen ist, folgt eine Linker-Region mit zwei spezifischen Phosphorylierungsstellen an Serin 146 (S146) und Tyrosin 171 (Y171), über welche die Funktion und Lokalisation von LASP-1 reguliert wird [11, 49]. So resultiert aus der Phosphorylierung an Serin 146 durch cGMP- und cAMP-abhängige Proteinkinasen eine verminderte Affinität zu F-Aktin, die Rückverlagerung des Proteins von den Zellausläufern ins Zytoplasma und eine damit verbundene reduzierte Zellmotilität [11].

In den Parietalzellen des Kaninchens induziert die cAMP-abhängige Phosphorylierung eines Serinrestes die Umverteilung von LASP-1 aus den

basolateralen Membranregionen zu den apikal gelegenen Canaliculi, was letztlich mit einer vermehrten Salzsäuresekretion einhergeht [13, 14, 15, 37].

LIN ET AL. erbrachten den Nachweis, dass DNA-schädigende Substanzen wie Cisplatin und oxidativer Stress die Ablson Tyrosin Kinase aktivieren, wodurch es zur Phosphorylierung von LASP-1 an Tyrosin 171 kommt, was wiederum die Translokation von LASP-1 zu Fokalkontakten in apoptotischen Zellen verhindert. LASP-1 scheint somit am programmierten Zelltod mitzuwirken [49].

Von TRÄNKA ET AL. wurde LASP-1 als Substrat der Src Kinase in Thrombozyten identifiziert. Hierbei findet ebenfalls eine Phosphorylierung von LASP-1 an Tyrosin 171 durch die Src Kinase statt, was zur Verlagerung von LASP-1 vom Zytosol in die Zellperipherie und zu den Fokalkontakten führt [94]. Somit bewirken die Phosphorylierungen an Serin 146 und Tyrosin 171 entgegengesetzte Effekte.

Darüber hinaus fanden PANAVIENE ET AL. heraus, dass die Linker Region notwendig für die Bindung von LASP-1 zu Fokalkontakten ist [66].

Am C-terminalen Ende befindet sich die SH3-Domäne, die über die Bindung an Prolin-reiche Sequenzen mit Palladin, LPP, Prointerleukin-16, VASP, Zyxin und Dynamin interagiert [28, 32, 40, 47, 65, 72, 73]. Über die Interaktion mit Palladin wird die Bindung von LASP-1 an Aktinstressfasern vermittelt [72].

Die exakte Funktion von LASP-1 ist bisher noch nicht vollständig geklärt. Allerdings konnte in mehreren Arbeiten nachgewiesen werden, dass LASP-1 ein Aktin-bindendes Gerüstprotein ist und an dynamischen Aktinverbänden wie Fokalkontakten, Adhärens-Kontakten, Lamellipodien, Filopodien, Pseudopodien und „membrane-ruffles“ beteiligt ist, weshalb es eine essenzielle Rolle in der Organisation des Aktinzytoskeletts während der Zellmigration zu spielen scheint [13, 14, 40, 49, 63, 72, 83, 86, 91]. Die Ergebnisse von NAKAGAWA ET AL. suggerieren, dass LASP-1 als quervernetzendes Protein Aktinbündel stabilisiert, jedoch nicht initiiert [63]. In quergestreiften Muskelzellen wurde LASP-1 bei Überexpression entlang von Z-Scheiben und A-Banden detektiert,

was eine mögliche Funktion als Strukturprotein zur myofilamentären Stabilisierung in kontraktile Zellen impliziert [66]. Im zentralen Nervensystem scheint LASP-1 an der Homozysteinsäure-induzierten Neurotoxizität beteiligt zu sein [85].

Wie eingangs erwähnt, ist LASP-1 in Brustkrebszellen, aber auch im Ovarialkarzinom, im hepatozellulären Karzinom, im Kolonkarzinom und Medulloblastom überexprimiert, was auf eine Funktion im Migrationsprozess neoplastisch veränderter Zellen hinweisen könnte [29, 31, 90, 91, 93, 96, 101]. Diese Vermutung wurde in mehreren Arbeiten bestätigt. So resultierte die Herabregulierung von LASP-1 mittels RNA-Interferenz in Krebszellen in einer verminderten Zellproliferation beziehungsweise Migration, und in einer Akkumulation der Zellen in der G₂-Phase des Zellzyklus, vermutlich bedingt durch die Beeinflussung der Lokalisation von Zyxin [30, 31, 49, 96, 101]. Dementsprechend führte eine künstlich hervorgerufene Überexpression von LASP-1 in nicht neoplastischen Zellen zu einer erhöhten Zellmigration, zu Tumorwachstum und Metastasierung [30, 101].

Darüber hinaus wurde von GRUNEWALD ET AL. gezeigt, dass die Stärke der LASP-1-Expression in Brustkrebszellen signifikant mit der Tumorgroße und dem Lymphknotenstatus korreliert, während zwischen der Überexpression von LASP-1 und dem Grading, der HER-2/neu-, der Östrogenrezeptor- oder der Progesteronrezeptor-Expression kein Zusammenhang besteht. Interessanterweise ist LASP-1 nicht nur im Zytoplasma sondern auch im Zellkern nachweisbar. Auch hier konnte eine Korrelation zwischen nukleärer LASP-1-Lokalisation und der zytosolischen LASP-1-Positivität, der Tumorgroße, dem nodalen Status und eines reduzierten Langzeitüberlebens bestätigt werden. Diese Ergebnisse lassen, neben der wichtigen Rolle bei Proliferation und Migration, auf eine zusätzliche Funktion von LASP-1 als Transkriptionsfaktor oder auch Cofaktor schließen. Nach der Meinung von GRUNEWALD ET AL. könnte LASP-1 möglicherweise als zusätzlicher prädiktiver Marker für Lymphknotenmetastasen beim invasiven Mammakarzinom fungieren

[29], beziehungsweise die nukleare LASP-1-Positivität als negativer prognostischer Indikator für das Langzeitüberleben dienen [24].

WANG ET AL. fanden heraus, dass p53, ein Tumorsuppressorprotein, die Expression von LASP-1 auf Transkriptionsebene reguliert, indem es direkt an den Promotor des LASP-1-Gens bindet. Auf diese Weise ist die LASP-1-Transkription in Anwesenheit von p53 reduziert. Umgekehrt führt eine Mutation, sowie die Inaktivierung oder der Verlust von p53, wie es in vielen Tumorentitäten der Fall ist, zu einer Zunahme der LASP-1-Expression [96]. Auch beim Sonic Hedgehog Signalweg, dessen Kaskade in einer Reihe von Krebsarten gestört ist, wird die Transkription von LASP-1 beeinflusst. Hierbei induziert das Morphogen Sonic Hedgehog über die Signalkaskade die Transkription von LASP-1 [36, 97].

Weitere Beobachtungen unterstützen die Annahme einer wichtigen Rolle von LASP-1 in der Tumorgenese und Metastasierung. So stellt LASP-1 ein Substrat der Abelson Tyrosin Kinase dar, die nachweislich an der Entstehung hämatopoetischer Tumoren, insbesondere der chronisch myeloischen Leukämie beteiligt ist [39, 49]. Auch bei der akuten myeloischen Leukämie wurde eine veränderte LASP-1-Expression in Verbindung mit dem MLL-Gen nachgewiesen. Hierbei kommt es durch Translokation zur Bildung des MLL-LASP-1- Fusionsproteins [87].

E-Cadherin, ein Zell-Zell-Adhäsions- und Tumorsuppressorprotein, welches häufig in Krebszellen verändert ist, beeinflusst ebenfalls die LASP-1-Expression [45, 46].

Außerdem induziert IGF-1, das mit Tumorprogression, Invasion und Metastasierung assoziiert ist, die Expression von LASP-1 [53].

Diese mit unterschiedlichen Ansätzen gewonnenen Einsichten geben starke Hinweise auf eine große Bedeutung von LASP-1 für Proliferation und Migration von Tumoren, aber auch für eine mögliche Funktion als Marker für Tumorgenese und Metastasierung.

1.3 Zielsetzung der Dissertationsarbeit

Grundlage dieser Dissertation bilden die bereits erlangten Erkenntnisse über LASP-1 in anderen Tumorentitäten. Diese sollen auf das Urothelkarzinom der Harnblase übertragen werden. Ziel meiner Laborarbeit war es, die Expression von LASP-1 in Blasenkrebs auf histologischer Ebene zu untersuchen und eine daraus abzuleitende klinische Relevanz im Hinblick auf prognostische oder therapeutische Möglichkeiten zu prüfen, beziehungsweise eine Bedeutung für die histopathologische Befundung zu evaluieren.

Darüber hinaus war ein wichtiges Ziel, LASP-1 nicht nur in histologischen Schnitten sondern auch im Urin mittels Western Blot-Analysen und zytologischer Begutachtung nachzuweisen. Hierbei lag mein besonderes Augenmerk bei der Auswertung darauf, LASP-1 hinsichtlich einer Verbesserung der Sensitivität der Urinzytologie zu beurteilen oder sogar die Nutzung von LASP-1 als möglichen neuen Urin-basierten Tumormarker für das Harnblasenkarzinom abzuwägen.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien und Reagenzien

Artikel:	Firma:
Acrylamidlösung (Rotiphorese® Gel 30)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
antibody diluent	DAKO, Hamburg, Deutschland
Bisacrylamid	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
Bromphenolblau	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
3,3'-Diaminobenzidin (DAB)	DAKO, Hamburg, Deutschland
ECL und ECL plus	Pierce, Rockford IL, USA
Eosin	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
Ethanol	Merck, Darmstadt, Deutschland
Formalin	Merck, Darmstadt, Deutschland
Glycerin	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
Glycin	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
Hämatoxylin	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
2-Mercaptoethanol	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
Methanol	Merck, Darmstadt, Deutschland
Milchpulver (Non-Fat Dry Milk)	BIO-RAD, Hercules CA, USA
Natriumchlorid (NaCl)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
Natriumhydroxid (NaOH)	Merck, Darmstadt, Deutschland

Artikel:	Firma:
Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS) (DulbeccoA)	Oxoid, Hampshire, UK
Ponceau S	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
Proteinstandard (PageRuler™ Prestained Protein Ladder)	Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland
Salzsäure (HCl)	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
Tetramethyldiamin (TEMED)	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
Trichloressigsäure (TCA)	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Triton® X-100	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
Tween 20	Serva GmbH & Co., Heidelberg, Deutschland
Wasserstoffperoxid (H ₂ O ₂)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Xylol	Merck, Darmstadt, Deutschland
Ziegennormalserum	DAKO, Hamburg, Deutschland
Zitronensäuremonohydrat	Merck, Darmstadt, Deutschland

2.1.2 Antikörper

2.1.2.1 Primärantikörper

Bezeichnung:	Antigen:	Typ:	Hersteller:	Verdünnung:
LASP-1	LASP-1	polyklonal; Kaninchen	immunoGlobe, Himmelstadt, Deutschland	1:1000

2.1.2.2 Sekundärantikörper

Bezeichnung:	Markierung:	Hersteller:	Verdünnung:
Goat-anti-rabbit IgG	Meerrettich-Peroxidase	BIO-RAD, Hercules CA, USA	1:5000
LSAB™2 Kit K0675	Meerrettich-Peroxidase	DAKO, Hamburg, Deutschland	nicht notwendig

2.1.3 Verbrauchsmaterialien

Artikel:	Bezeichnung:	Firma:
Cytofunnel mit weißer Filterkarte	Shandon Single White Cytofunnel®	Thermo Electron Corporation
24 mm Deckgläschen		Hartenstein, Würzburg, Deutschland
Eindeckmedium	Pertex®	Medite, Burgdorf, Deutschland
	VitroClud®	Langenbrinck, Emmendingen, Deutschland
Filme für Chemilumineszenz	X-RAY FILM Super RX	FUJI medical GmbH, Düsseldorf, Deutschland
Fixationsmittel	Sprayfix	Medite, Burgdorf, Deutschland
Nitrocellulosemembran	PROTRAN® BA 85 Nitrocellulose Transfer Membrane	Whatman GmbH, Dassel, Deutschland
Objekträger	Superfrost®	Langenbrinck, Emmendingen, Deutschland
		Hartenstein, Würzburg, Deutschland
Pipettenspitzen	TipOne® Filterspitzen	Starlab GmbH, Ahrensburg, Deutschland
Pipettenaufsätze	Costar® Stripette® 2 ml, 10 ml, 25 ml	Corning, New York, USA
Reaktionsgefäße	Standard Reaktionsgefäß 1,5 ml	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
	Röhrchen 15 ml, 50 ml	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Sicherheitshandschuhe	SafeSKIN PFE	Kimberley-Clark, Zaventem, Belgien

2.1.4 Geräte

Gerät:	Bezeichnung:	Firma:
Blockthermostat	Ori-Block 08-1	Techne, Jahnsdorf, Deutschland
Blot-Kammer	TRANS-BLOT™ CELL	BIO-RAD, Hercules CA, USA
Elektrophoresekammer	Spezialanfertigung	Noras, Würzburg, Deutschland
Feinwaagen	Universal und Type 1801	Sartorius, Göttingen, Deutschland
Filmentwickler	X-OMAT M 35	Kodak
Lichtmikroskop	Axiovert 200	ZEISS, Jena, Deutschland
Linearschüttler	Duomax 1030	Heidolph, Düsseldorf, Deutschland
Magnetrührer		IKA, Staufen, Deutschland
Mikroinjektionsspritze	Microliter™ Syringes	Hamilton Bonaduz AG, Bonaduz, Schweiz
Mikrowelle	Samsung Classic Collection M8134	Samsung, Schwalbach, Deutschland
pH-Meter	PHM 82 Standard pH Meter	Radiometer, Kopenhagen, Dänemark
Pipette (elektrisch)	accu-jet® pro	Brand GmbH & Co. KG, Wertheim, Deutschland
Pipette (manuell)	Eppendorf Reference® 2, 100, 1000 µl	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Reaktionsgefäßständer		Brand GmbH & Co. KG, Wertheim, Deutschland
Schüttelgerät	Vortex Genie 2	Bender & Hobein AG, Zürich, Schweiz
Software	GraphPad Prism® 6	
	Microsoft® Office Word 2003	
	Microsoft® Windows™ XP	
Spannungsgerät	Electrophoresis Power Supply EPS 601	GE Healthcare, Chalfont St. Giles, UK Großbritannien
	PowerPac 300	BIO-RAD, Hercules CA, USA
Zentrifuge	Rotina 420	Hettich, Tuttlingen, Deutschland
Zytozentrifuge	Shandon Cytospin® 4	Thermo Fisher Scientific, Waltham MA, USA

2.2 Methoden

2.2.1 Probengewinnung

2.2.1.1 Gewebeproben

Mit Genehmigung der Ethikkommission der Universität Würzburg (Ethikantragsnummer: 130/08) wurde unter Einhaltung des Datenschutzes sowie aller vorgegebenen ethischen Richtlinien für den Umgang mit Patientenmaterial archiviertes, eingefrorenes Blasenkarzinomgewebe und benignes Blasengewebe für immunhistochemische Analysen aus dem Institut für Pathologie der Universität Würzburg bereitgestellt. Das Staging nach der TNM-Klassifikation [siehe 6. Appendix Tabelle 14] und das Grading des Tumors war zuvor von Pathologen des Institutes vorgenommen worden und konnte den dazugehörigen archivierten, pathologischen Befundprotokollen entnommen werden.

Von den Gewebeproben, die aus 26 verschiedenen Blasenkarzinomgeweben unterschiedlicher Stadien von pTa bis pT4 und aus zwei benignen Blasengeweben stammten, wurden Paraffinschnitte angefertigt.

2.2.1.2 Urinproben

In Kooperation mit der Klinik für Urologie der Universität Würzburg wurden nach Zustimmung der Ethikkommission der Universität Würzburg (Ethikantragsnummer: 130/08) und unter Einhaltung aller datenschutzrechtlichen Bestimmungen jeweils 30 ml Spontanurin von 10 Kontrollpersonen und von 10 Patienten mit Blasenkarzinom sowie Harnblasenspülflüssigkeit von 9 Blasenkrebspatienten gesammelt.

Bei allen Urinproben wurde routinemäßig ein Harnscreening durchgeführt. Dabei wurde mittels Teststreifen der pH-Wert, Leukozyten, Nitrit, Glucose, Protein und Erythrozyten bestimmt. Außerdem wurde jeweils eine Urinkultur angelegt.

Von jeder Probe wurden 10 ml für die Western Blot-Analyse und die restlichen 20 ml zur Herstellung von Zytozentrifugenpräparaten verwendet.

2.2.2 Immunhistochemische Methoden

2.2.2.1 Nachweis von LASP-1 in Paraffinschnitten

Um die Paraffinschnitte immunhistochemisch färben zu können, wurden die Objektträger zweimal für 10 min in Xylol, zweimal für 2 min in 100 % Ethanol und in einer absteigenden Alkoholreihe (2 x 96 % Ethanol, 1 x 70 % Ethanol, jeweils kurz) entparaffiniert und hydratisiert. Anschließend wurden die Präparate mit dH₂O gut gespült.

Zur Vorbehandlung wurden die Objektträger in einer Pufferlösung je zweimal 5 min bei 750 W in einer Mikrowelle gekocht. Nachdem die Schnitte 30 min abgekühlt waren, wurden sie mit dH₂O gespült.

<u>Pufferlösung:</u>	Zitronensäuremonohydrat	1 g
	dH ₂ O	500 ml

Durch Zugabe von NaOH wurde der pH auf 6 eingestellt.

Um die endogenen Peroxidase zu blockieren, wurden die Gewebeschnitte 10 min bei Raumtemperatur in 3%iges H₂O₂ in Methanol gestellt.

<u>3%iges H₂O₂ in Methanol:</u>	30 % H ₂ O ₂	30 ml
	Methanol	270 ml

Damit der anti-LASP-1-Antikörper nur an LASP-1-Bindungsstellen bindet, wurden sämtliche unspezifische Antikörper-Bindungsstellen mithilfe eines Proteinblocks neutralisiert. Dies wurde durch die Inkubation der Präparate für 15 min bei Raumtemperatur in Ziegennormalserum in PBS in der Verdünnung 1:5 mit nachfolgendem Abkippen des Proteinblocks erreicht.

<u>Proteinblock (1:5):</u>	Ziegennormalserum	2 ml
	PBS-Lösung	8 ml

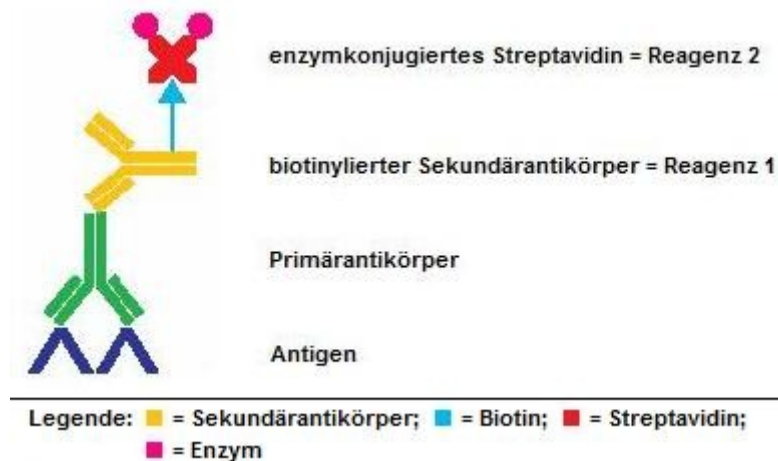


Abbildung 4: schematischer Ablauf der LSAB-Methode

In dieser Arbeit: Antigen = LASP-1; Primärantikörper = anti-LASP-1-Antikörper; Enzym = Meerrettichperoxidase. [Abbildung modifiziert nach 7]

Für die nachfolgende Immunfärbung wurden die Objektträger mit polyklonalen anti-LASP-1-Antikörpern in der Verdünnung 1:1000, gelöst in antibody diluent, über Nacht bei 4 °C inkubiert und darauffolgend mit PBS gewaschen.

Das Nachweissystem LSAB™2 Kit besteht aus 2 Reagenzien, einem biotinylierten Sekundärantikörper (Reagenz 1) und dem Meerrettichperoxidase konjugierten Streptavidin (Streptavidin-HRP = Reagenz 2). Das Prinzip basiert auf der hohen Affinität von Streptavidin zu Biotin.

Zunächst wurde Reagenz 1 aufgetragen, und die Schnitte darin für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert, so dass der biotinmarkierte Zweitantikörper mit dem an LASP-1 gebundenen Primärantikörper reagiert. Nach 15 min wurden die Präparate mit PBS gut gespült. Anschließend wurde mit Reagenz 2 auf dieselbe Weise verfahren, wobei Streptavidin mit seinen 4 Bindungsstellen an Biotin bindet.

