

Aus dem Institut für Pathologie
der Universität zu Lübeck
Direktor: Prof. Dr. med. A. C. Feller

**Der Rekombinationsfaktor Rad51 im oberflächlichen
Harnblasenkarzinom:
Eine immunhistochemische Studie**

Inauguraldissertation

zur
Erlangung der Doktorwürde
der Universität zu Lübeck
- Aus der Medizinischen Fakultät -

vorgelegt von
Belinda Oidtmann
aus Schweinfurt

Lübeck 2006

1. Berichterstatter: Prof. Dr. rer. hum. biol.
Horst-Werner Stürzbecher

2. Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. med.
Ingo Kausch-Blecken von Schmeling

Tag der mündlichen Prüfung: 26.06.2007

zum Druck genehmigt. Lübeck, den 26.06.2007

gez. Prof. Dr. med. Werner Solbach
- Dekan der Medizinischen Fakultät -

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	6
Verzeichnis der Abbildungen und Tabellen	8
Abbildungen	8
Tabellen	9
1 Einleitung	10
1.1 Krebserkrankungen	10
1.2 Überblick Harnblasenkrebs	11
1.3 Risikofaktoren beim Harnblasenkrebs	12
1.3.1 Umweltbedingte Faktoren	12
1.3.2 Einfluß von Geschlecht und Alter	13
1.4 Klassifizierung des Harnblasenkrebses	14
1.4.1 TMN-Klassifikation	14
1.4.2 „Grading“	17
1.5 Tumormarker	20
1.5.1 Rad51 - Homologe Rekombinationsreparatur (HRR)	21
1.5.2 Rad51 in der Zelle	22
1.5.3 Rad51-Expression in Tumoren	23
1.6 Zielsetzung	25
2 Patienten und Methoden	26
2.1 Patienten	26
2.2 Verbrauchsmaterialien	28
2.2.1 Chemikalien	28
2.2.2 Antikörper	28
2.2.3 Lösungen	29
2.2.4 Geräte und Laborbedarf	30

2.3	Aufbereitung	30
2.3.1	Entparaffinisierung	30
2.3.2	Antigendemaskierung	30
2.3.3	Permeabilisieren und Blockieren	31
2.3.4	Antikörper	32
2.3.5	Kerngegenfärbung	33
2.4	Kontrollen	33
2.5	Auswertung	34
2.5.1	Bilddokumentation	34
2.5.2	Bildanalyse	34
2.5.3	Statistische Analyse	36
3	Ergebnisse	38
3.1	Deskriptive Ergebnisse	39
3.1.1	Soziodemographische und biologische Variablen	39
3.1.2	Rad51, Ki67, p21 ^{Waf-1}	41
3.2	Inferenzstatistische Ergebnisse	43
3.2.1	Zusammenhang zwischen klinischen Parametern und Rad51-Expression	43
3.2.2	Überlebenszeitanalysen: uni- und multivariate Cox-Regressionsanalyse	45
4	Diskussion	50
4.1	Das Harnblasenkarzinom im Überblick	50
4.2	Methodenanalyse	51
4.2.1	Umfang der Studie	51
4.2.1.1	„Grading“ in dieser Studie	52
4.2.1.2	„Staging“ und Einschlußkriterien von Studien	53
4.2.2	Objektivität, Reliabilität und Validität der Methodik	55
4.3	Studienergebnisse	56
4.3.1	Die Bedeutung von Rad51	57
4.3.2	Folgen der Rad51-Überexpression	63

4.3.3	Rad51 und p21 ^{Waf-1}	64
4.3.4	Ki67 in der Studie	67
4.3.5	Kombination von Parametern	68
4.3.6	Andere Prognosemarker im Harnblasenkarzinom	68
4.4	Ausblick	69
5	Zusammenfassung	71
6	Literaturverzeichnis	72
7	Anhang	91
8	Danksagung	93
9	Lebenslauf	94

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
BCG	Bacillus-Calmette-Guérin
bzw.	beziehungsweise
CDK	„cyclin-dependent kinase“
CDKI	„cyclin-dependent kinase inhibitor“
CIP1	„cyclin-dependent kinase interaction protein 1“
Cis	Carcinoma in situ
CML	chronisch myeloische Leukämie
Da	Dalton
DAB	Diaminobenzidin
d. h.	das heißt
DNA	Desoxyribonukleinsäure („desoxyribonucleic acid“)
DSB	Doppelstrangbruch
et al.	und andere (lateinisch: et alii)
FTK	Fusionstyrosinkinase wie z. B. BCR/ABL
G, G1/2/3	histologisches „Grading“ (vgl. 4.2.1.1)
G ₀ , G ₁ , G ₂	„Gap“ Phasen („gap“ - Lücke) des Zellzyklus
HE	Hämatoxylin-Eosin
ISUP	International Society of Urological Pathology
JPEG	„Joint Photographic Experts Group“, ein Dateiformat für Computergrafiken mit hoher Datenkompression
LMP	„low malignant potential“
LOH	„Loss of Heterozygosity“
M	(Fern-) Metastasenstatus (vgl. Tab. 1)
n, n _k	Anzahl/Umfang, Klassenumfang
N	Nodalstatus (vgl. Tab. 1)
p	(Irrtums-) Wahrscheinlichkeit (lateinisch: probabilitas)
PBS	„Phosphate buffered saline“

PCI	„Positive stained Cell Index“
PUNLMP	„papillary neoplasm of low malignant potential“
RR	relative Risiken
S	Synthesephase des Zellzyklus
SCI1	senescent cell-derived inhibitor 1
SPSS	Programm zur statistischen Analyse von Daten
STAT5	„Signal transducer and activator of transcription 5“
TMUGS	„tumor marker utility grading system“
T	Tumorgröße (vgl. Tab. 1)
Tab.	Tabelle
vgl.	vergleiche
Waf-1	wt-p53 activated fragment 1
WHO	„World Health Organization“
z. B.	zum Beispiel

Die verwendeten Maßeinheiten entsprechen den SI-Einheiten („Système International d’Unités“) und sind nicht in diesem Verzeichnis gesondert aufgeführt.

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Überblick der T-Stadien des nicht-muskelinvasiven Harnblasenkarzinoms	16
Abb. 2: Antikörperbeschickung der Präparate	32
Abb. 3: Referenzbild zur Auswertung positiver Zellkerne	35
Abb. 4: Überblick der Färbeergebnisse von Rad51, p21^{Waf-1} und Ki67 in unterschiedlichen „Gradingstufen“	42
Abb. 5: Kaplan-Meier-Kurve: Zeitspanne bis zur pT1-Progression in Abhängigkeit von der Rad51-Expression	47
Abb. 6: Kaplan-Meier-Kurve: Zeitspanne bis zur pT2-Progression in Abhängigkeit von der Rad51-Expression	48
Abb. 7: Kaplan-Meier-Kurve: Zeitspanne bis zum Auftreten eines Rezidivs in Abhängigkeit von der Rad51-Expression	48

Tabellenverzeichnis

Tab. 1:	Übersicht der TNM-Stadien beim Harnblasenkarzinom	15
Tab. 2:	Überführung des „Gradings“ gemäß WHO Einteilung 1973 in die WHO/ISUP- Einteilung 1998	18
Tab. 3:	„Grading“- Einteilung nach WHO/ISUP 1998	19
Tab. 4:	Patientenverteilung bei tumorrelevanten und sozio- demographischen Variablen in der Studie	40
Tab. 5:	Übersicht immunhistochemischer Nachweis von Rad51, Ki67 und p21^{Waf-1}	41
Tab. 6	Klinisch-pathologische Parameter in Korrelation zur Rad51-Expression	44
Tab. 7:	Verteilung des histologischen „Gradings“ gemäß WHO/ISUP–Einteilung in verschiedenen Studien zum Harnblasenkarzinom	53
Tab. 8:	Überblick über die „Staging“- Einteilung der Harnblasenkarzinome	54
Tab. 9:	Univariate und multivariate Cox-Regressionsanalyse von potentiellen Prognosefaktoren	91

1 Einleitung

1.1 Krebserkrankungen

„Der Krebs hat sein Geheimnis noch nicht verraten, aber wir beginnen ihn besser zu erkennen“ (Cabanne et al., 2000).

Den Krebsursachen auf die Spur zu kommen, neue Therapieformen zu erforschen und maligne Erkrankungen besser zu verstehen, haben viele wissenschaftliche Arbeitsgruppen zum Ziel.

Krebserkrankungen belegen nach Herz-Kreislaufstörungen den zweiten Rang in der Todesursachenstatistik in vielen Industriestaaten (Stat.Bundesamt, 2004). Jährlich erkranken knapp 400.000 Menschen in Deutschland an bösartigen Neubildungen, im selben Zeitraum versterben über 210.000 Krebspatienten. Prostata, Darm, Lunge und Harnblase sind beim Mann am häufigsten betroffen, bei der Frau dagegen Brustdrüse, Darm, Lunge und Gebärmutterkörper. Somit ist die Situation der Krebsbehandlung nach wie vor unbefriedigend und stellt Wissenschaft und medizinische Forschung vor große Herausforderungen.