Um die stattgefundenen Reaktionen sichtbar zu machen, wurde 3,3'-Diaminobenzidin (DAB) als Chromogen verwendet, welches für die Dauer von 5 min bei Raumtemperatur aufgetragen wurde. DAB fungiert als Substrat für die

Meerrettichperoxidase, woraus eine Braunfärbung resultiert. Der schematische Ablauf der sogenannten LSAB-Methode geht aus Abbildung 4 hervor.

Nach dem Waschen mit PBS, Leitungswasser und dH₂O erfolgte eine Zellkernfärbung mit Hämatoxylin als Gegenfärbung. Dazu wurden die Objektträger für 30 s bei Raumtemperatur in Hämatoxylin getaucht, durch Spülen unter Leitungswasser gebläut und kurz in dH₂O gewaschen. Anschließend wurden die Präparate in einer aufsteigenden Alkoholreihe (1 x 70 % Ethanol, 2 x 96 % Ethanol, 2 x 100 % Ethanol, jeweils kurz) und über Xylol als Intermedium entwässert und mit VitroClud[®] und Deckgläschen eingedeckt.

Parallel dazu wurden nach dem Entparaffinieren und Hydratisieren der Paraffinschnitte Hämatoxylin-Eosin-Färbungen (HE-Färbung) von jedem Schnitt angefertigt. Hierfür wurden die Präparate 5 min in Hämatoxylin gestellt, mit dH₂O gespült, 5 min in Eosin getaucht, kurz in Leitungswasser gewaschen und über die aufsteigende Alkoholreihe und Xylol dehydriert. Abschließend wurden die Präparate mit Deckgläschen gesichert.

2.2.2.2 Zytozentrifugenpräparation

Um eine immunhistochemische Färbung der Zellen im Urin durchführen zu können, mussten die Urinproben mittels Zytozentrifugenpräparation aufbereitet werden. Eine Zytozentrifugation ermöglicht die Herstellung von Präparaten vor allem aus hypozellulären Flüssigkeiten wie zum Beispiel Urin und dient der Zellanreicherung.

Hierfür wurden 20 ml der gesammelten Urinproben 6 min bei 2500 rpm zentrifugiert, und der Überstand anschließend verworfen. Durch Zugabe weniger Tropfen 70%igen Ethanols wurde das Pellet resuspendiert und in die Probenkammer der Cytofunnel[®] überführt. Anschließend wurden die Proben bei 800 bis 1000 rpm für die Dauer von 5 min in der Zytozentrifuge zentrifugiert.

Bei solch geringen Zentrifugalkräften wird ein Zellmonolayer auf einen klar definierten Bereich eines Objektträgers sedimentiert. Restflüssigkeit kann anschließend über die Filterkarte der Probenkammer absorbiert werden.

Aus jeder Urinprobe wurden auf diese Weise vier Zytozentrifugenpräparate hergestellt.

Jeweils zwei der vier Objektträger ließ man nach der Zentrifugation kurz antrocknen, bevor sie in 70%igem Ethanol 5 min lang fixiert wurden. Anschließend wurden die Zytozentrifugenpräparate luftgetrocknet und bei – 20 °C gelagert, um sie dann in einem weiteren Schritt immunhistochemisch gegen LASP-1 zu färben (siehe 2.2.2.3).

Gleichzeitig wurde jeweils von den anderen beiden Zytozentrifugenpräparaten eine Vergleichsaufarbeitung mit HE-Färbung durchgeführt. Hierzu wurden die Präparate mit Sprayfix fixiert, über Nacht luftgetrocknet, anschließend nach Hämatoxylin-Eosin gefärbt und mit Pertex[®] und Deckgläschen eingedeckt. Das Vorgehen bei der HE-Färbung entspricht dem in 2.2.2.1 beschriebenen.

2.2.2.3 Nachweis von LASP-1 in Zytozentrifugenpräparaten

Zu Beginn wurden die Objektträger nach der Zytozentrifugenpräparation zweimal mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Präparate in 4%iges Formalin in PBS 10 min bei Raumtemperatur fixiert, mit dH₂O gewaschen und zur pH-Angleichung kurz mit PBS gespült.

<u>4%iges Formalin in PBS:</u>	40 % Formalin	10 ml
	PBS	90 ml

Um die Zellmembranen zu permeabilisieren wurden die Objektträger für 10 min bei Raumtemperatur in 0,05 % Triton[®] X-100 in PBS gestellt, danach mit PBS gut gewaschen und mit dH₂O gespült.

<u>0,05 % Triton[®] X-100 in PBS:</u>	Triton [®] X-100	100 µl
	PBS	200 ml

Im Anschluss wurde die endogene Peroxidase durch Inkubation in 1%iges H₂O₂ in dH₂O geblockt, mit dH₂O gespült und der pH-Wert durch Waschen mit PBS angeglichen.

<u>1%iges H₂O₂ in dH₂O:</u>	30 % H ₂ O ₂	3 ml
	dH ₂ O	100 ml

Um unspezifische Bindungen des anti-LASP-1-Antikörpers zu verhindern wurden die Präparate mit einem Proteinblock behandelt. Hierfür wurde Ziegennormalserum in PBS in der Verdünnung 1:5 mit 0,025 % Triton[®] X-100 in PBS vermischt, die Objektträger darin 10 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend abgekippt.

<u>Proteinblock (1:5):</u>	wie unter 2.2.2.1 beschrieben	
----------------------------	-------------------------------	--

<u>0,025 % Triton[®] X-100 in PBS:</u>	0,05 % Triton [®] X-100 in PBS	50 ml
	PBS	50 ml

Danach wurde der Primärantikörper im Verhältnis 1:2500 mit PBS verdünnt, mit 0,025 % Triton[®] X-100 in PBS gemischt und die Präparate darin für die Dauer von 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Objektträger mit PBS gut gespült. Der gebundene Primärantikörper konnte durch den Meerrettichperoxidase-gekoppelten Sekundärantikörper und der daraus folgenden Farbreaktion sichtbar gemacht werden. Dazu wurde der Zweitantikörper im Verhältnis 1:100 mit PBS verdünnt und mit 0,025 % Triton[®] X-100 in PBS vermischt. Nach der Inkubation der Präparate für 30 min bei Raumtemperatur mit dem Zweitantikörper wurden die Objektträger mit PBS gewaschen. Als Chromogen wurde DAB verwendet, welches 5 min bei Raumtemperatur auf die Präparate einwirkte, wodurch es zu einer Braunfärbung kam. Anschließend wurden die Objektträger mit PBS, Leitungswasser und dH₂O gespült, mit Hämatoxylin gegengefärbt, über eine aufsteigende Alkoholreihe und Xylol entwässert und letztlich mit VitroClud[®]

eingedeckt. Die einzelnen Schritte entsprachen dem unter 2.2.2.1 ausführlich beschriebenen Vorgehen.

2.2.3 Histopathologische Befundung der LASP-1-Expression

Nach der immunhistochemischen Färbung der Gewebeschnitte wurde die LASP-1-Expression unter Verwendung des LASP-1-Immunreaktiven-Score (LASP-1-IRS) gemäß GRUNEWALD ET AL. klassifiziert [29]. Hierzu wurde jeder Gewebeschnitt von zwei unabhängigen Untersuchern lichtmikroskopisch (mindestens 10 high-power-fields in 40-facher Vergrößerung) begutachtet.

Der LASP-1-IRS, der von Thomas Grunewald in Analogie zum bereits sehr gut etablierten Hormonrezeptor-Immunreaktiven-Score entwickelt wurde, berücksichtigt sowohl Färbeintensität als auch den prozentualen Anteil der gefärbten Zellen und ist somit ein Maß für die Höhe der LASP-1-Expression. Bei der Beurteilung der LASP-1-Expression wurden vier verschiedene Färbeintensitäten unterschieden, wobei jedem Schnitt der entsprechende Punktrangwert von 0 bis 3, der sogenannte LASP-1-Score, zugeordnet wurde. Abbildung 5 (Seite 25) veranschaulicht nochmals die unterschiedlichen LASP-1-Scores.

Der Anteil der LASP-1-positiv gefärbten Zellen wurde ebenfalls in Grade eingeteilt und jedem Schnitt der entsprechende Punktrangwert von 0 bis 4 zugewiesen. In den nachfolgenden Tabellen sind die Zuordnungen von Färbeintensität beziehungsweise Anteil der LASP-1-positiv gefärbten Zellen und dem entsprechenden Punktrangwert aufgeführt.

Der LASP-1-IRS ist das Produkt aus der Multiplikation der beiden Punktrangwerte und generiert einen Wert zwischen 0 und 12.

Tabelle 1: LASP-1-Score

Färbeintensität	LASP-1-Score
keine	0
gering	1
mäßig	2
stark	3

Tabelle 2: Grad-Einteilung des Anteils der LASP-1-positiv gefärbten Zellen

Anteil der LASP-1-positiv gefärbten Zellen in %	Grad
0 – 19	0
20 – 39	1
40 – 59	2
60 – 79	3
80 – 100	4

Zur besseren statistischen Diskriminierung wurden die Gewebeproben mittels LASP-1-IRS in zwei Gruppen getrennt. Schnitte, die einen LASP-1-IRS kleiner als 5 aufwiesen, wurden als LASP-1-negativ und Schnitte mit einem LASP-1-IRS größer als 5 wurden als LASP-1-positiv klassifiziert [29].

Analog zur Einstufung gegen den Proliferationsmarker Ki67 gefärbter Gewebeschnitte wurde bei allen Schnitten der nukleäre Status ermittelt. Jedes Präparat mit mehr als 10 % LASP-1-gefärbten Kernen wurde als Nukleus-positiv bewertet. Die Färbeintensität der Kerne hatte bei der Bestimmung des nukleären Status keine Bedeutung [88].

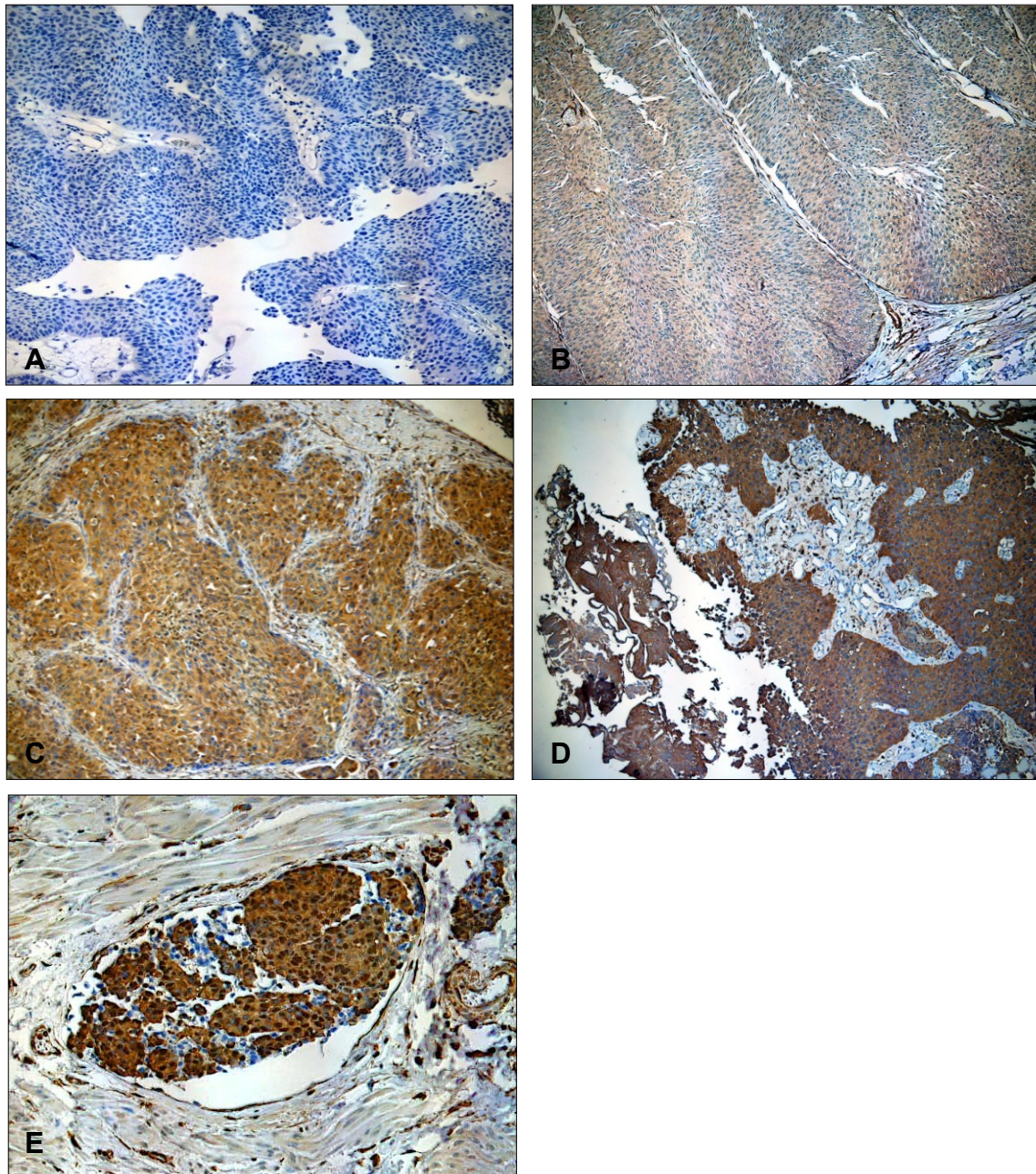


Abbildung 5: Immunhistochemisch gefärbte Blasenschnittpräparate

LASP-1 (braun) und Hämatoxylin (blau) als Gegenfärbung. Unterschiedliche LASP-1-Scores: **A** = LASP-1-Score 0; **B** = LASP-1-Score 1; **C** = LASP-1-Score 2; **D** = LASP-1-Score 3; **E** = positive nukleäre LASP-1-Expression.

2.2.4 Proteinbiochemische Methoden

2.2.4.1 Aufbereitung der Urinproben für die Gel-Elektrophorese

Jeweils 10 ml der Urinproben wurden in der Zentrifuge 10 min bei 3000 rpm pelletiert, damit sich die im Urin enthaltenen Zellen als Sediment am Boden sammelten. Anschließend wurde der Überstand abpipettiert.

Danach wurde das Urinsediment in 100 µl SDS-Stop-Solution resuspendiert und bei 95 °C 5 min erhitzt, um die darin enthaltenen Proteine zu denaturieren und einheitlich mit einer negativen Ladung zu versehen. Dadurch wurden die Proteine bei der nachfolgenden Elektrophorese in einem SDS-haltigen Polyacrylamidgel in der Reihenfolge ihrer molaren Massen aufgetrennt.

<u>SDS-Stop-Solution:</u>	200 mM Tris/HCl pH 6,7
	6 % (w/v) SDS
	15 % (w/v) Glycerin
	10 % (v/v) 2-Mercaptoethanol
	30 µg/ml Bromphenolblau
	ad dH ₂ O

2.2.4.2 Denaturierende Gel-Elektrophorese nach Laemmli (1970) [44]

Für die SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese wurden 9 x 15 cm Minigele mit einer Dicke von 1 mm verwendet, die aus einem Trenngel und einem darüberliegenden Sammelgel bestanden.

<u>10 % Trenngel (ca. 10 ml):</u>	dH ₂ O	5,3 ml
	30 % Acrylamid, 0,8 % Bis-acrylamid	3,3 ml
	3 M Tris/HCl pH 8,9	1,25 ml
	SDS 10 %	0,1 ml
	APS 10 %	0,1 ml
	TEMED	5 µl

<u>Sammelgel (ca. 5 ml):</u>	dH ₂ O	3,6 ml
	30 % Acrylamid, 0,8 % Bis-acrylamid	0,7 ml
	0,5 M Tris/HCl pH 6,7	0,65 ml
	SDS 10 %	50 µl
	APS 10 %	0,2 ml
	TEMED	5 µl

SDS 10 %: 10 % Natriumdodecylsulfat (w/v) in dH₂O
= 10 g Natriumdodecylsulfat in 100 ml dH₂O

APS 10 %: 10 % Ammoniumpersulfat (w/v) in dH₂O
= 1 g Ammoniumpersulfat in 10 ml dH₂O

Nach dem Gießen des Minigels wurde die Gelelektrophoreseapparatur zusammengebaut und mit Elektrophoresepuffer aufgefüllt. Mit Hilfe einer Hamilton-Spritze wurden 2 µl des Proteinstandards und jeweils 10 µl der Proben in die Geltaschen aufgetragen.

<u>Elektrophoresepuffer 10x:</u>	Tris	120 g
	Glycin	576 g
	SDS	40 g
	dH ₂ O	4 l

Für die Elektrophorese wurde die Lösung verdünnt und der pH mit 5 N NaOH auf 8,9 eingestellt.

Anschließend wurde ein elektrisches Spannungsfeld angelegt. Zunächst wurden die denaturierten Proteine bei einer Spannung von 70 V im weitporigen Sammelgel konzentriert, um eine möglichst scharfe Trennung auf dem engporigen Trenngel zu erreichen. Sobald die blaue Farbfront das Trenngel erreicht hatte, wurde die Spannung auf 120 V erhöht, um die Proteine nach ihren molaren Massen aufzutrennen. Die Elektrophorese war beendet, wenn sich die Lauffront am Rand der Glasplatten befand.

2.2.4.3 Western Blot (TOWBIN ET AL. 1979) [92]

2.2.4.3.1 Transfer auf die Nitrocellulosemembran

Nach der Elektrophorese wurde das Polyacrylamidgel vorsichtig aus den Platten gelöst, und das Sammelgel vom Trenngel getrennt. Die Nitrocellulosemembran wurde auf die Größe des Gels geschnitten. Anschließend wurden in einer Schale mit Transferpuffer die einzelnen Lagen zwischen den Platten in der Reihenfolge Kunststoffvlies, Blottingpapier, Nitrocellulosemembran, Polyacrylamidgel, Blottingpapier, Kunststoffvlies luftblasenfrei übereinander geschichtet. Danach wurde die Platte in die mit Transferpuffer gefüllte Blotkammer auf die Weise eingesetzt, dass die Nitrocellulosemembran auf der Seite des Pluspols lag. Nach dem Anlegen eines elektrischen Spannungsfeldes wurden die Proteine bei einer Stromstärke von 2 A für 60 min im Kühlraum vom Polyacrylamidgel auf die Nitrocellulosemembran übertragen.

<u>Transferpuffer:</u>	25 mM Tris	15 g
	192 mM Glycin	72 g
	20 % Methanol	1 l
	dH ₂ O	5 l

Durch Zugabe von 26,5 g NaOH-Plätzchen wurde der pH auf 10 eingestellt.

2.2.4.3.2 Anfärbung der Proteine auf der Nitrocellulose

Mithilfe der Ponceau-Färbung können Proteine auf der Nitrocellulosemembran sichtbar gemacht und die Transfereffizienz überprüft werden. Dazu wurde die Nitrocellulose mit Ponceau S in einer kleinen Schale ca. 1 min gefärbt und der Hintergrund durch Waschen mit dH₂O wieder entfärbt, so dass nur noch die eingefärbten Banden zu sehen waren. Zur Dokumentation wurde die Nitrocellulosemembran fotokopiert.

Anschließend wurden die eingefärbten Banden durch Waschen mit TBS wieder vollständig entfärbt.

<u>Ponceau S:</u>	Trichloressigsäure	10 g
	Ponceau S	1 g
	dH ₂ O	200 ml

<u>TBS (Tris buffered saline) 10x:</u>	Tris	24,2 g
	NaCl	17,3 g
	dH ₂ O	2 l

Der pH-Wert wurde auf 7,5 eingestellt.

2.2.4.3.3 Detektion spezifischer Proteine mit Antikörpern

Nach dem Transfer wurden die noch freien Stellen auf der Nitrocellulosemembran mit Blockmedium abgesättigt, indem die Membran für 1 h bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4 °C in dem Blockmedium geschüttelt wurde. Anschließend wurde die Nitrocellulosemembran mit dem in TBS/T/Milk verdünnten Primärantikörper für 1 h bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4 °C inkubiert. Nach der Inkubation wurde die Nitrocellulose dreimal für jeweils 5 min mit TBS/T gewaschen. Der gebundene Primärantikörper konnte durch einen Peroxidase-gekoppelten Sekundärantikörper und nachfolgender Chemilumineszenz-Reaktion nachgewiesen werden. Dazu wurde der Zweitantikörper im Verhältnis 1:5000 mit TBS/T/Milk verdünnt, und die Nitrocellulosemembran für 1 h bei Raumtemperatur darin inkubiert. Nach weiterem dreimaligen Waschen mit TBS/T für jeweils 5 min wurde die Membran 1 min mit ECL-Detektionsmix bedeckt. Im Anschluß ließ man die Nitrocellulose gut abtropfen, legte sie zwischen zwei Klarsichtfolien und exponierte sie im Dunkelraum für einige Sekunden bis zu mehreren Minuten einem ECL-Film, der dann sofort entwickelt wurde.

Blockmedium: 3 % (w/v) fettfreies Milchpulver in TBS
= 3 g fettfreies Milchpulver in 100 ml TBS

TBS/T: 0,1 % Tween in TBS
= 1 ml Tween in 100 ml TBS in 900 ml dH₂O

TBS/T/Milk: 3 % (w/v) fettfreies Milchpulver in TBS/T
= 3 g fettfreies Milchpulver in 100 ml TBS/T

ECL-Detektionsmix: 50 % (v/v) ECL-Reagenz 1
(Verhältnis 1:1) 50 % (v/v) ECL-Reagenz 2

2.2.5 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung wurde unter Zuhilfenahme der Computersoftware, GraphPad Prism^{®6} für Windows, durchgeführt. Hierbei kamen der Fisher's exact test, der Kruskal-Wallis-Test und der Mann-Whitney-Test zur Anwendung. P-Werte, die kleiner als 0,05 waren, wurden als statistisch signifikant betrachtet.

3. ERGEBNISSE

3.1 Blasenschnittpräparate

3.1.1 LASP-1 ist überexprimiert im Urothelkarzinom der Harnblase

Wie unter 2.2.1.1 und 2.2.2.1 beschrieben wurden für die Beurteilung der LASP-1-Expression in Blasenkarzinomgewebe aus 26 Gewebeproben unterschiedlicher Tumorstadien von pTa bis pT4 und aus zwei benignen Blasengeweben Paraffinschnitte gefertigt und immunhistochemisch gefärbt. Anschließend wurden die Schnitte mit Hilfe des LASP-1-IRS von zwei Untersuchern unabhängig voneinander histopathologisch befundet (siehe Methodenteil 2.2.3).

Bei der Auswertung zeigte sich, dass alle 26 Tumorgewebeproben LASP-1-positiv gefärbte Zellen enthalten. In 22 Schnitten waren 80 bis 100 % der Zellen LASP-1-positiv gefärbt, was dem Grad 4 entspricht. Bei drei Präparaten konnten 60 bis 79 % gegen LASP-1 gefärbte Zellen festgestellt werden (Grad 3), und eine Probe war nur zu 40 bis 59 % LASP-1-positiv gefärbt (Grad 2). Im Gegensatz hierzu wurden in den zwei Schnitten aus benignem Blasengewebe keine LASP-1-positiven Zellen nachgewiesen (Abbildung 9 A auf Seite 32).

Die meisten Proben aus malignem Blasengewebe zeigten eine mäßige Färbeintensität, weshalb sie mit einem LASP-1-Score von 2 beurteilt wurden. Zwei Präparate wiesen eine starke Färbung auf (LASP-1-Score 3); vier Schnitte hingegen nur eine geringe Färbung (LASP-1-Score 1).

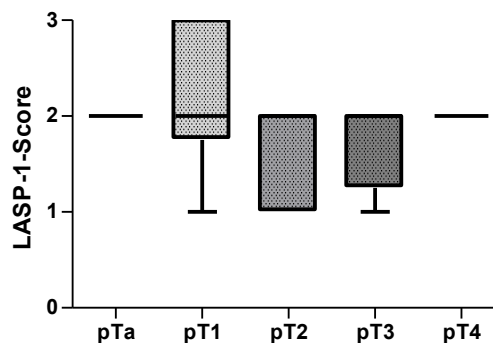


Abbildung 6: Graphische Darstellung der Verteilung der LASP-1-Scores in den unterschiedlichen Tumorstadien

Unter Zuhilfenahme des Kruskal-Wallis-Tests konnte ein P-Wert von 0,4236 (P-Wert > 0,05) berechnet werden. Folglich besteht keine statistisch signifikante Korrelation zwischen Färbeintensität und Tumorstadium, was Abbildung 6 illustriert (siehe auch Abbildung 9 B – F auf Seite 32).

Der höchste LASP-1-IRS war 12 und wurde von zwei Präparaten erreicht. Am häufigsten wurde ein LASP-1-IRS von 8 vergeben. Zwei weitere Schnitte wurden mit einem LASP-1-IRS von 6 bewertet. Die restlichen vier Gewebeproben erhielten einen LASP-1-IRS zwischen 2 und 4. Somit hatten 22 von insgesamt 26 Präparaten einen LASP-1-IRS größer 5 und wurden deshalb durch die Einteilung der Proben in zwei Gruppen in Abhängigkeit vom erreichten LASP-1-IRS als LASP-1-positiv befundet. Dieses Ergebnis entspricht einem Anteil von 84,6 %. In Tabelle 3 und Abbildung 7 sind diese Ergebnisse zusammengefasst.

Tabelle 3: Verteilung der LASP-1-Expression, statistische Auswertung

n = Anzahl; SD = Standardabweichung

	LASP-1-positiv		LASP-1-negativ		IRS Mittelwert	IRS SD	IRS Median
	n	%	n	%			
kein Blasen-Ca n = 2	0	0	2	100	0	0	0
Blasen-Ca n = 26	22	84,6	4	15,4	7,42	2,23	8

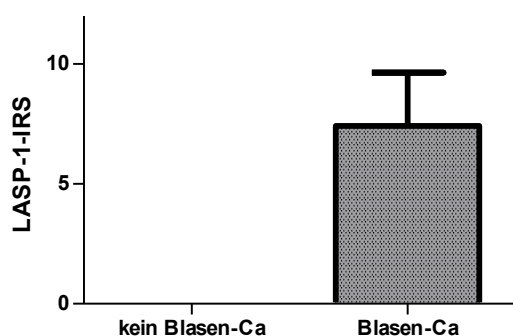


Abbildung 7: arithmetisches Mittel des LASP-1-IRS mit Standardabweichung

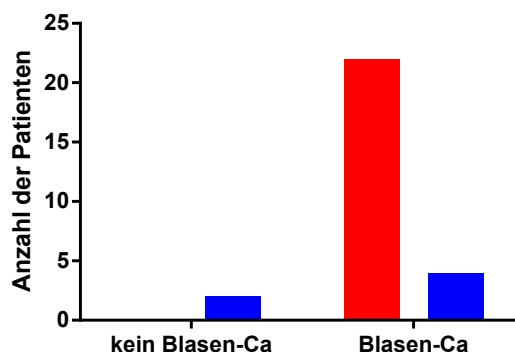


Abbildung 8: graphische Darstellung der Verteilung der LASP-1-Expression.
rot = LASP-1-positiv; blau = LASP-1-negativ

Eine statistische Analyse mittels Fisher's exact test ergab einen P-Wert von 0,0397, damit exprimieren Urothelkarzinome signifikant (P -Wert $< 0,05$) mehr LASP-1 als gesundes Blasengewebe. Dies verdeutlicht die graphische Darstellung in Abbildung 8.

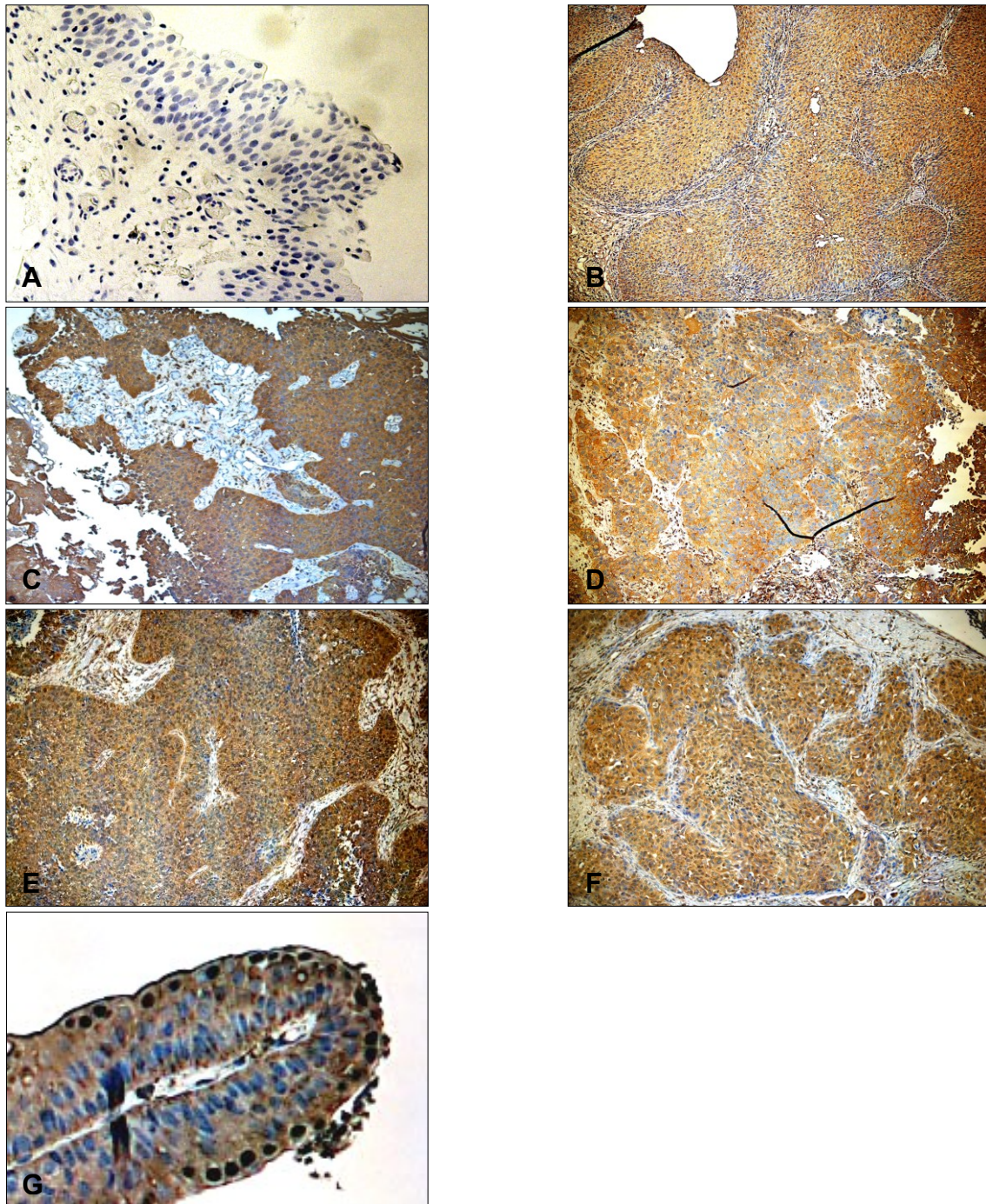


Abbildung 9: Immunhistochemische LASP-1-Färbung von Blasenschnittpräparaten
 LASP-1 (braun) und Hämatoxylin (blau) als Gegenfärbung. **A** = Negativkontrolle; **B – F** zeigen einen LASP-1-Score von 2, jedoch in unterschiedlichen Tumorstadien: **B** = pTa; **C** = pT1; **D** = pT2; **E** = pT3; **F** = pT4; **G** = Präparat mit positivem nukleärem Status.

Ein positiver nukleärer Status wurde nur in einer der insgesamt 26 Tumorproben gefunden. Interessanterweise zeigten vor allem die äußeren Zellen eine LASP-1-positive Kernfärbung (Abbildung 9 G auf Seite 32).

3.1.2 Beurteilung der Aussagekraft des LASP-1-IRS

Aufgrund der nachgewiesenen LASP-1-Überexpression in den histologischen Blasenschnitten der Urothelkarzinome wurde mittels einer Vier-Felder-Tafel (Tabelle 4) Sensitivität, Spezifität sowie positiver und negativer Prädiktwert errechnet, um auf diese Weise die Aussagekraft des LASP-1-IRS in Bezug auf das Vorliegen eines Harnblasenkarzinoms zu überprüfen.

Tabelle 4: Vier-Felder-Tafel

	Blasen-Ca	kein Blasen-Ca	
LASP-1-positiv	22 (= A)	0 (= B)	22 (= A+B)
LASP-1-negativ	4 (= C)	2 (= D)	6 (= C+D)
	26 (= A+C)	2 (= B+D)	28 (= A+B+C+D)

Sensitivität = $A / (A+C)$ = 84,6 %

Spezifität = $D / (B+D)$ = 100 %

Positiver Prädiktwert = $A / (A+B)$ = 100 %

Negativer Prädiktwert = $D / (C+D)$ = 33,3 %

Die Sensitivität gibt an, mit welcher Wahrscheinlichkeit ein Marker oder Test (hier die LASP-1-Positivität) bei Vorliegen einer Krankheit (hier das Vorliegen eines Urothelkarzinoms der Harnblase) auch wirklich anspricht, oder - konkret formuliert - kranke Patienten als krank identifiziert. Diese Sensitivität entspricht in der hier durchgeführten Untersuchungsreihe 84,6 %. Das bedeutet, dass in 84,6 % der Fälle ein Urothelkarzinom mittels LASP-1-IRS erkannt wird.

Die Spezifität ist definiert als die Wahrscheinlichkeit, mit der ein Test (hier auf LASP-1-Positivität) einen tatsächlich negativen Sachverhalt (hier kein Urothelkarzinom der Blase) auch durch ein negatives Testergebnis widerspiegelt. Die Spezifität zeigt also an, wie viele gesunde Patienten als gesund vom Test erkannt werden. In dem vorliegenden Fall liegt die Spezifität bei 100 %.

Der positive Prädiktwert ist ein Maß für die Wirksamkeit eines Tests. Er bezeichnet die Wahrscheinlichkeit, mit der ein positives Testergebnis auch tatsächlich auf einer Erkrankung beruht. Für die LASP-1-Positivität zur Erkennung eines Urothelkarzinoms der Harnblase beträgt der positive prädiktive Wert 100 %. Das heißt, dass es sich bei einem LASP-1-positiv gefärbten Blasenschnitt mit 100%iger Wahrscheinlichkeit um ein Urothelkarzinom handelt.

Die Wahrscheinlichkeit, dass ein negatives Testergebnis auch wirklich negativ ist, wird negativer Prädiktwert genannt. Das bedeutet in diesem Fall, dass der negative prädiktive Wert die Wahrscheinlichkeit angibt, bei nachgewiesener LASP-1-Negativität auch tatsächlich nicht an einem Blasenkarzinom erkrankt zu sein (hier 33 %). Im Umkehrschluss bedeutet das jedoch, dass sich in 67 % der Fälle hinter einem LASP-1-negativ gefärbten Blasenschnitt doch ein Urothelkarzinom verbirgt.

3.1.3 Keine Korrelation zwischen LASP-1-Expression und verschiedener klinisch-pathologischer Parameter

Die Ergebnisse der histopathologischen Befundung wurden statistisch analysiert und mit Parametern wie Tumorstadium, Nodalstatus, Lymphgefäßeinbruch, venöser Gefäßeinbruch, Grading und nukleärer LASP-1-Lokalisation in Relation gesetzt.

Wie Tabelle 5 zeigt, waren alle mittels Fisher's exact test und Mann-Whitney-Test berechneten P-Werte größer 0,05. Somit ergaben die Auswertungen keine statistisch signifikante Korrelation zwischen der zytosolischen LASP-1-Expression und den untersuchten klinisch-pathologischen Parametern.

Tabelle 5: Korrelation der LASP-1-Expression zu verschiedenen klinisch-pathologischen Parameter; statistische Auswertung. n = Anzahl; FET = Fisher's exact test; MWT = Mann-Whitney-Test

		Total	LASP-1-positiv		LASP-1-negativ		P-Wert
			n	%	n	%	
Tumor-stadium	< pT2	11	10	90,9	1	9,1	0,6137 (FET)
	≥ pT2	15	12	80	3	20	
Nodalstatus	N0	11	10	90,9	1	9,1	0,1000 (MWT)
	N1	2	2	100	0	0	
	N2	3	2	66,7	1	33,3	
Lymphgefäß-einbruch	L0	11	10	90,9	1	9,1	0,5459 (FET)
	L1	8	6	75	2	25	
venöser Gefäß-einbruch	V0	12	11	91,7	1	8,3	0,5232 (FET)
	V1	7	5	71,4	2	28,6	
Grading	G1	1	1	100	0	0	0,4000 (MWT)
	G2	10	8	80	2	20	
	G3	15	13	86,7	2	13,3	
nukleäre Lokalisation	⊕	1	1	100	0	0	1,0000 (FET)
	⊖	25	21	84	4	16	

3.2 Western Blot-Analyse der Urinproben

Um zu untersuchen, ob LASP-1 in Urin nachweisbar ist, wurden, wie im Methodenteil unter 2.2.1.2 und 2.2.4 beschrieben, Urinproben gesammelt und Western Blots durchgeführt.

3.2.1 LASP-1 ist im Urin von Kontrollpersonen nicht nachweisbar

Die Auswertung des Western Blots zeigt, dass in keiner der 10 Kontrollurinproben LASP-1 nachgewiesen werden konnte (Abbildung 10).

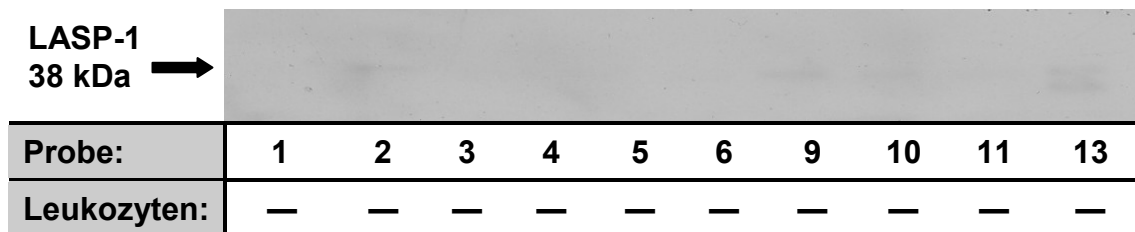


Abbildung 10: Western Blot aus Spontanurinproben von Kontrollpersonen. Zum direkten Vergleich der Ergebnisse des Western Blots und des Leukozytennachweises in der Probe wurde sowohl ein positiver (+) als auch negativer (—) Nachweis mittels Teststreifen in die Abbildung aufgenommen.

3.2.2 Western Blot-Analyse aus Harnblasenspülflüssigkeitsproben von Blasenkarzinompatienten

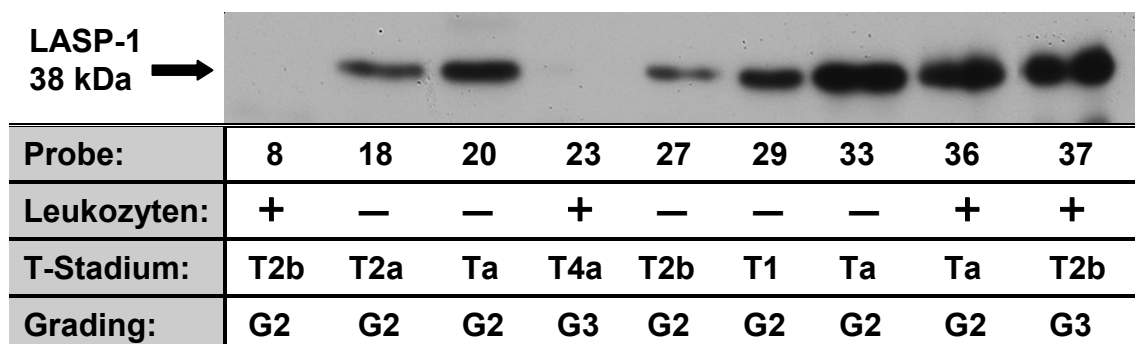


Abbildung 11: Western Blot aus Harnblasenspülflüssigkeitsproben von Blasenkarzinompatienten. Zum direkten Vergleich der Ergebnisse des Western Blots und des Leukozytennachweises in der Probe wurde sowohl ein positiver (+) als auch negativer (—) Nachweis mittels Teststreifen in die Abbildung aufgenommen.

7 der insgesamt 9 Blasenpülproben von Blasenkarzinompatienten zeigten im Western Blot eine deutliche LASP-1-Positivität (Abbildung 11).

GRUNEWALD ET AL. haben erkannt, dass LASP-1 auch in Leukozyten überexprimiert ist [28], so dass bei zwei Proben (Probe 36 und 37) die LASP-1-Positivität des Western Blots möglicherweise durch die im Urin vorhandenen Leukozyten hervorgerufen worden sein könnte.