Ein Zusammenspiel verschiedenster Ursachen wird für die Entstehung einer Krebserkrankung verantwortlich gemacht. Zu diesen Risikofaktoren werden unter anderem falsche Ernährungsweisen, wie Überernährung, zu fettreiche Speisen oder zu wenig Obst und Gemüse, Einflüsse der Umwelt, wie Sonneneinstrahlung oder Passivrauchen, und des Arbeitsplatzes, wie Chemikalieneinwirkungen, gezählt (Bertz et al., 2006). Über Jahre hinweg kumulieren durch diese Faktoren ausgelöste Gewebsveränderungen und führen schließlich in der Mehrzahl erst im Alter zur Krebsentstehung. Man kann also aufgrund der steigenden Lebenserwartung der Bevölkerung vermuten, daß es zukünftig immer mehr Krebsfälle geben wird.

1.2 Überblick Harnblasenkrebs

Der Harnblasenkrebs ist nach dem Prostatakrebs die zweithäufigste maligne Erkrankung im Urogenitaltrakt. Mit einer jährlichen Neuerkrankungsrate von 25.950 Harnblasenkrebsfällen in Deutschland (Bertz et al., 2006) und 61.420 in den USA (Jemal et al., 2006) liegt der Harnblasenkrebs an fünfter Stelle aller Neoplasien in Industriestaaten.

Die Mehrheit aller Harnblasenkrebsse zeigt sich oberflächlich, nur 15% sind bei ihrer Entdeckung invasiv, 5% haben metastasiert. Doch gerade diese Oberflächenkarzinome zeigen bezüglich Rezidivverhalten, Invasivität und Ansprechen auf Therapie eine große Heterogenität.

Mit ca. 95% kommt das Karzinom, ein maligner epithelialer Tumor, am häufigsten vor. Daneben findet man auch mesenchymale Malignome, Sarkome genannt, und Metastasen anderer Primärtumoren wie Lunge, Magen oder Dickdarm.

Über 90% der Karzinome sind papilläre Übergangsepithelkarzinome. Plattenepithelkarzinome finden sich gehäuft bei Steinbildungen und Bilharziose, Adenokarzinome sind dagegen sehr selten. Im Kindesalter ist die Blase neben Vagina, Uterus und Prostata eine der Hauptlokalisationen für das embryonale Rhabdomyosarkom.

Die Wandlung einer normalen Urothelzelle in eine maligne Zelle ist ein komplexer Prozeß, der in mehreren Schritten abläuft. Einerseits kann ein Funktionsverlust von Tumorsuppressorgenen, andererseits aber auch die Induktion von Onkogenen oder eine veränderte Expression von Zell-Zyklus-Genen und DNA-Reparatur-Genen zu einem unregulierten Wachstum und Proliferation führen (Brandau und Bohle, 2001). Bei der Entstehung des Harnblasenkarzinoms sind die Onkogene Ras, ERBB2 und EGF-Rezeptor von Bedeutung (Kroft und Oyasu, 1994). Auch eine Inaktivierung von Tumorsuppressor-Genen wie dem Retinoblastom-Gen (Rb) (Takahashi et al., 1991;

Nevins et al., 1997) und p53 (Sidransky et al., 1991; Sarkis et al., 1993) fördert die Karzinogenese. p53 ist ein Tumorsuppressor, der durch Streßreize aktiviert den Zellzyklus in der G1-Phase anhält und dadurch der Zelle Zeit gibt, um z. B. eine Reparatur geschädigter DNA durchzuführen. Andererseits kann p53 aber auch die Apoptose, den programmierten Zelltod, auslösen. Der Gehalt des p53-Proteins in der Zelle scheint eine wichtige Rolle bei der Wahl zwischen Apoptose und Zellzyklusarrest zu spielen (Chen et al., 1996).

Die bisher vorliegenden Daten hinsichtlich der Karzinogenese des Harnblasenkarzinoms führten zu der Schlußfolgerung, daß es frühe und späte genetische Veränderungen in der Harnblasenkrebsevolution gibt und mindestens zwei Wege der Krebsentstehung bestehen (Brandau und Bohle, 2001). Eine frühe Veränderung bei der Entstehung eines oberflächlichen Harnblasenkrebses scheint ein „Loss of Heterozygosity“ (LOH) auf Chromosom 9 zu sein. Eine p53-Mutation fällt vor allem als ein frühes Ereignis bei der Entstehung eines Carcinoma in situ auf, ist aber auch mitverantwortlich für eine spätere Tumorprogredienz und invasives Wachstum bei oberflächlichen Tumoren.

1.3 Risikofaktoren beim Harnblasenkrebs

1.3.1 Umweltbedingte Faktoren

Das Zigarettenrauchen ist ein Hauptrisikofaktor bei der Harnblasenkrebsentstehung (Bertz et al., 2006).

Das Risiko, ein Harnblasenkarzinom zu entwickeln, ist bei Rauchern um ein vierfaches erhöht (Kirkali et al., 2005). Auch die Exposition gegenüber chemischen Karzinogenen wie Naphthylamin, Benzidin oder Dichlorobenzidin, die z. B. in der kautschuk- und farbverarbeitenden Industrie verwendet werden, wird zu den Risikofaktoren gezählt (Kirkali et al., 2005). Eine jahrelange Einwirkung von Chemikalien wird für bis zu 20% der Harnblasentumoren verantwortlich gemacht

(Vineis und Simonato, 1991). Die langsame Akkumulation von aromatischen Amininen über Jahre führt beispielsweise zu einer langen Latenzperiode bevor der Harnblasenkrebs sich etabliert.

Die chronische Zystitis ist mit einem erhöhten Risiko assoziiert, ein Plattenepithelkarzinom der Harnblase zu entwickeln. Diese langsam verlaufende Harnblasenentzündung, ausgelöst durch einen Dauerkatheter oder auch durch Blasensteine, führt zu einer repetitiven Irritation des Gewebes, die sich dann über Metaplasie und Dysplasie zu einem Harnblasenkarzinom entwickelt (Stonehill et al., 1996).

Patienten, die mit dem Immunsuppressivum Cyclophosphamid behandelt wurden, erkranken gegenüber der Normalbevölkerung bis zu neunmal häufiger an Harnblasenkrebs (Tuttle et al., 1988). Hierbei scheint das Risiko direkt mit der Gesamtdosis des Medikaments zu korrelieren (Travis et al., 1995). Der Metabolit Acrolein ist für seine karzinogene Wirkung bekannt und wird hier ursächlich verantwortlich gemacht für die Krebsentstehung (Cohen et al., 1992). Diese Patienten entwickeln häufig einen höhergradigen, schnell wachsenden und zum Diagnosezeitpunkt schon muskelinvasiven Krebs (Fernandes et al., 1996).

Ebenfalls einen höhergradigen und zum Diagnosezeitpunkt schon lokal fortgeschrittenen Tumor zeigen Patienten etwa 5-10 Jahre nach einer Strahlentherapie im Bereich des Beckens (Kaldor et al., 1995). Auch in diesem Fall ist der genaue Entstehungsmechanismus des sekundären Harnblasenkrebses unbekannt (Jung und Messing, 2000).

1.3.2 Einfluß von Geschlecht und Alter

Männer haben gegenüber Frauen ein dreifach erhöhtes Risiko an Harnblasenkrebs

zu erkranken. Bei Männern machen Krebserkrankungen der Harnblase 8,6% aller bösartigen Neubildungen aus, bei Frauen sind es 3,5% (Bertz et al., 2006).

Ungefähr 80% der Erstdiagnosen an Übergangsepithelkarzinomen entfallen auf die Gruppe der über 60jährigen Frauen und Männer (Messing et al., 1995). Als Ursache hierfür vermutet man zum einen die jahrelange Exposition gegenüber Umweltgiften, das Nachlassen der Effektivität der DNA-Reparaturmechanismen und eine Dauerreizung der Harnblase, wie sie bei nicht restfreier Entleerung entstehen kann (Jung und Messing, 2000).

Im Hinblick darauf, daß die Lebenserwartung stetig ansteigt und die ältere Bevölkerungsgruppe rasch wächst, ist daher mit einem Anstieg der Harnblasenkrebsfälle in den nächsten Jahren zu rechnen (Bertz et al., 2006). Verstärkte Bemühungen auf dem Gebiet der Harnblasenkrebsdiagnose und -prognosestellung sind somit gefordert.

1.4 Klassifizierung des Harnblasenkrebses

1.4.1 TNM-Klassifikation

Die allgemein gebräuchliche TNM-Klassifikation der malignen Tumoren findet auch beim Harnblasenkarzinom Anwendung, wobei T für Tumorgröße, N für Lymphknotenstatus und M für die Metastasierung steht.