Im Gegensatz dazu waren bei den 5 restlichen im Western Blot LASP-1-positiven Proben keine Leukozyten in der Harnblasenspülflüssigkeit nachweisbar, so dass die LASP-1-Positivität in diesen Fällen sehr wahrscheinlich auf LASP-1-überexprimierende Tumorzellen zurückzuführen ist. Interessanterweise konnte bei den Proben 8 und 23 trotz Leukozytennachweises mittels Teststreifen in der Blasenpülflüssigkeit keine LASP-1-Positivität im Western Blot gefunden werden.

Vergleicht man den Western Blot mit den Tumorstadien und dem Grading, lässt sich keine Korrelation zwischen der nachgewiesenen Intensität der LASP-1-Expression im Western Blot und dem Tumorstadium, beziehungsweise dem Grading erkennen.

3.2.3 Western Blot-Analyse aus Spontanurinproben von Blasenkarzinompatienten

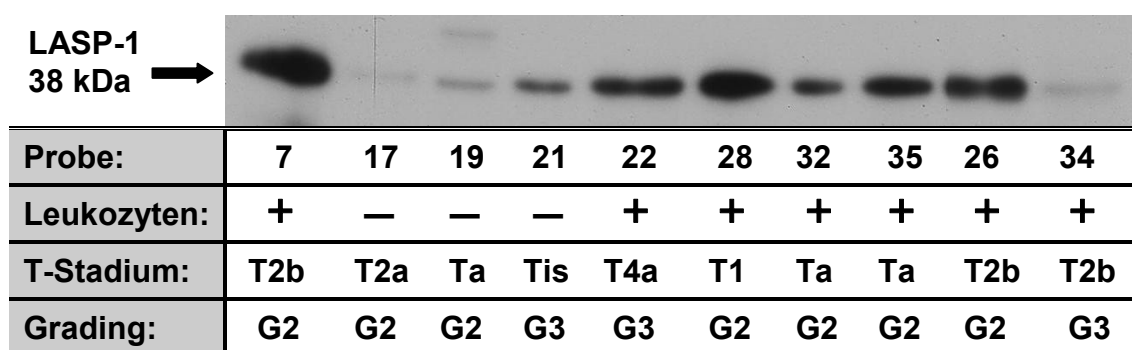


Abbildung 12: Western Blot aus Spontanurinproben von Blasenkarzinompatienten. Zum direkten Vergleich der Ergebnisse des Western Blots und des Leukozytennachweises in der Probe wurde sowohl ein positiver (+) als auch negativer (-) Nachweis mittels Teststreifen in die Abbildung aufgenommen.

Wie Abbildung 12 zeigt, sind 7 der insgesamt 10 Spontanurinproben von Blasenkarzinompatienten im Western Blot deutlich und 2 Proben nur sehr leicht LASP-1-positiv. Probe 17 wurde als negativ befundet.

Im Vergleich zum Western Blot von Harnblasenspülflüssigkeitsproben wurden hier nur 2 Proben (Probe 19 und 21) positiv auf LASP-1 im Western Blot und gleichzeitig negativ auf Leukozyten im Urin getestet. Die restlichen 6 LASP-1-positiven Proben wiesen hingegen Leukozyten im Urin auf. Diese Beobachtung lässt einen Zusammenhang zwischen der LASP-1-Positivität im Western Blot und eines positiven Leukozytennachweises im Urin annehmen, so dass Leukozyturie sehr wahrscheinlich für falsch positive Ergebnisse verantwortlich sein könnte.

Beim Vergleich der nachgewiesenen Intensität der LASP-1-Expression im Western Blot mit dem Tumorstadium und dem Grading kann auch hier kein Zusammenhang festgestellt werden.

3.2.4 LASP-1 ist im Urinsediment von Blasenkarzinompatienten nachweisbar

Wie man der Tabelle 7 und 8 entnehmen kann, ist bei Blasenkarzinompatienten LASP-1 im Urin signifikant häufiger (P -Werte $< 0,05$) mittels Western Blot nachweisbar als bei gesunden Kontrollpersonen. Darüber hinaus wurden Sensitivität, Spezifität, positiver und negativer Prädiktivwert sowohl für die Harnblasenspülflüssigkeit als auch für die Spontanurinproben ermittelt und mit Hinblick auf die Validität des Tests gegenübergestellt.

Tabelle 6: Zusammenstellung der Western Blot-Ergebnisse. n = Anzahl

	Western Blot LASP-1-positiv		Western Blot LASP-1-neaktiv	
	n	%	n	%
Kontrollproben n = 10	0	0	10	100
Harnblasenspülflüssigkeitsproben n = 9	7	77,8	2	22,2
Spontanurinproben n = 10	9	90	1	10

Tabelle 7: Auswertung für Harnblasenspülflüssigkeitsproben.
FET = Fisher's exact test

Sensitivität	= 77,8 %
Spezifität	= 100 %
Positiver Prädiktivwert	= 100 %
Negativer Prädiktivwert	= 83,3 %
P-Wert (FET)	= 0,0007

Tabelle 8: Auswertung für Spontanurinproben.
FET = Fisher's exact test

Sensitivität	= 90 %
Spezifität	= 100 %
Positiver Prädiktivwert	= 100 %
Negativer Prädiktivwert	= 90,9 %
P-Wert (FET)	= 0,0001

Die Gesamtsensitivität der Western Blots beträgt 84,2 %. Vergleicht man die Auswertung der Harnblasenspülflüssigkeit mit der Auswertung der Spontanurinproben anhand der obigen Tabellen, so stellt man fest, dass in Spontanurinproben ein Urothelkarzinom zu 90 % mittels Western Blot detektiert wird, während bei Harnblasenspülflüssigkeitsproben nur in 77,8 % der Fälle das Vorliegen eines Urothelkarzinoms mittels Western Blot-Analyse erkannt wird.

Die Tabellen 7 und 8 verdeutlichen nochmals, dass eine LASP-1-Positivität im Western Blot sowohl bei den Harnblasenspülflüssigkeitsproben als auch bei den Spontanurinproben mit einer Wahrscheinlichkeit von 100 % auf ein Harnblasenkarzinom hinweist (Positiver Prädiktivwert = 100 %).

Auch in Bezug auf die Spezifität sind beide Probenarten vergleichbar. Das heißt, von beiden Probenarten werden gesunde Patienten mit einer Wahrscheinlichkeit von 100 % durch ein negatives Ergebnis im Western Blot als gesund erkannt.

Anders verhält es sich beim negativen Prädiktivwert. Während bei den Spontanurinproben in 90,9 % der Fälle eine LASP-1-Negativität im Western Blot auf dem Fehlen eines Urothelkarzinoms basiert, lässt sich bei der Harnblasenspülflüssigkeit nur in 83,3 % ein negatives Testergebnis im Western Blot auch tatsächlich auf einen negativen Befund zurückführen. Das bedeutet, dass bei ausschließlicher Untersuchung der Harnblasenspülflüssigkeit ein Restrisiko von 16,7 % verbleibt, trotz eines negativen Ergebnisses an Blasenkrebs erkrankt zu sein.

3.3 Auswertung der Zytozentrifugenpräparate

Wie unter 2.2.1.2, 2.2.2.2 und 2.2.2.3 beschrieben, wurden aus den Urinproben Zytozentrifugenpräparate gefertigt, immunhistochemisch gegen LASP-1 sowie Hämatoxylin-Eosin gefärbt und von zwei Untersuchern unabhängig voneinander befundet.

Bei der lichtmikroskopischen Begutachtung der Präparate fanden sich neben Tumorzellen unter anderem auch normale Urothelien, Plattenepithelien und Granulozyten (Abbildung 13).

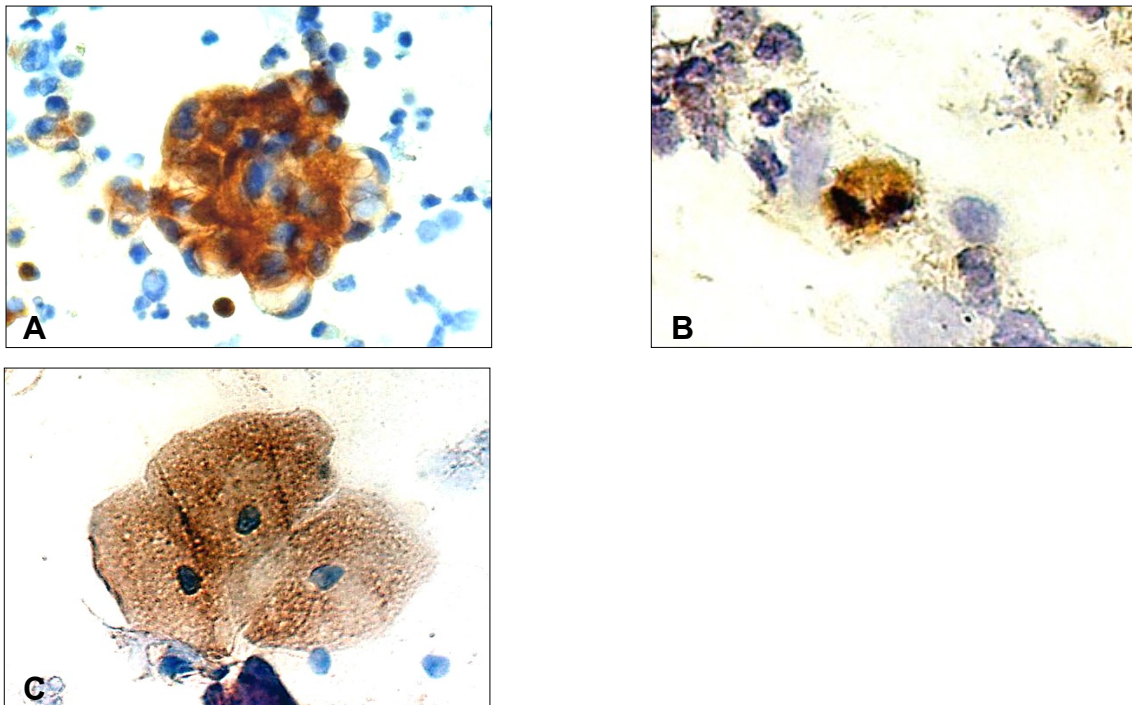


Abbildung 13 : Immunhistochemische Färbung gegen LASP-1 von Zytozentrifugenpräparaten. LASP-1 (braun) und Hämatoxylin (blau) als Gegenfärbung. **A** = LASP-1-positiv gefärbte Tumorzellen; **B** = LASP-1-positiv gefärbter Granulozyt; **C** = LASP-1-positiv gefärbte Plattenepithelien.

3.3.1 Zytozentrifugenpräparate aus Spontanurin von Kontrollpersonen

In den angefertigten Zytozentrifugenpräparaten aus Spontanurin gesunder Probanden wurden keine LASP-1-positiv gefärbten Zellen nachgewiesen. Darüber hinaus enthielt keine der 10 Proben nach zytologischen

Kriterien eine Tumorzelle, so dass alle 10 Proben als Negativkontrollen geeignet waren.

3.3.2 Zytozentrifugenpräparate aus Harnblasenspülflüssigkeitsproben von Blasenkarzinompatienten

Von den insgesamt 9 Zytozentrifugenpräparaten konnten nur in 5 Proben maligne Zellen bestätigt werden. Jedes dieser 5 Präparate enthielt LASP-1-negative Tumorzellen, aber nur 3 Proben wiesen zusätzlich auch LASP-1-positive Tumorzellen auf. In den restlichen 4 der 9 Zytozentrifugenpräparaten konnten nach zytologischen Kriterien überhaupt keine entarteten Zellen gefunden werden.

Darüber hinaus wurden in 5 Präparaten sowohl LASP-1-negative als auch LASP-1-positive Granulozyten erkannt. LASP-1-positive gesunde Urothelien konnten ebenfalls in 2 Proben nachgewiesen werden.

3.3.3 Zytozentrifugenpräparate aus Spontanurinproben von Blasenkarzinompatienten

Im Gegensatz zu den Zytozentrifugenpräparaten aus Harnblasenspülflüssigkeit wiesen nur 4 der insgesamt 10 Präparate aus Spontanurin maligne Zellen auf, die allerdings nur in 2 Proben tatsächlich LASP-1-positiv gefärbt waren.

Auch hier konnten in der Hälfte der Präparate LASP-1-positive und LASP-1-negative Granulozyten bestätigt werden. Des Weiteren fand man in zwei Proben gegen LASP-1 gefärbte gesunde Urothelien und Plattenepithelien.

Interessanterweise waren in allen Präparaten mit LASP-1-positiven Zellen niemals alle Zellen gefärbt, sondern immer nur einzelne LASP-1-positive zwischen LASP-1-negativen auffindbar.

3.3.4 Keine Verbesserung der Sensitivität der Urinzytologie durch immunhistochemische Färbung gegen LASP-1

Aufgrund der immunhistochemischen Ergebnisse der histologischen Blasenschnitte wurde bei der statistischen Auswertung der Zytozentrifugenpräparate die Hypothese zugrunde gelegt, dass der Nachweis von LASP-1 in Urothelien auf eine neoplastische Veränderung hinweist. Deshalb wurden alle Präparate mit LASP-1-positiven Urothelien, ungeachtet zytologischer Malignitätskriterien, als Nachweis für ein Urothelkarzinom angenommen.

Tabelle 9: Zusammenstellung der Ergebnisse der anti-LASP-1-gefärbten Zytozentrifugenpräparate. n = Anzahl

	Zytologie LASP-1-positiv		Zytologie LASP-1-neaktiv	
	n	%	n	%
Kontrollproben n = 10	0	0	10	100
Harnblasenspülflüssigkeitsproben n = 9	4	44,4	5	55,6
Spontanurinproben n = 10	3	30	7	70

Tabelle 20: Zusammenstellung der Ergebnisse der HE-gefärbten Zytozentrifugenpräparate. n = Anzahl

	Zytologie HE - positiv		Zytologie HE - negativ	
	n	%	n	%
Kontrollproben n = 10	0	0	10	100
Harnblasenspülflüssigkeitsproben n = 9	5	55,6	4	44,4
Spontanurinproben n = 10	4	40	6	60

Die Auswertung (Tabelle 11 und 12) verdeutlicht, dass die Sensitivität für die Urinzytologie mit immunhistochemischer Färbung mit einem Wert von 36,8 % nur sehr gering ist. Verglichen mit der ermittelten Sensitivität für die Urinzytologie mit HE-Färbung (Sensitivität = 47,4 %) erkennt die Urinzytologie mit anti-LASP-1-Färbung in 10,6 % der Fälle seltener das zugrundeliegende Urothelkarzinom. Deshalb wird durch eine immunhistochemische Färbung gegen LASP-1 keine Verbesserung der Sensitivität der Urinzytologie in Bezug auf die Diagnostik eines Urothelkarzinomes erzielt.

Auch der negative Prädiktivwert für die immunhistochemisch gefärbten Präparate ist mit 45,5 % niedriger als der Wert für die HE-gefärbten Präparate. Bei der zytologischen Begutachtung mittels Immunhistochemie besteht also ein um 4,5 % höheres Restrisiko, trotz negativen Testergebnisses an Blasenkrebs zu leiden als unter Verwendung der klassischen HE-Färbung.

Tabelle 11: Auswertung der anti-LASP-1-gefärbten Zytozentrifugenpräparate

Sensitivität	= 36,8 %
Spezifität	= 100 %
Positiver Prädiktivwert	= 100 %
Negativer Prädiktivwert	= 45,5 %

Tabelle 12: Auswertung der HE-gefärbten Zytozentrifugenpräparate

Sensitivität	= 47,4 %
Spezifität	= 100 %
Positiver Prädiktivwert	= 100 %
Negativer Prädiktivwert	= 50 %

3.4 Vergleich der Western Blot-Analyse mit den Zytozentrifugenpräparaten

Die Ergebnisse der Western Blot-Analyse und der zytologischen Befundung der Zytozentrifugenpräparate wurden miteinander verglichen, um die Ergebnisse der Western Blot-Analyse zu verifizieren.

3.4.1 Vergleich der Western Blot-Analyse und der Zytozentrifugenpräparate aus Spontanurin von Kontrollpersonen

Die Auswertung ergab weder im Western Blot noch in den Zytozentrifugenpräparaten einen Nachweis von LASP-1, beziehungsweise LASP-1-positiver Zellen (Abbildung 14). Dies bestätigt das Ergebnis aus der histologischen Untersuchung, dass LASP-1 in gesundem Blasengewebe nicht überexprimiert ist.

LASP-1 38 kDa →										
Probe:	1	2	3	4	5	6	9	10	11	13
Leukozyten:	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Tumorzellen:	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Granulozyten:	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Urothelien:	L _n	L _n	—	L _n	L _n	—	L _n	L _n	L _n	L _n
Plattenepithelien:	—	L _n	—	—	—	—	—	—	L _n	L _n

Abbildung 14: Western Blot und Ergebnisse der Zytozentrifugenpräparate aus Spontanurinproben von Kontrollpersonen. — = keine Zellen nachweisbar; L_n = LASP-1-negativ; L_p = LASP-1-positiv; L_{p/n} = LASP-1-positiv und LASP-1-negativ; Leukozytennachweis mittels Teststreifen, Granulozytennachweis mittels Zytologie.

3.4.2 Vergleich der Western Blot-Analyse und der Zytozentrifugenpräparate aus Harnblasenspülflüssigkeitsproben von Blasenkarzinompatienten

Wie Abbildung 15 zu entnehmen ist, kann nur die LASP-1-Positivität des Western Blots aus Probe 29 eindeutig auf das Vorhandensein von Tumorzellen zurückgeführt werden. Sowohl Probe 27 als auch Probe 33 weisen neben LASP-1-positiven Tumorzellen auch LASP-1-positive Granulozyten beziehungsweise Urothelien auf, so dass in diesen Fällen der Nachweis von LASP-1 im Western Blot nicht ausschließlich in LASP-1-positiven Tumorzellen begründet sein muss. In den Proben 36 und 37 wurden zytologisch Tumorzellen nachgewiesen, die jedoch nicht positiv auf LASP-1 gefärbt waren, weshalb die LASP-1-Positivität im Western Blot durch die LASP-1-positiv getesteten Granulozyten hervorgerufen zu sein scheint.

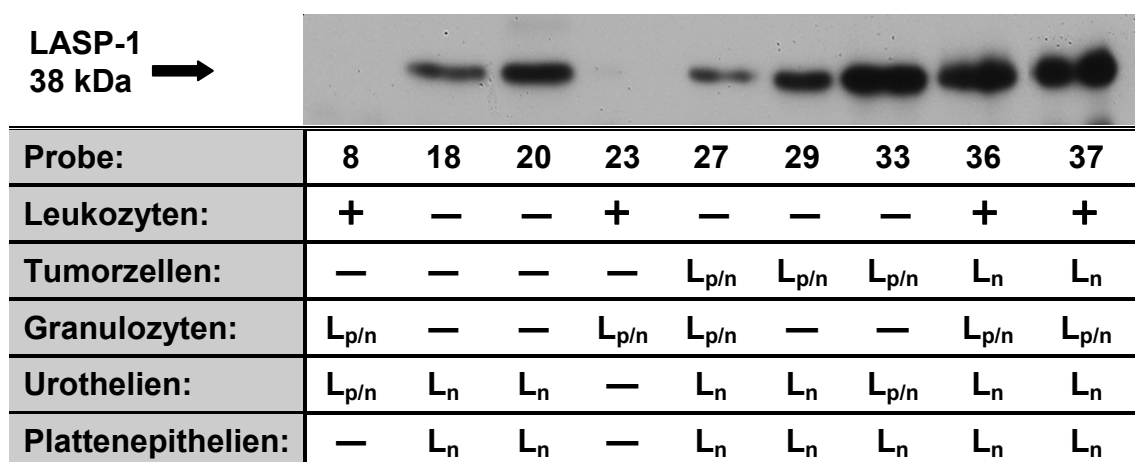


Abbildung 15: Western Blot und Ergebnisse der Zytozentrifugenpräparate aus Harnblasenspülflüssigkeitsproben von Blasenkarzinompatienten. — = keine Zellen nachweisbar; + = Zellen nachweisbar; L_n = LASP-1-negativ; L_p = LASP-1-positiv; L_{p/n} = LASP-1-positiv und LASP-1-negativ; Leukozytennachweis mittels Teststreifen, Granulozytennachweis mittels Zytologie.

Interessant sind sowohl die Proben 8 und 23 als auch die Proben 18 und 20. Trotz des zytologischen Nachweises von LASP-1-positiven Urothelien und/oder Granulozyten in den Proben 8 und 23 war der Western Blot negativ für LASP-1. Allerdings besteht auch die Möglichkeit, dass es sich bei den LASP-1-positiven Urothelzellen in Probe 8 um Tumorzellen handelt, die nach zytologischen Malignitätskriterien nicht als solche erkannt wurden. In Bezug auf die Proben 18

und 20 stellt sich die Situation genau umgekehrt dar. Hier zeigte der Western Blot ein positives Ergebnis für LASP-1, dennoch konnten zytologisch keine LASP-1-positiven Zellen identifiziert werden.

3.4.3 Vergleich der Western Blot-Analyse und der Zytozentrifugenpräparate aus Spontanurinproben von Blasenkarzinompatienten

Wie Abbildung 16 zeigt, wurden auch hier nur bei einer Probe (Probe 32) in der zytologischen Untersuchung ausschließlich gegen LASP-1-gefärbte Tumorzellen gefunden, so dass nur in diesem Fall die LASP-1-Positivität des Western Blots eindeutig durch LASP-1-positive Tumorzellen hervorgerufen wurde. In der Probe 26 wurden neben LASP-1-positiven Tumorzellen auch LASP-1-positive Granulozyten und Urothelien nachgewiesen, so dass in diesem Fall sowohl die Tumorzellen als auch die anderen Zellen für das LASP-1-positive Ergebnis im Western Blot verantwortlich sein könnten. Bei den Proben 7, 22, 28, 34 und 35 wurden zytologisch keine LASP-1-positiven Tumorzellen, sondern nur LASP-1-positiv gefärbte Granulozyten, Urothelien oder Plattenepithelien identifiziert, die möglicherweise das positive Ergebnis für LASP-1 im Western Blot verursacht haben könnten. Probe 34 zeigt jedoch eine

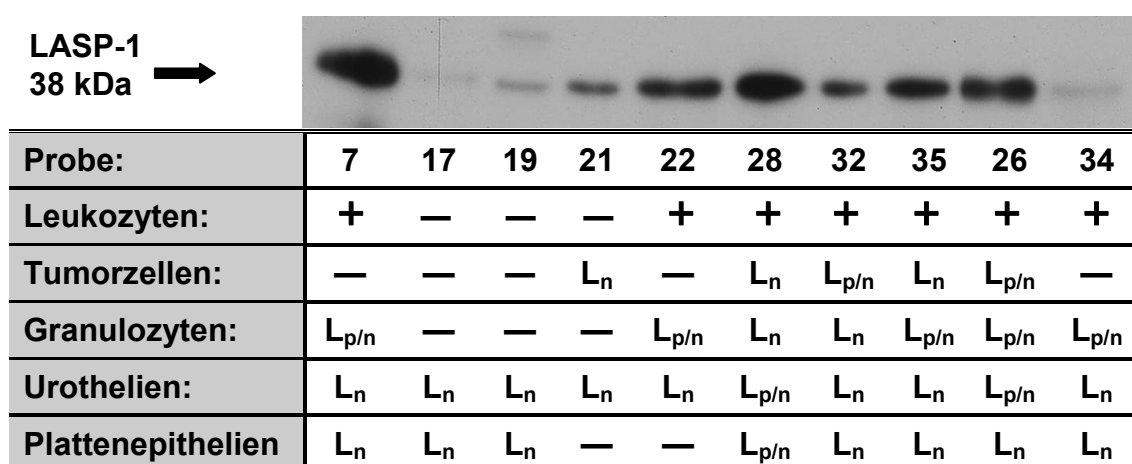


Abbildung 16: Western Blot und Ergebnisse der Zytozentrifugenpräparate aus Spontanurin von Blasenkarzinompatienten. — = keine Zellen nachweisbar; + = Zellen nachweisbar; L_n = LASP-1-negativ; L_p = LASP-1-positiv; L_{p/n} = LASP-1-positiv und LASP-1-negativ; Leukozytennachweis mittels Teststreifen, Granulozytennachweis mittels Zytologie.

deutlich geringere LASP-1-Positivität im Western Blot als die übrigen 4 Proben. Erstaunlich sind auch die Ergebnisse der Proben 19 und 21. Denn trotz eines Nachweises für LASP-1 im Western Blot wurden in der zytologischen Untersuchung keine LASP-1-positiven Zellen gefunden. Allerdings war auch hier der LASP-1-Nachweis im Western Blot im Gegensatz zu den anderen Proben deutlich geringer ausgeprägt.

3.4.4 Auswertung des Vergleichs der Western Blot-Analyse mit den Zytozentrifugenpräparaten

Die Auswertung in Tabelle 13 vermittelt den Eindruck, dass nur in 12,5 % der Fälle ein positives Ergebnis im Western Blot auch tatsächlich auf das Vorhandensein von Tumorzellen zurückzuführen ist. Immerhin fanden sich in 62,5 % der Proben andere LASP-1-positiv gefärbte Zellen, die ebenfalls für einen positiven LASP-1-Nachweis im Western Blot verantwortlich sein könnten. Allerdings stehen dem wiederum 25 % der Proben gegenüber, die im Western Blot LASP-1-positiv sind und keine einzige LASP-1-positive Zelle im zytologischen Präparat aufweisen. Umgekehrt war in 15,4 % der Fälle im Western Blot keine LASP-1-Positivität detektierbar, obwohl LASP-1-positive Zellen in der Urinzytologie vorhanden waren. Folglich präsentiert sich der Vergleich von Western Blots und Zytozentrifugenpräparaten teilweise als völlig widersprüchlich.

Tabelle 13: Zusammenstellung der Ergebnisse des Vergleichs der Western Blot-Analyse mit den Zytozentrifugenpräparaten. n = Anzahl

Zytozentrifugenpräparate	Western Blot LASP-1-positiv		Western Blot LASP-1-neaktiv	
	n	%	n	%
keine LASP-1-positiven Zellen	4	25	11	84,6
nur LASP-1-positive Tumorzellen	2	12,5	0	0
andere LASP-1-positive Zellen	10	62,5	2	15,4

4. DISKUSSION

Zellmigration ist an vielen pathologischen Prozessen unter anderem an der Karzinogenese beteiligt. Zu den grundlegenden Mechanismen dieses Phänomens gehört auch die dynamische Aktinpolymerisation. Das Wissen um und das Verständnis für diese oft mehrstufigen Vorgänge eröffnen neue Möglichkeiten in der effektiven Therapie unterschiedlichster Erkrankungen [76].

Bei den Untersuchungen dieser Fragestellung wurde beobachtet, dass LASP-1 als Aktin-bindendes, fokales Adhäsionsprotein in zahlreiche biologische und pathologische Prozesse involviert ist. Auch wenn die vollständige Funktion von LASP-1 bisher noch nicht geklärt ist, lassen doch zahlreiche wissenschaftliche Arbeiten der letzten Jahre eine wichtige Funktion in der Zellproliferation und Migration, beziehungsweise bei der Karzinogenese und Metastasierung, vermuten [13, 14, 30, 31, 40, 49, 63, 72, 83, 86, 91, 96, 101]. Eine der wichtigsten Erkenntnisse ist, dass in einigen Tumorentitäten, insbesondere im Mamma- und Ovariakarzinom aber auch im Medulloblastom, im hepatozellulären Karzinom und beim Kolonkarzinom, eine Überexpression von LASP-1 nachgewiesen werden kann [29, 31, 90, 91, 93, 96, 101].

Vorrangiges Ziel dieser Arbeit war es, die bisherigen Erkenntnisse über LASP-1 am Urothelkarzinom der Harnblase zu überprüfen und zu untersuchen, inwieweit bereits vorliegende Erkenntnisse übertragbar sind beziehungsweise für diesen Untersuchungszweck modifiziert werden müssen. Hierzu wurde mittels immunhistochemischer Methoden die LASP-1-Expression in histologischen Schnitten von Blasenkrebsgewebe dargestellt. Die Auswertung der immunhistochemisch gefärbten Blasenschnittpräparate zeigt mit einem Anteil von 84,6 % an LASP-1-positiven und damit LASP-1-überexprimierenden Gewebeproben deutlich, dass Urothelkarzinome signifikant höher LASP-1

exprimieren als gesundes Blasengewebe. Während CHIYOMARU ET AL. eine Überexpression von LASP-1 auf mRNA-Ebene für das Harnblasenkarzinom nachweisen konnten [16], belegt diese Arbeit jetzt auch eine vermehrte Expression von LASP-1 auf Proteinebene. Dennoch konnte keine statistisch signifikante Korrelation zwischen der LASP-1-Expression und klinisch-pathologischen Parameter gefunden werden. Ganz andere Ergebnisse zeigen Untersuchungen des Mammakarzinoms. GRUNEWALD ET AL. weisen einen Zusammenhang zwischen LASP-1-Expression und Nodalstatus nach, so dass LASP-1 beim Mammakarzinom möglicherweise als prädiktiver Marker für Lymphknotenmetastasen dienen könnte [29]. Als solcher Marker scheint LASP-1 beim Urothelkarzinom der Harnblase nicht geeignet zu sein. Allerdings lässt die bereits in low-stage Tumoren vorhandene Stärke der LASP-1-Expression vermuten, dass der Anstieg der Expression von LASP-1 ein früher Schritt im mehrstufigen Prozess der Karzinogenese des Harnblasenkarzinoms ist. Diese Ergebnisse stimmen auch mit den Erkenntnissen von CHIYOMARU ET AL. überein und untermauern die Vermutung, dass LASP-1 eine onkogene Funktion inne hat.

Ferner unterstützt der bisherige Wissensstand über die genetischen Veränderungen im Urothelkarzinom der Harnblase die Resultate der Auswertung der histologischen Blasenschnittpräparate. So konnte nachgewiesen werden, dass bereits im Stadium Ta der lange Arm von Chromosom 17, auf dem auch das Gen für LASP-1 lokalisiert ist, dupliziert sein kann [74, 75, 100]. Für das Medulloblastom konnten TRÄNKA ET AL. einen Zusammenhang zwischen der LASP-1-Expression und der Duplikation von Chromosom 17q herstellen [93], so dass möglicherweise auch beim Urothelkarzinom eine Korrelation zwischen der Expression von LASP-1 und der Duplikation des langen Arms von Chromosom 17 besteht. Außerdem liegt in den frühen Stadien häufig eine Deletion des CDKN2A-Gens vor, welches unter anderem den negativen Regulator des p53-Signalweges p14^{ARF} kodiert [43]. Das Fehlen von p14^{ARF} führt letztlich über den Anstieg von Hdm2, einer Ubiquitinligase, zur Inaktivierung von p53 [17, 43]. Zusätzlich ist in seltenen

Fällen das HDM2-Gen amplifiziert, wohingegen circa 30 % der Karzinome eine Überexpression von Hdm2 aufweisen [48], was schließlich zum Abbau von p53 via Ubiquitinierung führt [17, 43]. Darüber hinaus findet sich in fortgeschrittenen Tumorstadien sehr häufig eine Deletion beziehungsweise Mutation im dazugehörigen TP53-Gen selbst [43]. Wie WANG ET AL. für das hepatozelluläre Karzinom beweisen konnten, supprimiert p53 die LASP-1-Expression auf Transkriptionsebene [96]. Umgekehrt bedingt somit ein Mangel an p53 einen Anstieg von LASP-1. Unter Berücksichtigung der zugrundeliegenden genetischen Alterationen könnte auch im Harnblasenkarzinom ein daraus resultierender Verlust von p53 eine vermehrte LASP-1-Expression verursachen und die vermutete wichtige Funktion von LASP-1 in der Karzinogenese des Urothelkarzinoms erhärten. In weniger als 5 % der Fälle liegt in muskelinvasiven Tumoren auch eine Amplifikation der Region 17q21 vor [74], der Region des langen Armes von Chromosom 17, die das Gen für LASP-1 codiert. Allerdings konnte bei Brustkrebs die Überexpression von LASP-1 nicht auf Genamplifikation zurückgeführt werden [24], was nach den bisherigen Erkenntnissen auch auf das Urothelkarzinom der Harnblase zuzutreffen scheint.

Des Weiteren eröffnen die Resultate der ausgewerteten Blasenschnittpräparate die Möglichkeit, LASP-1 bei der histopathologischen Befundung von Blasenschnitten in der Pathologie einzusetzen. Das pathologische Stadium ist einer der wichtigsten prognostischen Faktoren beim Blasenkrebs; deshalb ist ein exaktes Staging für die Therapieentscheidung relevant [42, 50]. Insbesondere die Diagnose eines T1-Tumors scheint häufig Probleme zu bereiten und untersucherabhängigen Schwankungen zu unterliegen [9, 51]. Diese Tatsachen, verbunden mit der Auffassung einiger Urologen, T1-Tumoren ähnlich aggressiv wie im Stadium T2 mittels Zystektomie zu behandeln [6, 84], machen das genaue Erkennen eines T1-Stadiums noch bedeutender. In diesem Zusammenhang stellt sich immer wieder die Frage nach einer Einteilung in Untergruppen innerhalb des T1-Stadiums. Dabei dient die Muscularis mucosae in der Lamina propria als Grenze zwischen den Untergruppen T1A und T1B [50, 51, 58]. Nur in

15 bis 83 % der Fälle kann die Muscularis mucosae jedoch sicher identifiziert werden, so dass die Beurteilung der Invasionstiefe innerhalb des Stadiums T1 für Pathologen eine schwierige Aufgabe ist [50]. Darüber hinaus erschweren durch Kauterisierung bedingte Artefakte, Entzündungsreaktionen und Nekrose das korrekte Staging [51, 58]. Aufgrund der Überexpression von LASP-1 bereits in frühen Stadien des Blasenkrebses, könnte gerade in derart schwierigen Fällen möglicherweise eine immunhistochemische Färbung gegen LASP-1, eventuell auch in Verbindung mit einer Muskelzellen-Färbung gegen Desmin, zum akkuraten Staging beitragen und die Genauigkeit der Diagnose erhöhen – wie es MHAWECH ET AL. bereits für die Immunhistochemie mit Keratin nachgewiesen haben [58]. Allerdings wurde bei dieser Studie ein Antikörper verwendet, der generell auf Keratin reagiert. Keratine kommen in allen Epithelien vor, finden sich also auch im normalen Urothel und sind somit nicht spezifisch für das Urothelkarzinom [60]. Insofern unterscheidet eine immunhistochemische Färbung mit einem Antikörper gegen Keratin nicht zwischen gesunden und neoplastisch veränderten Zellen, sondern weist lediglich Zellen epithelialen Ursprungs nach. Basierend auf den Daten aus der Analyse der Blasenschnittpräparate ermöglicht eine immunhistochemische Färbung gegen LASP-1 im Gegensatz dazu auch eine Differenzierung zwischen gesundem und maligne entartetem Gewebe, was ein zusätzlicher Vorteil im Vergleich zur Immunhistochemie mit Keratin darstellt.

Wie einleitend konstatiert, greift man bei Diagnostik und Nachsorge eines Urothelkarzinoms der Harnblase auf die Zystoskopie und die Urinzytologie zurück [3]. Trotz einiger Mängel gelten beide Methoden als Goldstandard in der Diagnostik des Blasenkrebses [3]. So sind sowohl die Zystoskopie als auch die Urinzytologie sehr Untersucher-abhängig [3, 98]. Darüber hinaus besteht bei der Zystoskopie die Gefahr flache Läsionen wie das Carcinoma in situ zu übersehen [3, 98]. Erschwerend kommt hinzu, dass die endoskopische Untersuchung der Harnblase ein invasives Verfahren mit nur geringer Akzeptanz durch die Patienten ist und zusätzlich hohe Kosten generiert [70, 89]. Aufgrund der hohen Rezidivrate des Urothelkarzinoms benötigen die

Patienten eine regelmäßige Nachsorge mittels Zystoskopie [89], so dass dieser Umstand den Harnblasenkrebs zur sozioökonomisch teuersten Krebsentität überhaupt macht [10, 77]. Im Gegensatz dazu ist die Urinzytologie ein nicht invasives und günstiges Verfahren, allerdings weist die zytologische Untersuchung des Urins die Tendenz auf, gut behandelbare low-grade Tumoren nicht zu erkennen [3, 61]. Aus diesen Gründen wurden in den letzten Jahren alternative Tumormarker gesucht, welche die Diagnostik unterstützen beziehungsweise verbessern oder sogar den heutigen Goldstandard ersetzen könnten. Die Tabelle 15 (in 6. Appendix) vermittelt einen Überblick über die erhältlichen Tumormarker. Die meisten dieser Tumormarker sind Urin-basiert, günstig und weisen eine höhere Sensitivität, aber eine geringere Spezifität als die herkömmliche Urinzytologie auf. Der ideale Tumormarker sollte billig, nicht invasiv sowie von hoher Spezifität und Sensitivität sein. Dies trifft für die bisherigen Tumormarker nicht zu. Möglicherweise hat LASP-1 genau diese Eigenschaften und könnte in diesem Fall als neuer Marker für das Urothelkarzinom der Harnblase dienen.

Nach den viel versprechenden Ergebnissen der ausgewerteten, immunhistologisch gefärbten Blasenschnitte war der nächste Schritt zur Überprüfung dieser Hypothese, LASP-1 mittels Western Blot-Analyse im Urin nachzuweisen. Den Ergebnissen der Western Blot-Analyse zufolge ist LASP-1 im Urin eindeutig detektierbar. Außerdem zeigt die statistische Auswertung, dass Urin von Blasenkarzinompatienten signifikant häufiger LASP-1 enthält als gesunde Kontrollpersonen. Demzufolge scheint der Nachweis von LASP-1 mittels Western Blot durchaus als diagnostische Methode einsetzbar zu sein. Darüber hinaus enthüllte der Vergleich von Harnblasenspülflüssigkeit und Spontanurin, dass Spontanurinproben sogar geeigneter für die Diagnostik sind als die Harnblasenspülflüssigkeitsproben. Das ist eine bemerkenswerte Beobachtung, da Harnblasenspülflüssigkeit in einigen Arbeiten aufgrund der größeren Anzahl und besser erhaltenen Zellen als präziser angesehen und mit einer höheren diagnostischen Ausbeute verbunden wird als Spontanurinproben [35, 57, 99]. Aus diesem Grund folgern einige Arbeiten, dass die zytologische

Begutachtung von Harnblasenspülflüssigkeit, trotz der invasiven Probengewinnung und der verursachenden hohen Kosten, in der Nachsorge von Blasenkrebspatienten eingeschlossen werden sollte [35, 57, 99]. Den ermittelten Werten für die Spontanurinproben folgend, scheint dies allerdings nicht auf den Nachweis von LASP-1 im Urin mittels Western Blots übertragbar zu sein.

Auch verglichen mit sämtlichen anderen Urin-basierten Tumormarkern (siehe Tabelle 15 in 6. Appendix) schneidet der LASP-1-Nachweis mittels Western Blot-Analyse besser ab. Vor allem die hohen Werte für die Sensitivität gereichen der LASP-1-Detektion im Urin zum Vorteil gegenüber der Urinzytologie. Zusätzlich erbringen die ebenfalls hohen Werte für die Spezifität auch einen Vorsprung gegenüber den anderen Markern, da eine hohe Spezifität die Anzahl an falsch positiven Ergebnissen reduziert und somit unnötige weiterführende Untersuchungen vermeidet. Diese hohen Werte für Sensitivität beziehungsweise Spezifität und die einfache, nicht invasive Gewinnung des Probenmaterials scheinen LASP-1 zum idealen, Urin-basierten Tumormarker für das Urothelkarzinom der Harnblase zu machen, der entweder den bisherigen Goldstandard der Diagnostik bestehend aus Zystoskopie und Urinzytologie ergänzen, ihn möglicherweise sogar ersetzen könnte.

Im weiteren Verlauf der Untersuchung wurden ergänzend zu den Western Blots Zytozentrifugenpräparate aus denselben Proben angefertigt. Hierbei lag das besondere Augenmerk darauf, LASP-1 hinsichtlich einer Verbesserung der Sensitivität der Urinzytologie zu beurteilen.

Aufgrund der bereits erarbeiteten Erkenntnisse war eine LASP-1-positive Färbung ausschließlich von Tumorzellen zu erwarten. Überraschenderweise offenbarte die Auswertung der Zytozentrifugenpräparate jedoch ein völlig anderes Bild. Neben LASP-1-positiven Tumorzellen wurde LASP-1 mittels Immunhistochemie auch in normalen Urothelien, Plattenepithelien und Granulozyten nachgewiesen. Die Tatsache, dass Leukozyten ebenfalls LASP-1 überexprimieren, ist nicht neu, sondern wurde schon von GRUNEWALD ET AL. beschrieben [29]. Erstaunlicherweise waren niemals alle Zellen einer Zellart

LASP-1-positiv gefärbt, sondern immer nur einzelne LASP-1-positive Zellen zwischen vielen LASP-1-negativen Zellen auffindbar. Ferner fanden sich neben LASP-1-positiven Tumorzellen auch immer LASP-1-negative Tumorzellen. Eine mögliche Erklärung hierfür liefern CHIYOMARU ET AL., die über eine gewisse Diskrepanz zwischen dem LASP-1-Expressionsniveau auf mRNA-Ebene und dem tatsächlichen LASP-1-Proteingehalt in gewissen Blasenkrebszelllinien berichten. Ihrer Meinung nach ist eine krebszelllinienspezifische posttranslationale Ubiquitinierung oder Proteolyse für den verminderten LASP-1-Proteingehalt verantwortlich [16]. Dies könnte eine mögliche Erklärung dafür sein, warum LASP-1 proteinbiochemisch nicht nachgewiesen werden kann, obwohl eine LASP-1-Überexpression auf mRNA-Ebene vorliegt.