T - Tumorstadium	
Ta	nichtinvasiv papillär
Cis	Carcinoma in situ („flat tumor“)
T1	Infiltration in subepitheliales Bindegewebe
T2	Infiltration in Muskulatur
T3	Infiltration in perivesikales Fettgewebe
T4	Infiltration in Prostata, Uterus, Vagina, Becken- oder Bauchwand
N - Regionäre Lymphknoten	
N0	kein Anhalt für regionäre Lk-Filiae
N1	Metastase in solitärem Lk < 2cm in größter Ausdehnung
N2	Metastase in solitärem Lk > 2cm, aber < 5cm in größter Ausdehnung
N3	Metastase in Lk > 5cm in größter Ausdehnung
M - Fernmetastasen	
M0	Kein Anhalt für Fernmetastasen
M1	Fernmetastasen

Tab. 1: Übersicht der TNM-Stadien beim Harnblasenkarzinom

Modifiziert nach Alken und Mickisch, 1998

Beim Harnblasenkarzinom unterscheidet man zwischen den nicht-muskelinvasiven (Ta, Cis und T1) und invasiven (T2, T3 und T4) Tumoren. Gerade bei der ersten Gruppe bestehen große Unterschiede hinsichtlich der Aggressivität der Tumoren und damit der Prognose für die Patienten. Carcinoma

in situ sind flache Tumoren, die noch nicht in das subepitheliale Bindegewebe vorgedrungen sind und auch nicht in das Blasenlumen hineinreichen. Endoskopisch fallen diese nur sehr diskret auf, histologisch weisen sie jedoch Kriterien einer malignen Veränderung auf. Dabei können mehr als die ein normales Urothel kennzeichnenden 7 Zellagen, eine gehäufte Mitosefrequenz und Kernatypien nachgewiesen werden.

Als T1-Tumoren bezeichnet man infiltrativ in das subepitheliale Bindegewebe hineinwachsende Tumoren. Je nach weiterem T-Stadium schreitet die Infiltration des Gewebes und der umgebenden Organe fort. Einen Überblick über die T-Stadien beim Harnblasenkarzinom verschafft die Tabelle 1 und die Abbildung 1.

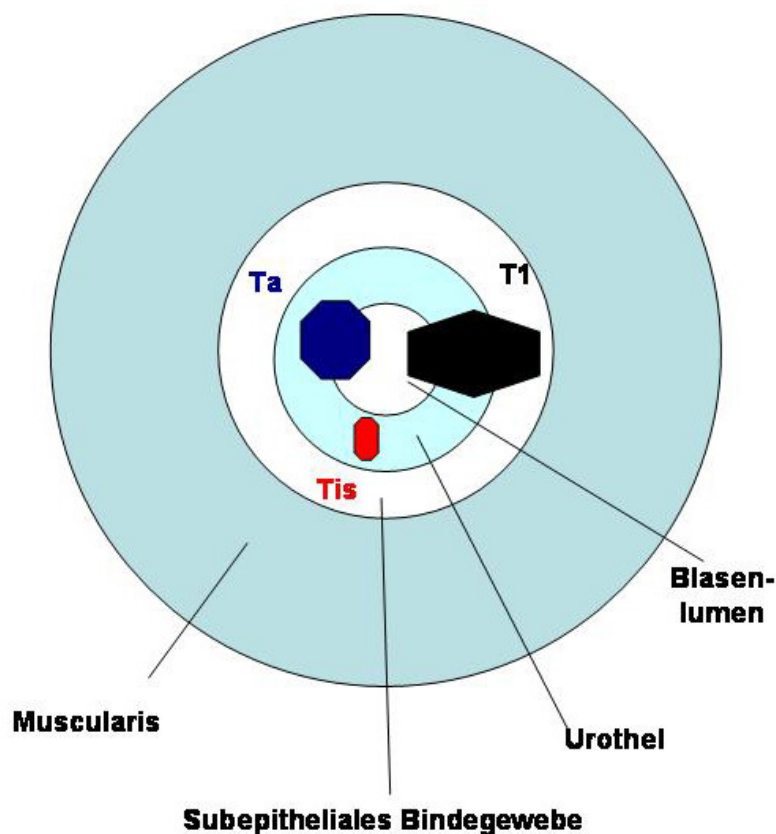


Abb. 1: Überblick der T-Stadien des nicht-muskelinvasiven Harnblasenkarzinoms

Modifiziert nach Alken und Mickisch, 1998

Harnblasentumoren werden mehrheitlich in Frühstadien (pTa und pT1) entdeckt, jeweils 20% entfallen auf pT2 und Stadien ab pT3.

1.4.2 „Grading“

Das „Grading“ der Tumoren in dieser Studie wurde nach den Richtlinien der World Health Organization und der International Society of Urological Pathology (WHO/ISUP) von 1998 vorgenommen. Zum einen sollte dieses 1998 als international einheitliches „Grading“-Verfahren eingeführte System die Kommunikation zwischen verschiedenen Arbeitsgruppen vereinfachen. Zum anderen sollten damit auch diagnostisch eindeutige Richtlinien geschaffen werden (Epstein, 2003).

Die Unterschiede zwischen der neuen „Grading“-Einteilung nach WHO/ISUP und ihrem Vorgänger, dem WHO „Grading“-System von 1973 sind in Tabelle 2 zusammengefaßt.

Die früher als G1 bezeichneten Tumoren sind jetzt zum Teil in die Gruppe der Tumoren mit niedrigem malignem Potential (PUNLMP) integriert, zum Teil gehören sie den niedriggradigen Harnblasenkarzinomen („low-grade“) an. Die alten G2-Tumoren werden nach der WHO/ISUP „Grading“-Einteilung jetzt zu den „low-grade“ oder „high-grade“ Karzinomen gezählt.

<u>WHO 1973</u>		<u>WHO/ISUP</u>
Papillom	→	Papillom
G 1	→ ↘	PUNLMP
G 2	→ ↘	„low-grade“
G 3	→	„high-grade“

Tab. 2: Überführung des „Gradings“ gemäß WHO-Einteilung 1973 in die WHO/ISUP-Einteilung 1998

Modifiziert nach Epstein, 2003; WHO=World Health Organization; ISUP=International Society of Urological Pathology, G= „Grade“, PUNLMP= „papillary urothelial neoplasm with low malignant potential“

PUNLMP ist durch ein einheitliches Bild der Zellen gekennzeichnet, Mitosen kommen selten vor und sind dann basal lokalisiert.

Ein „low-grade“ Harnblasenkarzinom ist durch ein überwiegend geordnetes Bild der Zellen geprägt, die Zellkerne zeigen leichte Variationen in Form und Kontur, Mitosen kommen in allen Zellagen gelegentlich vor.

Ein meist ungeordnetes Zellbild zeigen die „high-grade“ Harnblasenkarzinome, Mitosen finden sich häufig und in allen Zellagen, die Kernformen zeigen einen Pleomorphismus.

In Tabelle 3 sind die Kriterien für die „Grading“-Einteilung näher ausgeführt.

	<u>PUNLMP</u>	<u>„low-grade“</u>	<u>„high-grade“</u>
Organisation der Zellen	normale Polarität	überwiegend geordnet	überwiegend ungeordnet
Kerngröße	evtl. durchgängig vergrößert	vergrößert-Variation in der Größe	variabel vergrößert
Kernform	durchgängiges Bild, rundlich-oval, verlängert	leichte Variationen in Form und Kontur	Pleomorphismus
Nucleoli	abwesend bis unauffällig	meist unauffällig	multiple Nucleoli können gefunden werden
Mitose	selten, basal	gelegentlich / unregelmäßig, überall	häufig, überall

Tab. 3: „Grading“-Einteilung nach WHO/ISUP 1998

Modifiziert nach Epstein et al., 1998

PUNLMP=„papillary urothelial neoplasm of low malignant potential“

1.5 Tumormarker

Tumormarker sind von malignen Tumoren gebildete oder induzierte Substanzen. Sie lassen durch ihr Auftreten beziehungsweise ihre Konzentration Rückschlüsse auf das Vorliegen, den Verlauf oder die Prognose der Erkrankung zu. Es gibt humorale Tumormarker, die in Körperflüssigkeiten nachzuweisen sind und zelluläre Tumormarker, die intrazellulär oder membranständig zu finden sind. In der Onkologie werden Tumormarker in der Früherkennung, Diagnose, Therapieüberwachung und Erkennung eines Rezidivs eingesetzt. Diese werden als diagnostische Tumormarker bezeichnet. Als prognostische Tumormarker kommen sie im Rahmen der Prognosestellung zum Einsatz (Wolter et al., 1996).

Aufgrund der biologischen Variabilität des Harnblasenkarzinoms kann die histopathologische Klassifikation des Harnblasenkrebses nur eingeschränkt Auskunft über das biologische Verhalten des Tumors geben (Kausch und Bohle, 2003). „Grading“ und „Staging“ bilden die Grundlage der Therapieentscheidung, können aber die Aggressivität des spezifischen Tumors nur ungenügend vorhersagen und lassen damit viele Fragen hinsichtlich einer möglichen Metastasierung, einer Rezidiventstehung oder einer Progression offen (Kausch und Bohle, 2002). Klinische Entscheidungshilfen für die exakte Planung der Therapie bezüglich einer aggressiveren Vorgehensweise bei nicht-invasiven Tumoren und einer adjuvanten Zusatztherapie bei invasiven Tumoren sind daher notwendig (Kausch und Bohle, 2003).