Möglicherweise können die bisherigen Erkenntnisse über die Expression von E-Cadherin im Urothelkarzinom auch zur Erklärungsfindung beitragen. Bei E-Cadherin handelt es sich um ein Zelladhäsionsmolekül, welches mit Zell-Zell- und Zell-Matrix-Interaktion, Leukozytenfunktion, Tumordinvasion und Metastasierung assoziiert ist. In Bezug auf das Harnblasenkarzinom wurde in einigen Arbeiten ein vermehrter E-Cadherin-Verlust mit ansteigendem Grading, beziehungsweise Staging, korreliert [80, 81]. Allerdings zeigten gut differenzierte Tumorzellen von papillären Urothelkarzinomen in der Urinzytologie einen signifikanten Anstieg von E-Cadherin [79, 80]. ROSS ET AL. spekulierten, dass papilläre Urothelkarzinome, beziehungsweise die papillären Anteile invasiver Blasenkarzinome, vermehrt Scherkräften innerhalb des Blasenlumens ausgesetzt sind, wofür ein zunehmender Gehalt an Zelladhäsionsproteinen, wie E-Cadherin, benötigt wird [79]. Es ist bekannt, dass E-Cadherin auch die LASP-1-Expression beeinflusst. So führte eine E-Cadherin-Mutation, die den Verlust des Zellkontaktes nach sich zog, gleichzeitig zu einer erhöhten LASP-1-Expression [45]. Somit könnte umgekehrt ein E-Cadherin-Anstieg eine Herabregulierung der LASP-1-Expression verursachen. Unter Berücksichtigung der Annahme, dass sich die Zellen eines Urothelkarzinoms innerhalb des Tumors differenzieren und gerade die oberflächlichen Zellen, die am wahrscheinlichsten in der Urinprobe erscheinen, differenzierter sind als die Basalzellen [61], liefert die E-Cadherin-Hypothese

möglicherweise einen weiteren Erklärungsversuch für den verminderten LASP-1-Nachweis mittels Urinzytologie. Darüber hinaus lässt sich umgekehrt mit Hilfe der E-Cadherin-Theorie der Nachweis von LASP-1 in gesunden Urothelzellen und Plattenepithelien begründen. Denn einer Abschilferung von Zellen geht ein Verlust des Zell-Zell-Kontaktes voraus [26], der sich in einem verminderten E-Cadherin-Gehalt widerspiegelt und zu einer heraufregulierten LASP-1-Expression führt, die immunhistochemisch in der Urinzytologie sichtbar gemacht wurde. Insofern scheint der Unterschied zwischen den Resultaten der immunhistochemisch gefärbten Blasenschnitte und Zytozentrifugenpräparate erklärbar zu werden.

Zusammenfassend muss man aufgrund der Beobachtungen und statistischen Berechnungen der Zytozentrifugenpräparate feststellen, dass eine immunhistochemische Färbung gegen LASP-1 die Sensitivität der Urinzytologie in Bezug auf die Diagnostik eines Urothelkarzinoms der Harnblase nicht erhöht. Hier ist die Urinzytologie mittels HE-Färbung mit 47,4 % sensitiver.

In einem weiteren Schritt wurden die Western Blots mit den Zytozentrifugenpräparaten direkt verglichen. Dieser Vergleich sollte Aufschluss über die zellulären Bestandteile, die vornehmlich für den positiven Nachweis von LASP-1 im Western Blot verantwortlich sind, geben und die Ergebnisse der Western Blots verifizieren. Diese Analyse führte zu teilweise völlig widersprüchlichen Ergebnissen. So fanden sich in 62,5 % der Proben LASP-1-positive Zellen, die keine Karzinomzellen waren, aber ebenfalls einen positiven LASP-1-Nachweis im Western Blot hervorgerufen haben könnten. Demgegenüber standen 25 % der Fälle, bei denen trotz positiven LASP-1-Nachweises im Western Blot keine LASP-1-positiv gefärbten Zellen in der Urinzytologie nachgewiesen werden konnten. Umgekehrt zeigten 15,4 % der Proben keine LASP-1-Positivität im Western Blot, obwohl LASP-1-positive Zellen in den zytologischen Präparaten detektiert wurden. Dementsprechend vermittelt die Auswertung den Eindruck, dass lediglich in 12,5 % der Fälle dem positiven LASP-1-Nachweis im Western Blot ausschließlich LASP-1-positive Tumorzellen zugrunde liegen. Zusammenfassend muss festgestellt werden,

dass zwischen den Resultaten der Western Blot-Analyse und der zytologischen Begutachtung der Zytozentrifugenpräparate eine erhebliche Diskrepanz besteht.

Eine mögliche Erklärung für einen positiven LASP-1-Nachweis im Western Blot ohne gleichzeitigen Nachweis einer LASP-1-positiven Zelle in der Urinzytologie, wie er in 25 % der Fälle beobachtet wurde, könnte sein, dass es sich – einfach gesagt – um suboptimale Proben für die Urinzytologie handelte. Das würde bedeuten, dass in den Zytozentrifugenpräparaten mittels Immunhistochemie keine LASP-1-positiven Tumorzellen nachgewiesen werden konnten, weil aufgrund einer zu geringen Zellzahl oder einer schlechten Zellkonservierung gar keine Tumorzellen in der Probe vorhanden waren. Dieses Phänomen ist ein bekanntes Problem der Urinzytologie und häufige Ursache für falsch-negative Ergebnisse bei der zytologischen Beurteilung von Urinproben [5, 55, 61, 62]. Möglicherweise ist die verwendete Probenmenge von 20 ml für die Herstellung von 4 Zytozentrifugenpräparate, von denen wiederum nur 2 Präparate immunhistochemisch gegen LASP-1 gefärbt wurden, zu gering. Demnach wurden, genau genommen, nur aus 10 ml einer Urinprobe 2 immunhistochemisch gefärbte Zytozentrifugenpräparate hergestellt, was nach der Meinung von PLANZ ET AL. häufig zu wenig Zellmaterial bietet [70]. Ferner beginnt die Zelldegeneration bereits vor der Abschilferung in den Urin und schreitet durch den Urinkontakt weiter fort, so dass durch eine verzögerte Aufbereitung der Probe ein weiterer Zellverlust eintreten kann, der die Detektion LASP-1-positiver Tumorzellen in der Urinzytologie noch weiter erschwert [61]. Bei der Western Blot-Analyse spielt die Zellkonservierung bei der Detektion keine so entscheidende Rolle. Darüber hinaus besteht die Möglichkeit, dass mittels Western Blot auch von Tumorzellen sezerniertes LASP-1 erkannt wird, welches in der Urinzytologie nicht detektiert werden kann.

Ein sehr einfacher, aber doch wesentlicher Grund für die unterschiedlichen Ergebnisse liegt in der Methode beziehungsweise der Probengewinnung selbst. So stammt das Untersuchungsmaterial zwar aus derselben Probe, trotzdem ist das Material nicht identisch, da jede Probe vor der Weiterverarbeitung geteilt wurde. Insofern stellt keine der Proben für die Zytozentrifugenpräparate das

genau gleiche Abbild der Proben für die Western Blots dar, wodurch Diskrepanzen zwischen den beiden Methoden erklärbar sind. Allein dieser Umstand zeigt auf, dass die Urinzytologie nicht zur Verifizierung der Western Blot-Ergebnisse geeignet zu sein scheint. Insofern sollten die Ergebnisse des Vergleiches von Western Blot mit Zytozentrifugenpräparaten nicht überbewertet werden, denn schließlich erbrachte die Auswertung der Western Blots eine Gesamtsensitivität von 84,2 %.

Nichtsdestotrotz enthüllte die gleichzeitig durchgeführte Urinzytologie, dass nicht nur Tumorzellen sondern auch andere Zellen, vor allem Granulozyten, LASP-1 überexprimieren und dadurch für falsch-positive Ergebnisse im Western Blot verantwortlich sein können. Deshalb sollten Harnwegsinfektionen, die in der Regel mit einem erhöhten Leukozytengehalt im Urin einhergehen, als Ausschlusskriterium betrachtet werden. Neben Entzündungen stellt auch Hämaturie eine häufige Begleiterscheinung beim Blasenkarzinom dar, die die Patienten nicht selten zum Arztbesuch veranlasst [42]. Auch hier muss durch die Kontamination mit im Blut befindlichen Zellen mit falsch-positiven Ergebnissen im Western Blot gerechnet werden. Wie allerdings die 15,4 % der Fälle mit negativem Ergebnis im Western Blot trotz LASP-1-positiver Zellen vermuten lassen, spielt die Anzahl der kontaminierenden Zellen dabei eine große Rolle. Aus diesem Grund sollte in Zukunft dieses Problem im Fokus stehen und genauer untersucht werden. Vor allem ist es wichtig, einen Cut-off-Wert zu definieren, der die Anzahl an kontaminierenden Blut- und Entzündungszellen beschreibt, ab dem mit falsch-positiven Ergebnissen gerechnet werden muss.

Wichtig erscheint abschließend der Hinweis, dass aufgrund der mangelnden Größe der Studie die Ergebnisse nur als vorläufige Resultate angesehen werden können, die in einer größer angelegten Patientenstudie überprüft werden müssen.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Das Urothelkarzinom der Harnblase ist gegenwärtig die neunthäufigste Krebsursache weltweit, dabei erkranken Männer dreimal so häufig als Frauen. Mit 3,6 % der krebsbedingten Todesfälle unter Männern rangiert der Blasenkrebs auf Platz sieben der häufigsten Krebstodesursache in den entwickelten Ländern.

Zur Diagnostik eines Harnblasenkarzinoms gehört neben der Zystoskopie als Goldstandard auch die Urinzytologie. Da beide Methoden Nachteile aufweisen, wurden in den letzten Jahren ergänzend verschiedene Urin-basierte Tumormarker entwickelt, welche die Zuverlässigkeit der Diagnostik verbessern und die Früherkennung erleichtern sollen. Hinzu kommt, dass beim einmal aufgetretenen Blasenkrebs eine hohe Rezidivrate festzustellen ist, weshalb eine Nachsorge mittels Zystoskopie und Urinzytologie in regelmäßigen Abständen notwendig ist. Durch diese kostenintensive Behandlung ist das Urothelkarzinom der Blase inzwischen die sozioökonomisch teuerste Krebsentität überhaupt geworden.

Auch aus dieser Erkenntnis entwickelten sich Problemstellung und Thema dieser Arbeit: einen Tumormarker zu finden, der sowohl in der Durchführung einfach und nicht invasiv ist, als auch in der Früherkennung und beobachtenden Nachsorge eine größere Sicherheit in der Diagnostik dieser Krebsart ermöglichen könnte.

Ausgangspunkt war die Beobachtung, dass LASP-1, das LIM and SH3 Protein 1, ein Aktin-bindendes Gerüstprotein ist, das in verschiedenen Tumorentitäten wie dem Mammakarzinom, dem Ovarialkarzinom, dem Colonkarzinom, dem hepatozellulären Karzinom und dem Medulloblastom

überexprimiert ist. Dabei scheint LASP-1 eine essenzielle Rolle im Migrationsprozess neoplastischer Zellen zu spielen, da seine Herabregulierung mittels RNA-Interferenz in Krebszellen zu einer verminderten Proliferation und Migration führt. Umgekehrt verursacht eine künstlich hervorgerufene LASP-1-Überexpression eine vermehrte Zellmigration, Tumorwachstum und Metastasierung. Darüber hinaus korreliert im Brustkrebs die Stärke der LASP-1-Expression mit der Tumorgröße und dem Lymphknotenstatus, weshalb LASP-1 beim invasiven Mammakarzinom als zusätzlicher prädiktiver Marker für Lymphknotenmetastasen dienen könnte.

Übertragen auf das Urothelkarzinom ergab die Auswertung der immunhistochemisch gefärbten Blasenschnitte, dass diese Karzinome signifikant mehr LASP-1 auf Proteinebene exprimieren als gesundes Blasengewebe. Allerdings konnte keine Korrelation zwischen der Stärke der LASP-1-Expression und verschiedener klinisch-pathologischer Parameter nachgewiesen werden. Trotzdem sollte dieses Ergebnis künftig in der Diagnostik ergänzend herangezogen werden, um LASP-1 in der histopathologischen Befundung von Blasenkarzinomgewebe einzusetzen. Dies könnte zur Vereinfachung beziehungsweise zur Verbesserung des korrekten Stagings führen, vor allem in Hinblick auf die manchmal schwierig zu identifizierenden T1-Tumore.

Mittels Western Blot-Analysen gelang es außerdem, LASP-1 eindeutig im Urin und statistisch signifikant häufiger bei Blasenkarzinompatienten zu detektieren. Ohne Berücksichtigung einer Kontamination mit LASP-1-positiven Blut- und Entzündungszellen ist der LASP-1-Nachweis im Western Blot mit einer Gesamtsensitivität von 84,2 % derzeit sensitiver als die meisten erhältlichen Tumormarker. Darüber hinaus ergab der Vergleich von Spontanurin und Harnblasenspülflüssigkeit überraschend, dass Spontanurinproben sogar geeigneter zur Diagnostik zu sein scheinen. Diese einfache, nicht invasive und kostengünstige Probengewinnung zusammen mit den hohen Werten für Sensitivität und Spezifität machen LASP-1 zum idealen Urin-basierten

Tumormarker für das Urothelkarzinom der Harnblase, der entweder den bisherigen Goldstandard der Diagnostik bestehend aus Zystoskopie und Urinzytologie ergänzen oder möglicherweise sogar ersetzen könnte.

Die im Zuge dieser Arbeit ebenfalls ausgewerteten Zytozentrifugenpräparate erbrachten keine Erhöhung der Sensitivität der Urinzytologie. Auch zur Verifizierung der Western Blot-Ergebnisse scheinen die Zytozentrifugenpräparate ungeeignet zu sein. Dennoch bestätigten die Resultate der Zytozentrifugenpräparate, dass LASP-1 auch in anderen Zellen, wie etwa in Leukozyten, exprimiert wird.

Zukünftig sollte deshalb auf den LASP-1-Nachweis im Western Blot als zusätzliche diagnostische Methode beim Urothelkarzinom besonderer Wert gelegt werden. Insbesondere muss ein Cut-off-Wert für kontaminierende Blut- und Entzündungszellen bestimmt werden, ab dem mit falsch-positiven Werten im Western Blot zu rechnen ist. Es wäre sicher lohnend und erhellend, die Überprüfung dieser vorläufigen Ergebnisse in einer größer angelegten Patientenstudie vorzunehmen.

6. APPENDIX

6.1 TNM-Klassifikation

Tabelle 14: TNM-Klassifikation des Urothelkarzinomes der Harnblase [modifiziert nach 27]

T = Tumor bzw. Ausdehnung des Primärtumors		
Tx		Tumor kann nicht beurteilt werden
T0		kein Anhalt für Primärtumor
Ta		nicht invasiver papillärer Tumor
Tis		Carcinoma in situ
T1		Tumor infiltriert die Lamina propria und das subepitheliale Bindegewebe
T2		Tumor infiltriert die Muskularis
	T2a	Tumor infiltriert die oberflächliche Muskulatur (innere Hälfte)
	T2b	Tumor infiltriert die äußere Muskulatur (äußere Hälfte)
T3		Tumor infiltriert perivesikales Fettgewebe
	T3a	mikroskopisch
	T3b	makroskopisch
T4		Tumor infiltriert Prostata, Uterus, Vagina oder Becken-/Bauchwand
	T4a	Tumor infiltriert Prostata, Uterus oder Vagina
	T4b	Tumor infiltriert Becken- oder Bauchwand
N = regionäre Lymphknoten		
Nx		regionäre Lymphknoten können nicht beurteilt werden
N0		kein Anhalt für regionäre Lymphknoten
N1		Metastase in solitärem Lymphknoten ≤ 2 cm
N2		Metastase in solitärem Lymphknoten > 2 cm, aber ≤ 5 cm oder multiple Lymphknoten < 5 cm
N3		Metastase in Lymphknoten > 5 cm
M = Fernmetastasen (vor allem in Lunge, Leber und Knochen)		
Mx		Fernmetastasen können nicht beurteilt werden
M0		keine Fernmetastasen
M1		Fernmetastasen

6.2 Urin-basierte Tumormarker

Tabelle 15: Urin-basierte Tumormarker [52]

Marker	durchschnittliche Sensitivität in %								durchschnittliche Spezifität in %
	gesamt	G1	G2	G3	Tis	Ta	T1	>T2	
Zytologie	34 (20-53)	12	26	64	63	15	46	55	99 (83-99,7)
NMP22	73 (47-87)	61	71	79	66	60	85	89	80 (58-91)
BTA test	49 (24-74)	32	50	79	50	33	62	80	86 (66-95)
BTA stat	71 (57-82)	47	73	94	73	57	82	91	73 (61-82)
BTA TRAK	69 (55-80)	63	70	92	68	57	93	90	90 (38-98)
FDP	77 (41-93)	42	56	92	65	56	63	100	87 (77-94)
Hgb dipstick	52 (27-76)	8	42	76	45	25	50	92	82 (62-93)
CYFRA 21-1 (CK19)	94 (74-99)	86	97	99	100	75	87	89	69 (57-78)
UBC (CK 8/18)	66 (50-79)	57	73	74	96	62	63	84	91 (84-96)
BCA (CK 8/18)	83 (55-95)	70	82	75	67	58	85	74	84 (45-96)
CK 20	91 (83-96)				100	96	83	88	84 (66-93)
TPA (CK 8, 18, 19)	88	76	88	80	67	25	85	81	55
TPS (CK 8/CK 18)	64								84
Telomerase	77	61	82	93	99	74			99 (46-99)
BCLA-4	96								85
Chemi-luminescent Hgb	67	67	62	85	82	56			63
HA	89 (67-97)				87	77	88	89	92 (83-96)
HAase	82				77	43	88	86	84
HA-HAase	92				94	88	94	97	84
ImmunoCyt test	86	84	84	90	100	86	85	83	79
Beta-HCG	35								100

6.3 Rohdaten der histologischen Blasenschnitte

Tabelle 36: Rohdaten der histologischen Blasenschnitte.

⊕ = positiver Status, ⊖ = negativer Status

Nr.	T	N	M	Grading	L	V	LASP-1-Score	LASP-1-IRS	LASP-1-Status	Kern-Status
1	Negativ Kontrolle						0	0	⊖	⊖
2	Negativ Kontrolle						0	0	⊖	⊖
3	pTa	N0	M0	G1	L0	V0	2	8	⊕	⊖
4	pTa	N0	M0	G2	L0	V0	2	8	⊕	⊖
5	pTa	N0	M0	G2	L0	V0	2	8	⊕	⊖
6	pTa	N0	M0	G2	L0	V0	2	8	⊕	⊖
7	pTa	N0	M0	G3	L0	V0	2	8	⊕	⊖
8	pT1	Nx	Mx	G2	Lx	Vx	2	8	⊕	⊖
9	pT1	N0	Mx	G2	L0	V0	1	3	⊖	⊖
10	pT1	N0	Mx	G2	L0	V0	2	8	⊕	⊖
11	pT1	Nx	Mx	G3	Lx	Vx	3	12	⊕	⊖
12	pT1	Nx	Mx	G3	Lx	Vx	2	8	⊕	⊖
13	pT1	Nx	Mx	G3	L0	V0	3	12	⊕	⊖
14	pT2	Nx	Mx	G2	L0	V0	2	8	⊕	⊖
15	pT2	Nx	Mx	G2	L1	V1	1	2	⊖	⊖
16	pT2	Nx	Mx	G2	Lx	Vx	2	8	⊕	⊖
17	pT2	N0	Mx	G3	L0	V0	2	8	⊕	⊖
18	pT2	N2	Mx	G3	L1	V1	2	6	⊕	⊖
19	pT2	Nx	Mx	G3	Lx	Vx	1	4	⊖	⊖
20	pT3	N0	Mx	G2	L1	V0	2	8	⊕	⊖
21	pT3	N2	Mx	G3	L1	V1	1	4	⊖	⊖
22	pT3	N0	Mx	G3	L0	V1	2	8	⊕	⊖
23	pT3	N1	Mx	G3	L1	V1	2	6	⊕	⊖
24	pT4	N1	Mx	G2-3	L1	V1	2	8	⊕	⊖
25	pT4	N0	Mx	G3	L1	V0	2	8	⊕	⊕
26	pT4	Nx	Mx	G3	Lx	Vx	2	8	⊕	⊖
27	pT4	N2	Mx	G3	L1	V1	2	8	⊕	⊖
28	pT4	Nx	Mx	G3	Lx	Vx	2	8	⊕	⊖

6.4 Rohdaten der Urinproben

Tabelle 17: Rohdaten der Urinproben. Staging, Grading und U-Status. S = Spontanurin, H = Harnblasenspülflüssigkeit, ⊕ = positiver Nachweis, ⊖ = negativer Nachweis

Probe Nr.	Urin	Staging und Grading	U-Status					
			pH	Leukos / μ l	Nitrit	Glukose	Protein	Erys / μ l
1	S	gesund	6	⊖	⊖	⊖	⊖	⊖
2	S	gesund	7	⊖	⊖	⊖	⊖	⊖
3	S	gesund	6	⊖	⊖	⊖	⊖	⊖
4	S	gesund	5	⊖	⊖	⊖	⊖	⊖
5	S	gesund	5	⊖	⊖	⊖	⊖	⊖
6	S	gesund	7	⊖	⊖	⊖	⊖	⊖
7	S	pT2b, pN0, cM0, L0, V0, R0, G2	5	500	⊖	⊖	25	150
8	H	pT2b, pN0, cM0, L0, V0, R0, G2	7	500	⊖	⊖	25	150
9	S	gesund	5	⊖	⊖	⊖	⊖	⊖
10	S	gesund	5	⊖	⊖	⊖	⊖	⊖
11	S	gesund	5	⊖	⊖	⊖	⊖	⊖
13	S	gesund	7	⊖	⊖	⊖	⊖	⊖
17	S	pT2a, pN0, cM0, L0, V0, R0, G2	5	⊖	⊖	⊖	⊖	10
18	H	pT2a, pN0, cM0, L0, V0, R0, G2	5	⊖	⊖	⊖	⊖	10
19	S	multifokal pTa, N0, M0, V0, L0, G2	6	⊖	⊖	⊖	⊖	⊖
20	H	multifokal pTa, N0, M0, V0, L0, G2	6	⊖	⊖	⊖	⊖	50
21	S	pTis, pN0, cM0, L0, V0, R0, G3	5	⊖	⊖	⊖	⊖	10
22	S	pT4a, pN2, cM0, L1, V1, R0, G3	5	500	⊖	⊖	75	250
23	H	pT4a, pN2, cM0, L1, V1, R0, G3	6,5	500	⊖	⊖	⊖	250
26	S	pT2b, pN0, pMx, L0, V0, R0, G2 Niere rechts: pTa, G2	7	500	⊖	⊖	75	250
27	H	pT2b, pN0, pMx, L0, V0, R0, G2 Niere rechts: pTa, G2	8	⊖	⊖	⊖	⊖	25
28	S	pT1, pN0, pMx, L0, V0, R0, G2	6,5	100	⊖	⊖	⊖	10
29	H	pT1, pN0, pMx, L0, V0, R0, G2	5	⊖	⊖	⊖	⊖	⊖
32	S	multilokaler pTa, N0, M0, V0, L0, G2	5	100	⊖	⊖	⊖	250
33	H	multilokaler pTa, N0, M0, V0, L0, G2	5	⊖	⊖	⊖	⊖	250
34	S	pT2b, pN0, pMx, L1, V1, R0, G3	6	500	⊕	⊖	75	250
35	S	pTa, N0, M0, L0, V0, G2	7	500	⊖	⊖	⊖	250
36	H	pTa, N0, M0, L0, V0, G2	7	500	⊖	⊖	⊖	250
37	H	pT2b, pN0, pMx, L1, V1, R0, G3	5	500	⊖	⊖	75	250

Tabelle 18: Rohdaten der Urinproben. Auswertung der Zytozentrifugenpräparate.

X = Nachweis, pos = LASP-1-positiv, neg = LASP-1-negativ

Probe Nr.	Karzinomzellen			Granulozyten			Urothelien			Plattenepithelien		
	keine	LASP-1		keine	LASP-1		keine	LASP-1		keine	LASP-1	
		pos	neg		pos	neg		pos	neg		pos	neg
1	X			X					X	X		
2	X			X					X			X
3	X			X			X			X		
4	X			X					X	X		
5	X			X					X	X		
6	X			X			X			X		
7	X				X	X			X			X
8	X				X	X		X	X	X		
9	X			X					X	X		
10	X			X					X	X		
11	X			X					X			X
13	X			X					X			X
17	X			X					X			X
18	X			X					X			X
19	X			X					X			X
20	X			X					X			X
21			X	X					X	X		
22	X				X	X			X	X		
23	X				X	X	X			X		
26		X	X		X	X		X	X			X
27		X	X		X	X			X			X
28			X			X		X	X		X	X
29		X	X	X					X			X
32		X	X			X			X			X
33		X	X	X				X	X			X
34	X				X	X			X			X
35			X		X	X			X			X
36			X		X	X			X			X
37			X		X	X			X			X

7. LITERATURVERZEICHNIS

1. ABOL-ENEIN H.: **Infection: Is it a cause of bladder cancer?** *Scandinavian Journal of Urology & Nephrology* (2008) **42** (Suppl 218): 79-84
2. AMERICAN CANCER SOCIETY: **Global Cancer Facts & Figures 2nd Edition.** *Atlanta, GA: American Cancer Society* (2011): 1-57
3. BABJUK M., OOSTERLINCK W., SYLVESTER R., KAASINEN E., BÖHLE A., PALOU-REDORTA J., ROUPRÊT M.: **EAU Guidelines on non-muscle-invasive urothelial carcinoma of the bladder, the 2011 update.** *European Urology* (2011) **59**: 997-1008
4. BACH I.: **The LIM domain: regulation by association.** *Mechanisms of Development* (2000) **91**: 5-17
5. BASTACKY S., IBRAHIM S., WILCZYNSKI S. P., MURPHY W. M.: **The accuracy of urinary cytology in daily practice.** *Cancer Cytopathology* (1999) **87** (3): 118-128
6. BIANCO F. J. JR., JUSTA D., GRIGNON D. J., SAKR W. A., PONTES J. E., WOOD D. P. JR.: **Management of clinical T1 bladder transitional cell carcinoma by radical cystectomy.** *Urological Oncology* (2004) **22** (4): 290-294
7. BOENISCH T. (Hrsg.): **Handbuch Immunchemische Färbemethoden.** 3. Auflage. *DakoCytomation GmbH, Hamburg* (2003): 34-39
8. BOFFETTA P.: **Tobacco smoking and risk of bladder cancer.** *Scandinavian Journal of Urology & Nephrology* (2008) **42** (Suppl 218): 45-54
9. BOL M. G. W., BAAK J. P. A., BUHR-WILDHAGEN S., KRUSE A.-J., KJELLEVOLD K. H., JANSSEN E. A. M., MESTAD O., ØGREID P.: **Reproducibility and prognostic variability of grade and lamina propria invasion in stages Ta, T1 urothelial carcinoma of the bladder.** *The Journal of Urology* (2003) **169**: 1291-1294
10. BOTTEMAN M. F., PASHOS C. L., REDAELLI A., LASKIN B., HAUSER R.: **The health economics of bladder cancer: a comprehensive review of the published literature.** *Pharmacoeconomics* (2003) **21** (18): 1315-1330

11. BUTT E., GAMBARYAN S., GÖTTFERT N., GALLER A., MARCUS K., MEYER H. E.: **Actin binding of human LIM and SH3 protein is regulated by cGMP- and cAMP-dependent protein kinase phosphorylation on serine 146.** *The Journal of Biological Chemistry* (2003) **278**: 15601-15607
12. CARMACK A. J. K., SOLOWAY M. S.: **The diagnosis and staging of bladder cancer: from RBCs to TURs.** *Urology* (2006) **67** (Suppl 3A): 3-10
13. CHEW C. S., CHEN X., PARENTE J. A., JR., TARRER S., OKAMOTO C., QIN H.-Y.: **Lasp-1 binds to non-muscle F-actin in vitro and is localized within multiple sites of dynamic actin assembly in vivo.** *Journal of Cell Science* (2002) **115**: 4787-4799
14. CHEW C. S., PARENTE J. A., CHEN X., CHAPONNIER C., CAMERON R. S.: **The LIM and SH3 domain-containing protein, lasp-1, may link the cAMP signaling pathway with dynamic membrane restructuring activities in ion transporting epithelia.** *Journal of Cell Science* (2000) **113**: 2035-2045
15. CHEW C. S., PARENTE J. A., JR., ZHOU C.-J., BARANCO E., CHEN X.: **Lasp-1 is a regulated phosphoprotein within the cAMP signaling pathway in the gastric parietal cell.** *American Journal of Physiology* (1998) **275**: C56-C67
16. CHIYOMARU T., ENOKIDA H., KAWAKAMI K., TATARANO S., UCHIDA Y., KAWAHARA K., NISHIYAMA K., SEKI N., NAKAGAWA M.: **Functional role of LASP1 in cell viability and its regulation by microRNAs in bladder cancer.** *Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations* (2012) **30** (4): 434-443
17. CORDON-CARDO C.: **Molecular alterations associated with bladder cancer initiation and progression.** *Scandinavian Journal of Urology and Nephrology* (2008) **42** (Suppl 218): 154-165
18. CURADO M. P., EDWARDS B., SHIN H. R., STORM H., FERLAY J., HEANUE M., BOYLE P.: **Cancer incidence in five continents, Vol. IX.** *International Agency for Research on Cancer Scientific Publications No. 160* (2007): 752-759
19. DAWID I. B., BREEN J. J., TOYAMA R.: **LIM domains: multiple roles as adapters and functional modifiers in protein interactions.** *Trends in Genetics* (1998) **14**: 156-162
20. DELCLOS G. L., LERNER S. P.: **Occupational risk factors.** *Scandinavian Journal of Urology & Nephrology* (2008) **42** (Suppl 218): 58-63

21. EBLE J.N., SAUTER G., EPSTEIN J. I., SESTERHENN I. A.: **World Health Organization classification of tumours. Pathology and genetics of tumours of the urinary system and male genital organs.** *International Agency for Research on Cancer Press: Lyon* (2004): 93-123
22. EPSTEIN J. I., AMIN M. B., REUTER V. R., MOSTOFI V. K., BLADDER CONSENSUS CONFERENCE COMMITTEE: **The World Health Organization / International Society of Urological Pathology consensus classification of urothelial (transitional cell) neoplasms of the urinary bladder.** *American Journal of Surgical Pathology* (1998) **22**: 1435-1448
23. FERLAY J., SHIN H.-R., BRAY F., FORMAN D., MATHERS C., PARKIN D. M.: **Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008.** *International Journal of Cancer* (2010) **127**: 2893-2917
24. FRIETSCH J. J., GRUNEWALD T. GP., JASPER S., KAMMERER U., HERTERICH S., KAPP M., HÖNIG A., BUTT E.: **Nuclear localisation of LASP-1 correlates with poor long-term survival in female breast cancer.** *British Journal of Cancer* (2010) **102**: 1645-1653
25. GARCÍA-CLOSAS M., MALATS N., SILVERMAN D., DOSEMECI M., KOGEVINAS M., HEIN D. W., TARDÓN A., SERRA C., CARRATO A., GARCÍA-CLOSAS R., LLORETA J., CASTAÑO-VINYALS G., YEAGER M., WELCH R., CHANOCK S., CHATTERJEE N., WACHOLDER S., SAMANIC C., TORÀ M., FEMÁNDEZ F., REAL F. X., ROTHMAN N.: **NAT2 slow acetylation, GSTM1null genotype, and risk of bladder cancer: results from the Spanish Bladder Cancer Study and meta-analyses.** *Lancet* (2005) **366**: 649-659
26. GASTON K. E., PRUTHI R. S.: **Value of urinary cytology in the diagnosis and management of urinary tract malignancies.** *Urology* (2004) **63**: 1009-1016
27. GREENE F. L., COMPTON C. C., FRITZ A. G., SHAH J. P., WINCHESTER D. P.: **AJCC Cancer Staging Atlas.** *American Joint Committee on Cancer* (2006): 329-335; New York: Springer
28. GRUNEWALD T. GP., BUTT E.: **The LIM and SH3 domain protein family: structural proteins or signal transducers or both?** *Molecular Cancer* (2008) **7**: 31
29. GRUNEWALD T. GP., KAMMERER U., KAPP M., ECK M., DIETL J., BUTT E., HONIG A.: **Nuclear localization and cytosolic overexpression of LASP-1 correlates with tumor size and nodal-positivity of human breast carcinoma.** *BMC Cancer* (2007) **7**: 198

30. GRUNEWALD T. GP., KAMMERER U., SCHULZE E., SCHINDLER D., HONIG A., ZIMMER M., BUTT E.: **Silencing of LASP-1 influences zyxin localization, inhibits proliferation and reduces migration in breast cancer cells.** *Experimental Cell Research* (2006) **312**: 974-982
31. GRUNEWALD T. GP., KAMMERER U., WINKLER C., SCHINDLER D., SICKMANN A., HONIG A., BUTT E.: **Overexpression of LASP-1 mediates migration and proliferation of human ovarian cancer cells and influences zyxin localization.** *British Journal of Cancer* (2007) **96**: 296-305
32. HAAG M.: **Interaktionspartner von Pro-Interleukin-16.** *FU Berlin* (2007): www.diss.fu-berlin.de/diss/receive/FUDISS_thesis_000000002670
33. HALL P.: **Radiation-associated urinary bladder cancer.** *Scandinavian Journal of Urology & Nephrology* (2008) **42** (Suppl 218): 85-88
34. HAMMARSTRÖM A., BERNDT K. D., SILLARD R., ADERMANN K., OTTING G.: **Solution structure of a naturally-occurring zinc-peptide complex demonstrates that the N-terminal zinc-binding module of the Lasp-1 LIM domain is an independent folding unit.** *Biochemistry* (1996) **35**: 12723-12732
35. HARRIS M. J., SCHWINN C. P., MORROW J. W., GRAY R. L., BROWELL B. M.: **Exfoliative cytology of the urinary bladder irrigation specimen.** *Acta Cytologica* (1971) **15** (4): 385-399
36. INGRAM W. J., WICKING C. A., GRIMMOND S. M., FORREST A. R., WAINWRIGHT B. J.: **Novel genes regulated by Sonic Hedgehog in pluripotent mesenchymal cells.** *Oncogene* (2002) **21**: 8196-8205
37. JAIN R. N., BRUNKAN C. S., CHEW C. S., SAMUELSON L. C.: **Gene expression profiling of gastrin target genes in parietal cells.** *Physiological Genomics* (2006) **24**: 124-132
38. JEMAL A., BRAY F., CENTER M. M., FERLAY J., WARD E., FORMAN D.: **Global Cancer Statistics.** *CA: A Cancer Journal for Clinicians* (2011) **61**: 69-90
39. JUMAA H., HENDRIKS R. W., RETH M.: **B cell signalling and tumorigenesis.** *Annual Review of Immunology* (2005) **23**: 415-445
40. KEICHER C., GAMBARYAN S., SCHULZE E., MARCUS K., MEYER H. E., BUTT E.: **Phosphorylation of mouse LASP-1 on threonine 156 by cAMP- and cGMP-dependent protein kinase.** *Biochemical and Biophysical Research Communications* (2004) **324**: 308-316

41. KIEMENEY L. A. L. M.: **Hereditary bladder cancer.** *Scandinavian Journal of Urology & Nephrology* (2008) **42** (Suppl 218): 110-115
42. KIRKALI Z., CHAN T., MANOHARAN M., ALGABA F., BUSCH C., CHENG L., KIEMENEY L., KRIEGMAIR M., MONTIRONI R., MURPHY W. M., SESTERHENN I. A., TACHIBANA M., WEIDER J.: **Bladder cancer: epidemiology, staging and grading, and diagnosis.** *Urology* (2005) **66** (Suppl 6A): 4-34
43. KNOWLES M. A.: **Bladder cancer subtypes defined by genomic alterations.** *Scandinavian Journal of Urology & Nephrology* (2008) **42** (Suppl 218): 116-130
44. LAEMMLI U. K.: **Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.** *Nature* (1970) **227**: 680-685
45. LAUX H., TOMER R., MADER M.T., SMIDA J., BUDCZIES J., KAPPLER R., HAHN H., BLÖCHINGER M., SCHNITZBAUER U., ECKARDT-SCHUPP F., HÖFLER H., BECKER K.-F.: **Tumor-associated E-cadherin mutations do not induce Wnt target gene expression, but affect E-cadherin repressors.** *Laboratory Investigation* (2004) **84**: 1372-1386
46. LAUX H.: **Der Einfluss von E-Cadherin und des Zellkontaktes auf das Genexpressionsprofil von MDA-MB-435S Zellen.** *Fakultät für Biologie, LMU München* (2006): http://edoc.ub.uni-muenchen.de/5995/1/Laux_Holger.pdf
47. LI B., ZHUANG L., TRUEB B.: **Zyxin interacts with the SH3 domains of the cytoskeletal proteins LIM-nebulette and Lasp-1.** *The Journal of Biological Chemistry* (2004) **279**: 20401-20410
48. LIANES P., ORLOW I., ZHANG Z.-F., OLIVA M. R., SARKIS A. S., REUTER V. E., CORDON-CARDO C.: **Altered patterns of MDM2 and TP53 expression in human bladder cancer.** *Journal of the National Cancer Institute* (1994) **86** (17): 1325-1330
49. LIN Y. H., PARK Z.-Y., LIN D., BRAHMBHATT A. A., RIO M.-C., YATES III J. R., KLEMKE R. L.: **Regulation of cell migration and survival by focal adhesion targeting of Lasp-1.** *The Journal of Cell Biology* (2004) **165**: 421-432
50. LOPEZ-BELTRAN A.: **Bladder cancer: Clinical and pathological profile.** *Scandinavian Journal of Urology & Nephrology* (2008) **42** (Suppl 218): 95-109
51. LOPEZ-BELTRAN A., CHENG L.: **Stage pT1 bladder carcinoma: diagnostic criteria, pitfalls and prognostic significance.** *Pathology* (2003) **35** (6): 484-491

52. LOTAN Y., ROEHRBORN C. G.: **Sensitivity and specificity of commonly available bladder tumor markers versus cytology: results of a comprehensive literature review and meta-analyses.** *Urology* (2003) **61**: 109-118
53. LOUGHRAN G., HUIGSLOOT M., KIELY P. A., SMITH L. M., FLOYD S., AYLLON V., O'CONNOR R.: **Gene expression profiles in cells transformed by overexpression of the IGF-1 receptor.** *Oncogene* (2005) **24**: 6185-6193
54. MALATS N.: **Genetic epidemiology of bladder cancer: Scaling up in the identification of low-penetrance genetic markers of bladder cancer risk and progression.** *Scandinavian Journal of Urology & Nephrology* (2008) **42** (Suppl 218): 131-140
55. MALIK S. N., MURPHY W. M.: **Monitoring patients for bladder neoplasms: what can be expected of urinary cytology consultations in clinical practice.** *Urology* (1999) **54** (1): 62-66
56. MARCUS P. M., HAYES R. B., VINEIS P., GARCIA-CLOSAS M., CAPORASO N. E., AUTRUP H., BRANCH R. A., BROCKMÖLLER J., ISHIZAKI T., KARAKAYA A. E., LADERO J. M., 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 Epidemiology, Biomarkers & Prevention* (2000) **9**: 461-467
57. MATZKIN H., MOINUDDIN S. M., SOLOWAY M. S.: **Value of urine cytology versus bladder washing in bladder cancer.** *Urology* (1992) **39** (3): 201-203
58. MHAWECH P., ISELIN C., PELTE M.-F.: **Value of immunohistochemistry in staging T1 urothelial bladder carcinoma.** *European Urology* (2002) **42**: 459-463
59. MITRA A. P., COTE R. J.: **Molecular screening for bladder cancer: progress and potential.** *Nature Reviews Urology* (2010) **7**:11-20
60. MOLL R., ACHTSTÄTTER T., BECHT E., BALCAROVA-STÄNDER J., ITTENSON M., FRANKE W. W.: **Cytokeratins in normal and malignant transitional epithelium. Maintenance of expression of urothelial differentiation features in transitional cell carcinomas and bladder carcinoma cell culture lines.** *American Journal of Pathology* (1988) **132**: 123-144
61. MURPHY W. M.: **Current status of urinary cytology in the evaluation of bladder neoplasms.** *Human Pathology* (1990) **21** (9): 886-896
62. MURPHY W. M.: **What's the trouble with cytology?** *The Journal of Urology* (2006) **176**: 2343-2346