Um relevante neue Tumormarker zu finden, müssen auch die klinischen Endpunkte wie Überleben, krankheitsfreies Überleben, Lebensqualität und Kosten berücksichtigt werden. Der potentielle Tumormarker sollte Aussagen über die Krebserkrankung machen, mit deren Hilfe die aussichtsreichste Therapie ausgewählt wird, die ein Rezidiv beziehungsweise ein Fortschreiten der Krankheit verhindert oder so weit wie möglich hinauszögert. Die Lebensqualität des Patienten sollte verbessert werden

und die Kosten überschaubar sein. Besonders wichtig ist es, die von etablierten Prognosefaktoren unabhängige Aussagekraft eines neuen Tumormarkers nachzuweisen.

Das Wissen um die molekularen Mechanismen der Tumorgenese wird immer umfangreicher und eröffnet neue Formen der Diagnose- und Prognosestellung von Krebserkrankungen. Molekulare Tumormarker gelangen immer häufiger ins Blickfeld. Auch beim Harnblasenkarzinom werden einige molekulare Marker hinsichtlich ihrer Verwendung als Prognosefaktoren untersucht. Beispiele hierfür sind die immunhistochemische Färbung von p53 und Ki67 (Kausch und Bohle, 2002). Eingang in die klinische Routine hat aber bisher noch kein molekularer Prognosemarker gefunden.

In letzter Zeit finden sich vermehrt Hinweise, die den Schlüsselfaktor der homologen Rekombination Rad51 mit der Tumorentstehung in Verbindung bringen. Daher soll in dieser Arbeit eine mögliche Tumormarkerqualität von Rad51 untersucht werden.

1.5.1 Rad51 - Homologe Rekombinationsreparatur (HRR)

Der Rekombinationsfaktor Rad51 wurde in Eukaryoten zunächst in strahlensensiblen (radiation sensitive) Zellen der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* entdeckt. Sein humanes Homolog hRad51 wird in allen Körperzellen exprimiert. Das Gen ist auf dem langen Arm des Chromosoms 15 lokalisiert und kodiert für das 36,9 kDa große Rad51-Protein (Takahashi et al., 1994).

Neben seiner Funktion in der homologen Rekombination während der Meiose erfüllt Rad51 vor allem eine Schlüsselrolle in der DNA-Reparatur durch homologe Rekombination im Verlauf des mitotischen Zellzyklus.

Nach Schädigung der DNA kommt es zur Umverteilung von aktiviertem Rad51 in nukleäre Foci (Haaf et al., 1995; Tan et al., 1999). Durch Kofaktoren wie Rad52

und „Replication Protein A“ vermittelt (Sung, 1997; Kanaar und Hoeijmakers, 1998; Mazin et al., 2003) bindet Rad51 an freie Einzel- oder Doppelstrang-DNA und bildet mit diesen Nukleoproteinfilamente. So ist es in der Lage, einen homologen Doppelstrang-DNA-Abschnitt zu erkennen, diesen mit der zuerst gebundenen DNA zu verknüpfen und einen DNA-Einzelstrang zwischen den beiden DNA-Molekülen auszutauschen (Gupta et al., 1997).

Die homologe Rekombination spielt eine wichtige Rolle in der Reparatur von blockierten Replikationsgabeln und von DNA-Doppelstrangbrüchen. Eine ungenügende Reparatur von Doppelstrangbrüchen führt zu chromosomaler Instabilität und Veränderungen wie Translokation, Deletion oder Duplikation, was transformierte und maligne Zellen auszeichnet (Gee und Harris, 1979; Hoeijmakers, 2001). Als Schlüsselfaktor der homologen Rekombination und somit als einer der Faktoren, die für eine genomische Stabilität sorgen, leistet Rad51 hier einen wichtigen Beitrag zur Unterdrückung malignen Wachstums.

1.5.2 Rad51 in der Zelle

Rad51 interagiert mit zahlreichen Tumorsuppressoren, Zellzyklus- und Apoptoseregulatoren, sowie Detektoren für Zellschäden wie p53, BRCA1 und BRCA2 (Sturzbecher et al., 1996; Buchhop et al., 1997; Scully et al., 1997b). Der Tumorsuppressor p53 ist als „Wächter des Genoms“ bekannt (Levine, 1997) und ist in nahezu der Hälfte aller menschlicher Tumoren mutiert. p53 bindet direkt an Rad51 (Sturzbecher et al., 1996; Buchhop et al., 1997) und nimmt so regulierend Einfluß. Auch die Produkte der Tumorsuppressorgene BRCA1 und BRCA2 haben jeweils Bindungsdomänen für Rad51 (Marmorstein et al., 1998; Zhong et al., 1999). Mutationen in diesen Genen werden mit hereditären Mammakarzinomen in Verbindung gebracht.

Diese zahlreichen Interaktionen von Rad51 unterstreichen die zentrale Rolle der homologen Rekombinationsreparatur und damit von Rad51 für die Zelle. Zum anderen zeigt es aber auch die Komplexität des Netzwerkes auf, das die Funktionalität von Rad51 durch optimale Aktivierung und Regulation der Proteinexpression sicherstellen soll (Abel et al., 1988; Henning und Sturzbecher, 2003; Venkitaraman, 2004).

Weitere Hinweise auf die Wichtigkeit von Rad51 ergaben die Untersuchungen an Rad51-defizienten Mäusen und in Hühnerzellkulturen. Zum einen zeigte sich, daß Rad51-defiziente Mäuse bereits in der frühen Embryonalphase sterben (Lim und Hasty, 1996; Tsuzuki et al., 1996). Zum anderen fanden sich vermehrt Chromosomenbrüche, Zellzyklusarrest und Zelltod in Hühnerzellkulturen in Abwesenheit von Rad51 (Sonoda et al., 1998).

1.5.3 Rad51-Expression in Tumoren

Viele Tumoren zeigen zwar am Rad51 Gen-Locus ein „Loss of Heterozygosity“ (LOH) (Wick et al., 1996), aber die Untersuchung von Tumoren mit LOH in dieser Region konnte weder eine Mutation, noch einen Verlust des Rad51-Genlocus beweisen (Schmutte et al., 1999). Nur das Rad51-Paralog XRCC3-thr241Met-Polymorphismus wurde mit dem Harnblasenkrebs in Verbindung gebracht (Matullo et al., 2001).

Kritisch für die Tumorentstehung scheint das Expressionsniveau von Rad51 zu sein. Eine Überexpression von Rad51 wurde in zahlreichen Tumorzelllinien und Untersuchungen von Primärtumoren gefunden (Raderschall et al., 2002b). In einer Studie über Pankreasadenokarzinome wurden in 66% der Fälle erhöhte Rad51-Level festgestellt (Maacke et al., 2000a). Eine andere Studie beschränkte sich auf die Untersuchung von sporadischen invasiv-duktalem Mammakarzinomen. Hier wurde eine Korrelation von Rad51 mit dem „Tumorigradung“ gefunden (Maacke et al., 2000b). In Untersuchungen an primären CML-Proben konnte ein erhöhter

Rad51-Spiegel gefunden werden. Der höchste Rad51-Gehalt fand sich bei Zellen in einer Blastenkrise, dem Stadium des Krebses, der durch erhöhte genomische Instabilität gekennzeichnet ist (Slupianek et al., 2001).

Andererseits finden sich auch niedrige Rad51-Konzentrationen. So wurde in fast einem Drittel aller in einer Studie von Yoshikawa et al. untersuchten Mammakarzinomzelllinien und primären sporadischen Brustkarzinomen ein sehr niedriger Rad51-Gehalt gefunden (Yoshikawa et al., 2000).

Es zeigte sich, daß eine veränderte Rad51-Expression zu Alterationen hinsichtlich einer Chemo- und Radioresistenz führt. Pankreastumorzellen zeigten ein zur Rad51-Überexpression korrelierendes Überleben nach Calicheamicin-Behandlung (Maacke et al., 2000a). Eine erhöhte Chemo- und Radioresistenz zeigte sich beim kleinzelligen Lungenkarzinom mit erhöhtem Rad51-Gehalt (Hansen et al., 2003).

Desweiteren führt eine Rad51-Überexpression zu einer p53-unabhängigen vermehrten Expression von p21^{Waf-1} (Henning und Sturzbecher, 2003; Kremer, 2003). Auch Raderschall et al. fanden eine p53-unabhängige Korrelation zwischen der Überexpression von Rad51 und p21^{Waf-1} (Raderschall et al., 2002a).

p21^{Waf-1} wurde als erster „cyclin-dependent kinase“ (CDK) Inhibitor identifiziert (el-Deiry et al., 1993; Harper et al., 1993; Noda et al., 1994). Es konnte gezeigt werden, daß p21^{Waf-1} sowohl eine entscheidende Rolle im G1-Arrest nach DNA-Schaden spielt (Brugarolas et al., 1995; Brugarolas et al., 1999), als auch den Wiedereintritt von G2-Zellen in die S-Phase blockiert (Waldman et al., 1996). Ebenso wurde eine p53-unabhängige Überexpression von p21^{Waf-1} mit einem Wachstumsarrest in Zusammenhang gebracht (Sherr und Roberts, 1999). Insgesamt finden sich also Hinweise auf eine Verschränkung von p21^{Waf-1} und Rad51.

1.6 Zielsetzung

Es gibt Hinweise darauf, daß der Rad51-Gehalt einer Krebszelle die Therapiemöglichkeit dieses Krebses beeinflusst. Zum einen ist eine Rad51-Überexpression mit einer Stimulierung der homologen Rekombination und einer Strahlenresistenz der Zellen assoziiert (Vispe et al., 1998). Zum anderen konnte in verschiedenen Tumoren eine Rad51-Überexpression nachgewiesen werden. Beispiele hierfür sind das Pankreaskarzinom (Maacke et al., 2000a) und das Mammakarzinom (Maacke et al., 2000b). Darüber hinaus konnte eine positive Korrelation der Rad51-Überexpression zum „Tumorgrading“ beim Mammakarzinom festgestellt werden (Maacke et al., 2000b).

Basierend auf dieser Grundlage scheint die Ausweitung der Untersuchung auf Patientendaten und somit der mögliche Nachweis einer Tumormarkerqualität von Rad51 sinnvoll.

Ziel der hier vorliegenden Studie ist es herauszufinden, ob

- 1.) im Harnblasenkarzinom eine Korrelation zwischen dem Tumorstadium und einer möglichen Rad51-Überexpression besteht,
- 2.) es einen Zusammenhang zwischen Rad51-Expression und dem Überleben des Patienten bzw. dem Entstehen eines Rezidivs gibt,
- 3.) eine mögliche Rad51-Überexpression mit Parametern wie „Grading“ oder $p21^{Waf-1}$ korreliert.

2 Patienten und Methoden

2.1 Patienten

In dieser Studie erfolgte die retrospektive Analyse von 101 Patienten mit oberflächlichem papillärem Urothel-Harnblasenkarzinom. Die Erstdiagnose wurde im Zeitraum von Januar 1988 bis September 1997 an der Urologischen Klinik der Universität zu Lübeck gestellt. Die Untersuchungen haben ein positives Votum der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät erhalten (Aktenzeichen: 98-039 vom 11.05.1998).

Die Auswahl der Patienten wurde auf pTa-Tumoren eingeschränkt, um einen Einfluß der verschiedenen Tumorstadien auf die Aussagekraft dieser Studie zu verhindern (Siehe Diskussion 4.2.1.2).

Bei allen Patienten wurde eine klinisch totale Resektion der Primärläsion vorgenommen. Behandlung und Follow-up erfolgten gemäß Standardprotokollen (Dt.Krebsgesellschaft, 2002).

Die Behandlung der Patienten mit Tumoren von niedriggradigem malignem Potential (PUNLMP) erfolgte bei der Erstdiagnose mittels transurethraler Resektion. Sofern kein Rezidiv nachgewiesen werden konnte, was für 12 Patienten zutraf, wurde es bei dieser Therapie belassen.

Kam es zu einem Rezidiv wurde zusätzlich Bacillus-Calmette-Guérin (BCG) instilliert. Außerdem wurden auch die Patienten mit „low“- und „high-grade“- Tumoren dieser Zusatzbehandlung unterzogen. Auf diese Weise wurden 89 Patienten therapiert.

Der mediane Durchschnitt des Follow-up betrug 59 Monate, bei einer Spannbreite des Beobachtungszeitraums von 16 bis 156 Monate.

Ausgeschlossen wurden Schnitte mit einem geringen Tumorgehalt von weniger als einem Beurteilungsfeld bei 10-facher Vergrößerung.

Viermal mehr Männer als Frauen waren bei dieser Studie beteiligt. Der mediane Altersschnitt lag, mit einer Altersspanne von 30 bis 87 Jahren, bei 67 Jahren.

Die Daten bezüglich Tumorgröße und Tumorlokalisation wurden den Krankenhausakten entnommen. In 65 Fällen war der Tumor maximal 1cm groß. Fast die Hälfte der Fälle zeigte sich multifokal (49 Fälle).

Sofort nach der transurethralen Resektion wurden die Proben in Neutral Formalin (4%) fixiert und sodann in Paraffin eingebettet. Hämatoxylin-Eosin (HE) Färbungen wurden angefertigt und von einem Pathologen (PD Dr. Stefan Krüger, Pathologisches Institut, Universität zu Lübeck) beurteilt.

Das „Grading“ erfolgte gemäß den Kriterien der World Health Organization/International Society of Urological Pathology (WHO/ISUP). Einen Überblick bietet Tabelle 3 (siehe auch Einleitung 1.4.2).

31 der in der hier vorliegenden Studie untersuchten Tumoren sind in die Gruppe der papillären urothelialen Neoplasien von niedrigem malignem Potential (LMP) einzuordnen, 48 Tumoren gehören zu den niedriggradigen und 22 Tumoren zu den hochgradigen Karzinomen.

2.2.3 Lösungen

- ◆ ABC-Peroxidase-Reagenz: 30 Minuten vor Gebrauch herstellen, bei Raumtemperatur inkubieren.
 - 5 ml PBS
 - 2 Tropfen Reagenz A (Vectastain Elite ABC-Kit) zugeben, gut durchmischen
 - 2 Tropfen Reagenz B (Vectastain Elite ABC-Kit) zugeben, gut durchmischen

- ◆ Citratpuffer, 10mM, pH 6,0: 2,1g Natriumcitrat in 1000 ml Aqua bidest. lösen und mit Natronlauge auf pH 6,0 einstellen.

- ◆ DAB (3,3`Diaminobenzidin)-Färbelösung: Unmittelbar vor Gebrauch herstellen und besonders auf laborübliche Schutzmaßnahmen achten, da Verdacht auf Karzinogenität besteht.
 - 5 ml Aqua bidest.
 - 2 Tropfen Buffer Stock Solution (DAB Substrate Kit), gut durchmischen
 - 4 Tropfen DAB Stock Solution (DAB Substrate Kit), gut durchmischen
 - 2 Tropfen Hydrogen Peroxide Solution (DAB Substrate Kit), gut durchmischen

- ◆ Ethanol-Salzsäure-Gemisch: Zu 97 ml Ethanol gibt man 3 ml einer 33%igen rauchenden Salzsäurelösung.

- ◆ Phosphate Buffered Saline (PBS): in 800 ml Aqua bidest. löst man
 - 8 g Natriumchlorid
 - 0,2 g Kaliumchlorid
 - 1,44 g di-Natriumhydrogenphosphat
 - 0,24 g Kaliumdihydrogenphosphat
 - mit Salzsäure auf pH 7,4 einstellen
 - mit Aqua bidest. auf 1000 ml auffüllen

Antigens durch Aldehydvernetzungen, was eine Bindung des Antikörpers erschweren oder sogar verhindern kann.

Daher wurden die Präparate zur Antigendemaskierung in einen Schnellkochtopf mit erwärmtem Citratpuffer gegeben und bei maximalem Druck 3 Minuten belassen. Zur langsamen Abkühlung der Schnitte wurde Leitungswasser für 10 Minuten zugeführt. Anschließend wurden sie wieder in PBS gewaschen.

2.3.3 Permeabilisieren und Blockieren

Für fünf Minuten wurden die Präparate in eine Triton-X-100-Lösung gegeben, um die Zellmembranen zu permeabilisieren und somit durchgängig für die Antikörperlösungen zu machen.

Anschließend erfolgte eine Inkubation mit Wasserstoffperoxid (3,5 %) für fünf Minuten, um endogene Peroxidasen zu blockieren und damit eine unspezifische Hintergrundfärbung zu reduzieren.

Desweiteren wurde endogenes Biotin mit Hilfe des „Avidin/Biotin Blocking Kits“ abgesättigt. Für 15 Minuten wurden die Schnitte mit 1-2 Tropfen der Avidin-D-Lösung benetzt, um an endogenes Biotin zu binden. Anschließend wurden 1-2 Tropfen der Biotin-Lösung für weitere 15 Minuten hinzugegeben und so die überzähligen Bindungsstellen des Avidins besetzt. Auf diese Weise wurde wieder eine unspezifische Anfärbung verhindert.

Im nächsten Schritt wurden die Präparate mit einem verdünnten Normalserum vom Pferd für 30 Minuten in der feuchten Kammer inkubiert, um unspezifische Bindungen des Sekundärantikörpers zu unterbinden.

Zwischen den einzelnen Schritten wurden die Präparate jeweils für fünf Minuten in PBS gewaschen.

2.3.4 Antikörper

Der in PBS verdünnte Primärantikörper wurde für 45 Minuten auf die Präparate gegeben. Durch das anschließende Waschen in PBS konnten nicht gebundene Antikörper entfernt werden.

Im nächsten Schritt wurde der sekundäre, biotinylierte Anti-Maus-IgG-Antikörper aus dem „Vectastain Elite-ABC-Kit“ für 45 Minuten auf die Schnitte gegeben und anschließend in PBS gewaschen.

Schließlich wurden die Schnitte für 30 Minuten mit dem „ABC-Reagenz“ inkubiert und danach wieder in PBS gewaschen. Einen Überblick zeigt die Abbildung 2.