63. NAKAGAWA H., TERASAKI A. G., SUZUKI H., OHASHI K., MIYAMOTO S.: **Short-term retention of actin filament binding proteins on lamellipodial actin bundles.** *FEBS Letters* (2006) **580**: 3223-3228
64. NILSSON S., ULLÉN A.: **Chemotherapy-induced bladder cancer.** *Scandinavian Journal of Urology & Nephrology* (2008) **42** (Suppl 218): 89-92
65. OKAMOTO C. T., LI R., ZHANG Z., JENG Y. Y., CHEW C. S.: **Regulation of protein and vesicle trafficking at the apical membrane of epithelial cells.** *Journal of Controlled Release* (2002) **78**: 35-41
66. PANAVIENE Z., MONCMAN C. L.: **Linker region of nebulin family members plays an important role in targeting these molecules to cellular structures.** *Cell and Tissue Research* (2007) **327**: 353-369
67. PARKIN D. M.: **The global burden of urinary bladder cancer.** *Scandinavian Journal of Urology & Nephrology* (2008) **42** (Suppl 218): 12-20
68. PELUCCHI C., BOSETTI C., NEGRI E., MALVEZZI M., LA VECCHIA C.: **Mechanisms of disease: the epidemiology of bladder cancer.** *Nature Reviews Urology* (2006) **3**: 327-340
69. PHILLIPS G. R., ANDERSON T. R., FLORENS L., GUDAS C., MAGDA G., YATES J.R. III, COLMAN D. R.: **Actin-binding proteins in a postsynaptic preparation: Lasp-1 is a component of central nervous system synapses and dendritic spines.** *Journal of Neuroscience Research* (2004) **78**: 38-48
70. PLANZ B., JOCHIMS E., DEIX T., CASPERS H. P., JAKSE G., BOECKING A.: **The role of urinary cytology for detection of bladder cancer.** *European Journal of Surgical Oncology* (2005) **31**: 304-308
71. RAMAN D., SAI J., NEEL N.F, CHEW C. S., RICHMOND A.: **LIM and SH3 protein -1 modulates CXCR2-mediated cell migration.** *PLoS ONE* (2010) **5** (4): e10050
72. RACHLIN A. S., OTEY C. A.: **Identification of palladin isoforms and characterization of an isoform-specific interaction between Lasp-1 and palladin.** *Journal of Cell Science* (2005) **119**: 995-1004
73. REN F., ZHAN X., MARTENS G., LEE J., CENTER D., HANSON S. K., KORNFELD H.: **Pro-IL-16 regulation in activated murine CD4⁺ lymphocytes.** *The Journal of Immunology* (2005) **174**: 2738-2745

74. RICHTER J., BEFFA L., WAGNER U., SCHRAML P., GASSER T. C., MOCH H., MIHATSCH M. J., SAUTER G.: **Patterns of chromosomal imbalances in advanced urinary bladder cancer detected by comparative genomic hybridization.** *American Journal of Pathology* (1998) **153** (5): 1615-1621
75. RICHTER J., JIANG F., GÖRÖG J.-P., SARTORIUS G., EGENTER C., GASSER T. C., MOCH H., MIHATSCH M. J., SAUTER G.: **Marked genetic differences between stage pTa and stage pT1 papillary bladder cancer detected by comparative genomic hybridization.** *Cancer Research* (1997) **57**: 2860-2864
76. RIDLEY A. J., SCHWARTZ M. A., BURRIDGE K., FIRTEL R. A., GINSBERG M. H., BORISY G., PARSONS J. T., HORWITZ A. R.: **Cell migration: Integrating signals from front to back.** *Science* (2003) **302**: 1704-1709
77. RILEY G. F., POTOSKY A. L., LUBITZ J. D., KESSLER L. G.: **Medicare payments from diagnosis to death for elderly cancer patients by stage at diagnosis.** *Medical Care* (1995) **33** (8): 828-841
78. ROBERT KOCH-INSTITUT UND DIE GESELLSCHAFT DER EPIDEMIOLOGISCHEN KREBSREGISTER IN DEUTSCHLAND E.V.: **Krebs in Deutschland 2005/2006. Häufigkeiten und Trends. 7. Ausgabe.** *RKI, Berlin* (2010): 84-87
79. ROSS J. S., CHEUNG C., SHEEHAN C., DEL ROSARIO A. D., BUI H. X., FISHER H. A. G.: **E-cadherin cell-adhesion molecule expression as a diagnostic adjunct in urothelial cytology.** *Diagnostic Cytopathology* (1996) **14** (4): 310-315
80. ROSS J. S., DEL ROSARIO A. D., FIGGE H. L., SHEEHAN C., FISHER H. A. G., BUI H. X.: **E-cadherin expression in papillary transitional cell carcinoma of the urinary bladder.** *Human Pathology* (1995) **26** (9): 940-944
81. SANCHEZ-CARBAYO M., SOCCI N. D., CHARYTONOWICZ E., LU M., PRYSTOWSKY M., CHILDS G., CORDON-CARDO C.: **Molecular profiling of bladder cancer using cDNA microarrays: defining histogenesis and biological phenotypes.** *Cancer Research* (2002) **62**: 6973-6980
82. SÁNCHEZ-GARCÍA I., RABBITS T. H.: **The LIM domain: a new structural motif found in zinc-finger-like proteins.** *Trends in Genetics* (1994) **10**: 315-320
83. SCHREIBER V., MOOG-LUTZ C., RÉGNIER C. H., CHENARD M.-P., BOEUF H., VONESCH J.-L., TOMASETTO C., RIO M. C.: **Lasp-1, a novel type of actin-binding protein accumulating in cell membrane extensions.** *Molecular Medicine* (1998) **4**: 675-687

84. SKINNER E. C.: **The best treatment for high-grade T1 bladder cancer is cystectomy.** *Urologic Oncology* (2007) **25** (6): 523-525
85. SOMMER S., HUNZINGER C., SCHILLO S., KLEMM M., BIEFANG-ARNDT K., SCHWALL G., PÜTTER S., HOELZER K., SCHROER K., STEGMANN W., SCHRATTENHOLZ A.: **Molecular analysis of homocysteic acid-induced neuronal stress.** *Journal of Proteome Research* (2004) **3**: 572-581
86. SPENCE H. J., MCGARRY L., CHEW C. S., CARRAGHER N. O., SCOTT-CARRAGHER L. A., YUAN Z., CROFT D. R., OLSON M. F., FRAME M., OZANNE B. W.: **AP-1 differentially expressed proteins Krp1 and fibronectin cooperatively enhance Rho-ROCK-independent mesenchymal invasion by altering the function, localization and activity of nondifferentially expressed proteins.** *Molecular and Cellular Biology* (2006) **26** (4): 1480-1495
87. STREHL S., BORKHARDT A., SLANY R., FUCHS U. E., KÖNIG M., HAAS O. A.: **The human LASP1 gene is fused to MLL in an acute myeloid leukemia with t(11;17)(q23;q21).** *Oncogene* (2003) **22**: 157-160
88. TAN P.-H., BAY B.-H., YIP G., SELVARAJAN S., TAN P., WU J., LEE C.-H., LI K.-B.: **Immunohistochemical detection of Ki67 in breast cancer correlates with transcriptional regulation of genes related to apoptosis and cell death.** *Modern Pathology* (2005) **18** (3): 374-381
89. TILKI D., BURGER M., DALBAGNI G., GROSSMAN H. B., HAKENBERG O. W., PALOU J., REICH O., ROUPRÊT M., SHARIAT S. F., ZLOTTA A. R.: **Urine markers for detection and surveillance of non-muscle-invasive bladder cancer.** *European Urology* (2011) **60**: 484-492
90. TOMASETTO C., RÉGNIER C., MOOG-LUTZ C., MATTEI M. G., CHENARD M. P., LIDEREAU R., BASSET P., RIO M. C.: **Identification of four novel human genes amplified and overexpressed in breast carcinoma and localized to the q11-q21.3 region of chromosome 17.** *Genomics* (1995) **28**: 367-376
91. TOMASETTO C., MOOG-LUTZ C., RÉGNIER C. H., SCHREIBER V., BASSET P., RIO M. C.: **Lasp-1 (MLN 50) defines a new LIM protein subfamily characterized by the association of LIM and SH3 domains.** *FEBS Letters* (1995) **373**: 245-249
92. TOWBIN H., STAHELIN T., GORDON J.: **Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gelsto nitrocellulose sheets: Procedure and some applications.** *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America* (1979) **76**(9): 4350-4354

93. TRAENKA C., REMKE M., KORSHUNOV A., BENDER S., HIELSCHER T., NORTHCOTT P. A., WITT H., RYZHOVA M., FELSBURG J., BENNER A., RIESTER S., SCHEURLEN W., GRUNEWALD T. G. P., VON DEIMLING A., KULOZIC A. E., REIFENBERGER G., TAYLOR M. D., LICHTER P., BUTT E., PFISTER S. M.: **Role of LIM and SH3 Protein 1 (LASP1) in the metastatic dissemination of medulloblastoma.** *Cancer Research* (2010) **70**(20): 8003-8014
94. TRAENKA J., HAUCK C. R., LEWANDROWSKI U., SICKMANN A., GAMBARYAN S., THALHEIMER P., BUTT E.: **Integrin-dependent translocation of LASP-1 to the cytoskeleton of activated platelets correlates with LASP-1 phosphorylation at tyrosine 171 by Src-kinase.** *Thrombosis and Haemostasis* (2009) **102** (3): 520-528
95. VAN DER KWAST TH. H.: **How to combine the molecular profile with the clinicopathological profile of urothelial neoplastic lesions.** *Scandinavian Journal of Urology & Nephrology* (2008) **42** (Suppl 218): 175-184
96. WANG B., FENG P., XIAO Z., REN E.-C.: **LIM and SH3 protein 1 (Lasp1) is a novel p53 transcriptional target involved in hepatocellular carcinoma.** *Journal of Hepatology* (2009) **50**(3): 528-537
97. WETMORE C.: **Sonic hedgehog in normal and neoplastic proliferation: insight gained from human tumors and animal models.** *Current Opinion in Genetics & Development* (2003) **13**: 34-42
98. WITJES J. A.: **Bladder carcinoma in situ in 2003: state of the art.** *European Urology* (2004) **45**: 142-146
99. ZEIN T., WAJSMAN Z., ENGLANDER L. S., GAMARRA M., LOPEZ C., HUBEN R. P., PONTES J. E.: **Evaluation of bladder washings and urine cytology in the diagnosis of bladder cancer and its correlation with selected biopsies of the bladder mucosa.** *Journal of Urology* (1984) **132**: 670-671
100. ZHAO J., RICHTER J., WAGNER U., ROTH B., SCHRAML P., ZELLWEGER T., ACKERMANN D., SCHMID U., MOCH H., MIHATSCH M. J., GASSER T. C., SAUTER G.: **Chromosomal imbalances in noninvasive papillary bladder neoplasms (pTa).** *Cancer Research* (1999) **59**: 4658-4661
101. ZHAO L., WANG H., LIU C., LIU Y., WANG X., WANG S., SUN X., LI J., DENG Y., JIANG Y., DING Y.: **Promotion of colorectal cancer growth and metastasis by the LIM and SH3 domain protein 1.** *Gut* (2010) **59**: 1226-1235

8. ABKÜRZUNGEN

♀	Venus-Symbol, Symbol für eine Frau
♂	Mars-Symbol, Symbol für einen Mann
A	Ampere, Maßeinheit für die elektrische Stromstärke
APS	Ammoniumpersulfat
BCA	engl. bladder cancer antigen
BCLA-4	engl. bladder cancer nuclear matrix protein
BTA	engl. bladder tumor antigen
ca.	circa
Ca	Karzinom, lat. Carcinoma
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
cDNA	komplementäre DNA, engl. complementary
c-erbB-2	Protoonkogen, dazugehöriges Protein HER-2/neu
cGMP	cyclisches Guanosinmonophosphat
CK	Cytokeratin, engl. cytokeratin
cm	Zentimeter, Längeneinheit
C-terminal	Carboxy-terminal; bezeichnet jenes Ende eines Proteins, welches eine Aminosäure mit einer freien Carboxygruppe (COOH) besitzt
CXC	Chemokin-Familie
CXCR	Chemokin-Rezeptor, CXC-Rezeptor
CXCR1	CXC-Rezeptor 1
CXCR2	CXC-Rezeptor 2
CXCR3	CXC-Rezeptor 3
CXCR4	CXC-Rezeptor 4

°C	Grad Celsius, Maßeinheit der Temperatur
DAB	3,3'-Diaminobenzidin, Chromogen
dH₂O	destilliertes Wasser
DNA	Desoxyribonukleinsäure, engl. desoxyribonucleic acid
ECL	Elektrochemilumineszenz
F-Aktin	Aktinfilament, bestehend aus polymerisierten Aktin-Monomeren
FDP	engl. fibrin degradation product
FET	Fisher's exact test
g	Gramm, Maßeinheit für die Masse
G-Aktin	globuläres Aktin, Aktin-Monomer
G1	Differenzierungsgrad 1, gut differenziertes Gewebe
G2	Differenzierungsgrad 2, mäßig differenziertes Gewebe
G3	Differenzierungsgrad 3, schlecht differenziertes Gewebe
h	Stunde, Maßeinheit für die Zeit
HA	Hyaluronsäure, engl. hyaluronic acid
HAase	Hyaluronidase, engl. hyaluronidase
HCG	humanes Choriongonadotropin, engl. human chorionic gonadotropin
HCl	Chlorwasserstoff; Salzsäure ist die wässrige Lösung von Chlorwasserstoff
HE	Hämatoxylin-Eosin
HER-2/neu	epidermaler Wachstumsfaktorrezeptor, engl. human epidermal growth factor receptor 2
Hgb	Hämoglobin, engl. hemoglobin
H₂O₂	Wasserstoffperoxid
HRP	Meerrettichperoxidase, engl. horseradish peroxidase

IGF-1	insulinähnlicher Wachstumsfactor 1, engl. insulin-like growth factor 1
IgG	Immunglobulin G
IRS	immunreaktiver Score
kDa	Kilodalton, 1 kDa = 1000 Da (Dalton), atomare Masseneinheit
Ki67	Ki67, Protein
Krp 1	engl. kelch related protein 1
l	Liter, Maßeinheit für das Volumen
LASP-1	LIM- und SH3-Domänen Protein 1
LIM	Akronym, zusammengesetzt aus den Namen der ersten 3 Proteine, die diese Domäne beinhalteten: <u>l</u> in-11, <u>l</u> sl-1, <u>m</u> ec-3
LPP	engl. lipoma preferred partner
LSAB	engl. labelled Streptavidin-Biotin
M	Molar, 1 M = 1 mol/l, Einheit der Stoffmengenkonzentration
µg	Mikrogramm, Maßeinheit für die Masse
µl	Mikroliter, Maßeinheit für das Volumen
min	Minute, Maßeinheit für die Zeit
ml	Milliliter, Maßeinheit für das Volumen
MLL	engl. mixed lineage leukemia
mm	Millimeter, Längenmaßeinheit
mM	Millimolar, 1 mM = 1 mmol/l, Einheit der Stoffmengenkonzentration
mRNA	Boten-RNA, engl. messenger
MWT	Mann-Whitney-Test
N	Einheit der Äquivalentkonzentration

NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
NMP22	engl. nuclear matrix protein 22
N-terminal	Amino-terminal; bezeichnet jenes Ende eines Proteins, welches eine Aminosäure mit einer freien Aminogruppe (NH ₂) besitzt
PBS	phosphatgepufferte Kochsalzlösung; engl. phosphate buffered saline
pH-Wert	Definition: der negative dekadische Logarithmus der Wasserstoffionen-Aktivität; Maß für den sauren oder basischen Charakter einer wässrigen Lösung
PUN-LMP	engl. papillary urothelial neoplasm of low malignant potential
P-Wert	Signifikanzwert, engl. p-value von probability
p53	p53, Tumorsuppressorprotein
%	Prozent, Hilfsmaßeinheit für Verhältnisgrößen
q	langer Arm eines Chromosoms
RNA	Ribonukleinsäure, engl. ribonucleic acid
rpm	Umdrehungen pro Minute, Maßeinheit für die Drehzahl engl. revolutions per minute
s	Sekunde, Maßeinheit für die Zeit
S	Serin
SD	Standardabweichung, engl. standard deviation
SDS	Natriumdodecylsulfat, engl. sodium dodecyl sulfate
SH3	engl. Src homology region 3; abgeleitet von der Proteinkinase c-Src, in der die Domäne das erste mal beschrieben wurde

Src	auch c-SRC; Akronym, zusammengesetzt aus <u>c</u> ellular und <u>s</u> arcoma
TBS	engl. Tris buffered saline
TBS/T	engl. Tris buffered saline with Tween
TCA	Trichloressigsäure, engl. trichloroacetic acid
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TNM	Klassifikation zur Stadieneinteilung maligner Tumoren; T = Tumor, N = Lymphknoten, M = Metastasen
TPA	engl. tissue polypeptide antigen
TPS	engl. tissue polypeptide-specific (antigen)
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
UBC	engl. urinary bladder cancer
USA	Vereinigten Staaten, engl. United States of America
V	Volt, Maßeinheit für die elektrische Spannung
VASP	engl. vasodilator stimulated phosphoprotein
% (v/v)	Volumenprozent, engl. % volume per volume = [Volumen eines gelösten Stoffes in ml / Volumen der Lösung in ml] x 100
W	Watt, Maßeinheit für die Leistung
WHO	Weltgesundheitsorganisation, engl. World Health Organisation
Wnt	setzt sich zusammen aus W für wingless + nt für Int-1
% (w/v)	Massenprozent, engl. % weight per volume = [Masse eines Stoffes in g / Volumen der Lösung in ml] x 100
Y	Tyrosin

9. DANKSAGUNG

Mein besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. rer. nat. Elke Butt (Institut für Klinische Biochemie und Pathobiochemie, Universität Würzburg) für die Bereitstellung des Dissertationsthemas. Während der gesamten Zeit stand sie mir mit Rat und Tat zur Seite. Ihre vielen Verbesserungsvorschläge und wertvollen Anregungen haben mir stets weitergeholfen. Auch die angenehme und freundschaftliche Arbeitsatmosphäre wusste ich von Anfang zu schätzen. Die mir entgegengebrachte Geduld und das Verständnis gingen über das normale Maß hinaus, wofür ich sehr dankbar bin.

Für die Übernahme des Koreferates bin ich Herrn Prof. Dr. rer. nat. Kai Schuh (Physiologisches Institut der Universität Würzburg) zu Dank verpflichtet. Sein Interesse an meiner Arbeit hat mich sehr gefreut.

Herrn Dr. med. Peter Ardelt (Abteilung für Urologie, Universitätsklinikum Freiburg) möchte ich für die ausgesprochen gute Zusammenarbeit danken. Durch seine Hilfe und Bereitschaft war es überhaupt erst möglich die benötigten Urinproben zu sammeln.

Ebenfalls gebührt mein Dank Frau Dr. med. Annette Strehl (Institut für Pathologie, Universität Würzburg) für die Bereitstellung der histologischen Schnitte und für die Unterstützung bei der Begutachtung der Präparate.

Frau Petra Thalheimer (Institut für Klinische Biochemie und Pathobiochemie, Universität Würzburg), Frau Michaela Kapp (Frauenklinik, Universitätsklinikum Würzburg) und Frau Elisabeth Noak (Institut für Pathologie, Universität Würzburg) danke ich ganz herzlich für die Anleitung im Labor, für die Hilfestellung bei der Durchführung meiner Versuche und für die tatkräftige

Unterstützung beim Anfertigen der Präparate. Sie haben wesentlich zum Gelingen meiner Arbeit beigetragen.

Desweiteren möchte ich mich bei Herrn Dr. med. Jochen Frietsch (Abteilung Hämatologie und Internistische Onkologie, Klinik für Innere Medizin II, Universitätsklinikum Jena) für die Hilfe bei der Bewertung der histologischen Präparate bedanken. Seine Tipps und Erklärungen waren immer hilfreich.

Mein Dank gilt auch Herrn Rudolf Bayer, der mir bei sprachlichen Problemen gerne mit Verbesserungsvorschlägen zur Seite stand.

Als letztes möchte ich noch meinen Eltern und meinem Freund danken. Mit ihrer bedingungslosen Liebe und dem unendlichen Verständnis haben sie mich über all die Jahre zu jeder Zeit und in allen Lebenslagen unterstützt. Ohne sie wäre es mir nicht möglich gewesen, das Medizinstudium und diese Dissertation zu vollenden.