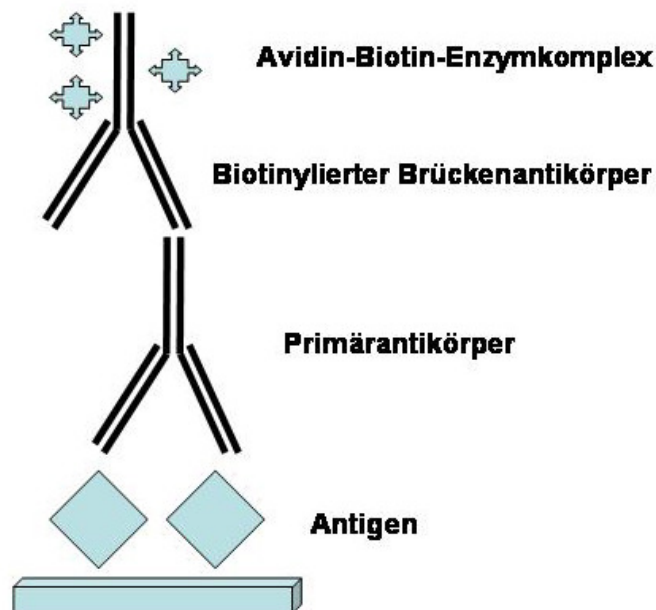


Abb. 2: Antikörperbeschickung der Präparate

Primärantikörper bindet an Antigen, biotinylierter Brückenantikörper bindet an Primärantikörper und Avidin - Biotin - Enzym – Komplex heftet sich an Sekundärantikörper; modifiziert nach Noll und Schaub-Kuhnen, 2000c

Je nach Primärantikörper wurden die Präparate zwei bis drei Minuten mit dem „DAB-Färbesubstrat“ überschichtet und nach fünf Minuten unter fließendem Wasser gewaschen.

2.3.5 Kerngegenfärbung

Nach einer dreiminütigen Färbung in Mayer's Hämalaun wurden die Schnitte für 10 Minuten unter fließendem Wasser gewaschen. Um überschüssiges Hämalaun zu entfernen wurden sie für ca. eine Sekunde in eine Salzsäure-Ethanol-Lösung eingetaucht und wieder 10 Minuten unter fließendem Wasser gewaschen.

Schließlich wurden die Schnitte nach dem Trocknen mit Faramount Mounting Medium und einem Deckgläschen versehen.

2.4 Kontrollen

Zehn Harnblasenschnitte von gesunden Patienten wurden gemäß des Färbeprotokolls bearbeitet und anschließend ausgewertet. Bei allen untersuchten Proben fand sich eine Rad51-Konzentration von unter 5%.

Der Primärantikörper wurde im Rahmen der Negativkontrolle durch einen unspezifischen Maus-IgG-Antikörper ersetzt. Es wurde hierbei keine unspezifische Färbung gefunden.

Bereits untersuchte Tumoren wurden zum Ausschluß qualitativer Unterschiede zwischen einzelnen Färbeserien erneut immunhistochemisch bearbeitet und ausgewertet. Es fanden sich bei allen Proben reproduzierbare Ergebnisse.

2.5 Auswertung

2.5.1 Bilddokumentation

Die gefärbten Gewebeschnitte wurden an einem Olympus-BX-40-Bildanalysemikroskop des Instituts für Dermatologie und Venerologie der Universität zu Lübeck (Direktor Prof. Dr. H. H. Wolff) mittels des Bildanalyseprogramms AnalySIS Pro 2.10.200 (SIS Software GmbH, Münster) erfaßt.

Durchschnittlich wurden vier nicht überlappende Bereiche aus dem Tumorgewebe ausgewählt und bei einer 20-fachen Objektivvergrößerung in einer Bilddatei festgehalten, die im JPEG-Verfahren abgespeichert wurde.

2.5.2 Bildanalyse

Mit Hilfe des Bildanalyseprogramms PiClick Image Analysis, das von Dr. Sven Opitz entwickelt wurde und freundlicherweise für diese Arbeit verwendet werden durfte, wurde der „Positive stained Cell Index“ (PCI) ermittelt (Opitz, 2001). Der PCI ist definiert als der prozentuale Anteil gefärbter Zellkerne an der Gesamtzahl der Tumorzellkerne in einem Bildausschnitt.

Zwei Untersucher werteten unabhängig voneinander mindestens 600 Tumorzellkerne pro Schnitt aus (PD Dr. Stefan Krüger, Belinda Oidtmann).

Die als positiv zu wertenden Zellkerne wurden vor der Untersuchung anhand von Referenzbildern festgelegt. Nur eindeutige Zellkernanfärbungen wurden als positiv berücksichtigt. Leichte Zellkernfärbungen und reine Plasmafärbungen gingen als negativ in die statistische Untersuchung ein. Abbildung 3 zeigt ein Referenzbild, das einen Eindruck der als positiv gewerteten Zellkerne wiedergibt.

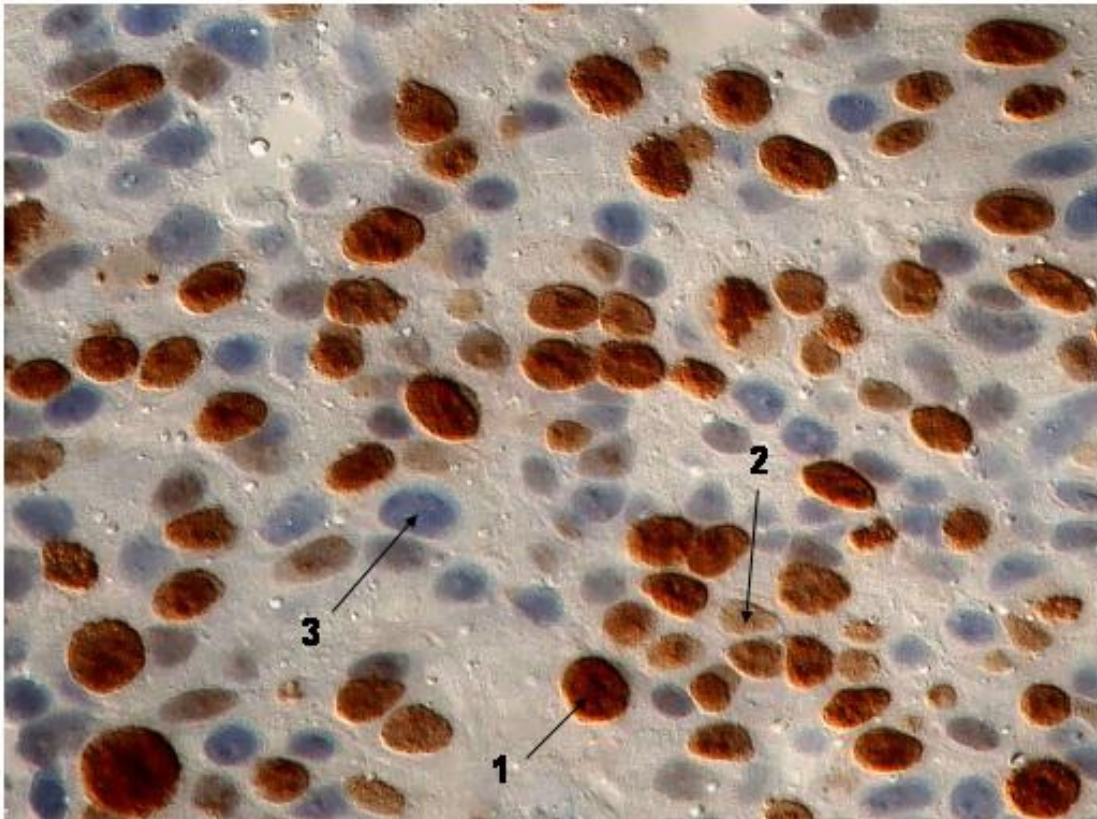


Abb. 3: Referenzbild zur Auswertung positiver Zellkerne

- 1) eindeutige starke Anfärbung des Zellkerns=positiv;
- 2) nur leichte Anfärbung des Zellkerns=negativ;
- 3) keine Anfärbung=negativ

2.5.3 Statistische Analyse

Alle deskriptiven und inferenzstatistischen Analysen wurden mit dem Statistikprogramm SPSS durchgeführt. Folgende Analysemethoden kamen zum Einsatz:

Zur Berechnung der Assoziationen zwischen Rad51, p21^{Waf-1} und Ki67 wurde jeweils der Rangkorrelationskoeffizient nach Spearman, sowie der entsprechende Signifikanztest benutzt. Die Assoziationen zwischen Rad51 und anderen kategorial-kodierten Parametern wurden durch die Berechnung von Kontingenztabellen bestimmt und mittels entsprechender Chi²-Tests nach Pearson auf Signifikanz geprüft. Dafür wurden die Werte für Rad51 in drei verschiedene Gruppen eingeteilt, in eine sehr geringgradige bis negative Anfärbbarkeit, wobei Rad51 positive Zellkerne weniger als 5% der ausgezählten Zellkerne ausmachten, eine moderat positive Expression (Rad51=5-15%) und einen starken Nachweis bei Rad51>15%. Diese cut-off-Bereiche zeigten sich bedeutend in vorangegangenen Tumoruntersuchungen (Maacke et al., 2000a).

Um den Einfluß der so gebildeten kategorialen Rad51-Variable auf die progressions- und rezidivfreien Überlebensdaten zu überprüfen, wurden jeweils Kaplan-Meier-Kurven berechnet und dargestellt. Die entsprechende inferenzstatistische Prüfung wurde mittels des Log-Rank-Tests durchgeführt. Patienten, bei denen kein Rezidiv oder keine Progression des Tumors beobachtet wurde, wurden in diesen Analysen nicht berücksichtigt.

Darüber hinaus wurde der Einfluß der verschiedenen klinisch-pathologischen Parameter auf die progressions- und rezidivfreien Daten untersucht. Dafür wurden zum einen univariate Cox-Regressionen durchgeführt. Diese statistische Prozedur erlaubt, den Einfluß der jeweiligen potentiellen Prognosevariablen unabhängig von der Wirkung anderer Variablen auf die Überlebenszeiten zu überprüfen.

Da die durch diese univariaten Analysen gefundenen Prognosefaktoren aber potentiell miteinander zusammenhängen können, wurden multivariate Cox-

Regressionen durchgeführt, um voneinander unabhängige Prognosefaktoren identifizieren zu können. Bei der multivariaten Cox-Regression wurde die Prüfung „schrittweise“ („Vorwärts“- und „Rückwärtsprüfung“) durchgeführt. Das Kriterium zur Einführung bzw. zum Ausschluß einer Variablen wurde mit einem p-Wert von 0.1 angesetzt. Für die im Modell verbliebenen Variablen wurden die Effekte jeweils als relative Risiken (RR) und das entsprechende 95%-Konfidenzintervall angegeben.

Die statistische Signifikanzgrenze wurde in allen Analysen auf Alpha=5% festgelegt.

3 Ergebnisse

Die biologische Aktivität des Harnblasenkarzinoms ist sehr variabel. Die Standardprognosefaktoren „Grading“ und „Staging“ reichen nicht aus, um eine exakte Vorhersage der Rezidiv- und Progressionswahrscheinlichkeit machen zu können. Aus diesem Grunde beschäftigen sich viele medizinisch-wissenschaftliche Arbeitsgruppen mit der Identifizierung neuer molekularer Tumormarker und versuchen auf diese Weise, die Entwicklung des jeweiligen Harnblasenkarzinoms vorhersagbarer zu machen.

Rad51 ist das für die homologe Rekombination verantwortliche Protein. Es wird in einigen Tumoren überexprimiert, Beispiele sind das Pankreaskarzinom (Maacke et al., 2000a) und das Mammakarzinom (Maacke et al., 2000b). Bei letzterem konnte auch eine positive Korrelation des Rad51-Gehalts mit dem „Tumorigradung“ festgestellt werden (Maacke et al., 2000b). Das „Tumorigradung“ ist beim Mammakarzinom genau wie beim Harnblasenkarzinom ein Prognosemarker. Ziel dieser Arbeit war es herauszufinden, ob Rad51 auch im Harnblasenkarzinom vermehrt exprimiert wird und vielleicht als Prognosemarker verwendet werden könnte.

Wie schon beim Mammakarzinom wurden auch in dieser Studie Paraffinschnitte immunhistochemisch untersucht. Eingang in die Studie fanden 101 Harnblasenkarzinompatienten mit „Staging“ pTa und „Grading“ von PUNLMP bis „high-grade“ Karzinom. Untersucht wurden neben Rad51 auch der cyclinabhängige Kinaseinhibitor $p21^{Waf-1}$ und der Proliferationsmarker Ki67. $p21^{Waf-1}$ kann Zellen sowohl in der G1-, als auch G2-Phase anhalten. Eine Rad51-Überexpression führt zu einer p53-unabhängigen vermehrten Expression von $p21^{Waf-1}$ (Kremer, 2003). Ebenfalls eine p53-unabhängige Korrelation zwischen der Überexpression von Rad51 und $p21^{Waf-1}$ (Raderschall et al., 2002a) fanden Raderschall et al. Eine Untersuchung des $p21^{Waf-1}$ -Gehalts der Zellen parallel zu Rad51 erschien somit sinnvoll. Als Kontrast dazu wurde auch der Proliferationsmarker Ki67 mituntersucht. Dieses Protein wird nur in proliferierenden Zellen exprimiert. Nachdem

die 101 Paraffinschnitte immunhistochemisch gefärbt waren, wurden die positiven Zellen ausgezählt. Mindestens 600 Zellen pro Ausschnitt und drei Ausschnitte pro Tumor wurden analysiert und die eindeutig positiv gefärbten Zellen in einer Prozentzahl der ausgezählten Zellen angegeben. Anschließend wurden diese Ergebnisse auf statistische Signifikanz hinsichtlich der Überlebens- bzw. Rezidivspanne, sowie einer möglichen Korrelation untereinander bzw. mit den tumor- und patientenspezifischen Variablen untersucht.

3.1 Deskriptive Ergebnisse

3.1.1 Soziodemographische und biologische Variablen

Von den in der Stichprobe untersuchten 101 Patienten waren 81 männlichen und 20 weiblichen Geschlechts, das Verhältnis zwischen den Geschlechtern lag also bei 4:1. Das Durchschnittsalter lag bei 67 Jahren, und die Altersspannweite reichte von 30 bis 87 Jahren.

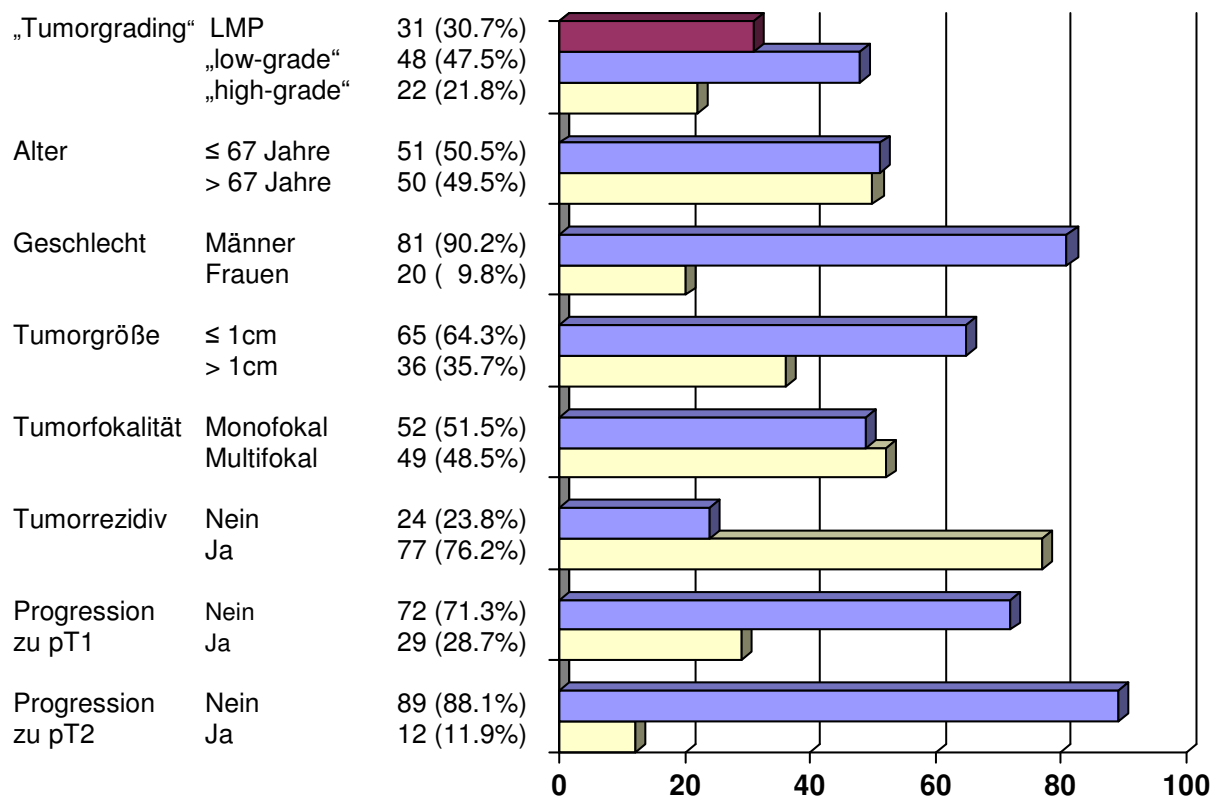
Bezüglich des „Tumorgrading“ wurden die Patienten nach WHO/ISUP 1998 eingeteilt. Bei 31 Patienten wurde PUNLMP diagnostiziert, bei 48 ein niedriggradiges Karzinom („low-grade“) und bei 22 ein hochgradiges Karzinom („high-grade“).

65 Patienten hatten einen Tumor, der maximal 1 cm groß war, bei 36 Patienten war der Tumor größer als 1 cm.

Hinsichtlich der Tumorfokalität hatten 52 Patienten einen monofokal und 49 Patienten einen multifokal auftretenden Tumor.

Im Untersuchungszeitraum wurde bei 77 (76,2%) Patienten ein Rezidiv beobachtet, bei 29 (28,7%) eine Progression des Tumors zu Stadium pT1 und bei 12 (11,9%) eine Tumorprogression zu Stadium pT2.

Tabelle 4 gibt einen Überblick über die Patientenverteilung hinsichtlich tumorrelevanter und soziodemographischer Variablen.



Tab. 4: Patientenverteilung bei tumorrelevanten und soziodemographischen Variablen in der Studie

Anzahl der Patienten: 101

3.1.2 Rad51, Ki67, p21^{Waf-1}

Die Proteine Rad51, Ki67 und p21^{Waf-1} wurden immunhistochemisch gefärbt (siehe Patienten und Methoden 2.3) und anschließend die positiv gefärbten Zellen mit Hilfe des Programms PiClick ausgezählt. Dieses von Dr. Sven Opitz geschriebene Bildanalyseprogramm durfte freundlicherweise für diese Arbeit verwendet werden (Opitz, 2001).

Die immunhistochemische Färbung mit dem monoklonalen anti-Rad51 Antikörper 1G8 war bei allen 101 Fällen erfolgreich. Der Median der Rad51 positiven Tumorzellen lag bei 9,5%, der geringste Wert bei 1,1%, der größte zeigte eine deutliche Rad51-Überexpression von 37,2%.

Ebenso war der Ki67-Index bei allen 101 Personen nachzuweisen. Auch hier zeigte sich der Median mit einer Ki67-Expression von 12,9%, der geringste Wert lag bei 2,7% und der größte bei 51,0% positiv auf Ki67 anfärbbarer Zellen.

Dagegen war ein immunhistochemischer Nachweis von p21^{Waf-1} nur bei 72 Personen möglich. Hier lag der Median bei 5,2%, der niedrigste Wert bei 0,3% und der höchste zeigte wiederum eine deutliche p21^{Waf-1}-Überexpression von 36,1%. Tabelle 5 zeigt einen Überblick über den immunhistochemischen Nachweis von Rad51, p21^{Waf-1} und Ki67. Abbildung 4 kann man einen beispielhaften Überblick über die Färbeargebnisse der nachgewiesenen Proteine in unterschiedlichen „Gradingstufen“ entnehmen.

	Anzahl der Patienten (n)	Median %	Minimum %	Maximum %
Rad51	101	9,5	1,1	37,2
Ki67	101	12,9	2,7	51,0
p21 ^{Waf-1}	72	5,2	0,3	36,1

Tab. 5: Übersicht immunhistochemischer Nachweis von Rad51, Ki67 und p21^{Waf-1}

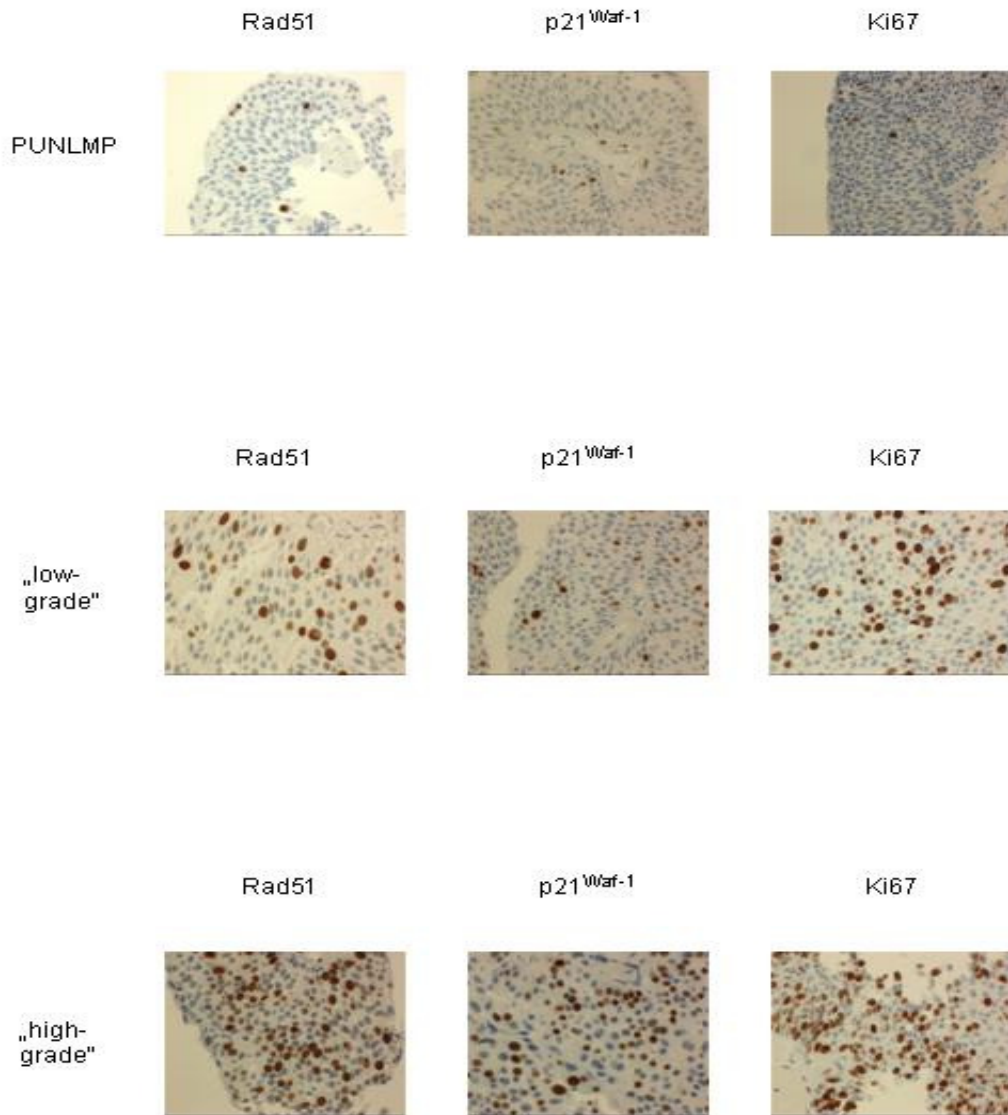


Abb. 4: Überblick der Färberegebnisse von Rad51, p21^{Waf-1} und Ki67 in unterschiedlichen „Gradingstufen“

3.2 Inferenzstatistische Ergebnisse

3.2.1 Zusammenhang zwischen klinischen Parametern und Rad51-Expression

Die Rad51-Überexpression wurde in drei Gruppen aufgeteilt, in eine niedrige (bis zu 5%), moderate (5% bis 15%) und starke (über 15%) Überexpression. In der Tabelle 6 sind die Verteilungen der jeweiligen klinisch-pathologischen Variablen dieser drei Gruppen sowie die Ergebnisse der inferenzstatistischen Tests aufgeführt.

Das „Tumorgrading“ mit einem p-Wert von 0,002 korreliert signifikant mit der Rad51-Überexpression. Die meisten LMP, die in dieser Studie am wenigsten malignen Tumoren, finden sich in der Gruppe des niedrigen Rad51-Gehalts, während die meisten „high-grade“, also die hochmalignen Tumoren sich bei der Gruppe der hohen Rad51-Überexpression finden. Auch der Ki67-Index mit einem p-Wert von 0,0001 korreliert signifikant mit der Rad51-Überexpression.

Ebenso zeigen die Progressionen zu einem pT1 (p-Wert von 0,0001) und pT2-Tumor (p-Wert von 0,001) Signifikanz hinsichtlich der Rad51-Überexpression.

Parameter	Anzahl	Rad51			p-Wert
		<5%	5-15%	>15%	
Alter					
≤ 67 Jahre	51 (50.5%)	16	24	11	0.711
> 67 Jahre	50 (49.5%)	13	23	14	
Geschlecht					
Männlich	81 (90.2%)	21	38	22	0.354
Weiblich	20 (9.8%)	8	9	3	
„Tumorgrading“					
LMP	31 (30.7%)	16	13	2	0.002
„low-grade“	48 (47.5%)	10	25	13	
„high-grade“	22 (21.8%)	3	9	10	
Tumorgroße					
≤ 1cm	65 (64.3%)	20	28	17	0.643
> 1cm	36 (35.7%)	9	19	8	
Tumorfokalität					
Monofokal	52 (51.5%)	20	20	12	0.075
Multifokal	49 (48.5%)	9	27	13	
p21 ^{Waf-1} *					
≤ 5% (Median)	36 (50.0%)	12	16	8	0.710
> 5%	36 (50.0%)	9	19	8	
Ki67					
≤ 13% (Median)	50 (49.5%)	24	22	4	0.0001
> 13%	51 (50.5%)	5	25	21	
Tumorrezidiv					
Nein	24 (23.8%)	10	11	3	0.153
Ja	77 (76.2%)	19	36	22	
Progression zu pT1					
Nein	72 (71.3%)	27	36	9	0.0001
Ja	29 (28.7%)	2	11	16	
Progression zu pT2					
Nein	89 (88.1%)	29	43	17	0.001
Ja	12 (11.9%)	0	4	8	

Tab. 6: Klinisch-pathologische Parameter in Korrelation zur Rad51-Expression

Signifikante Korrelationen wurden fett gedruckt

* p21^{Waf-1}-Färbung war nur in 72 Fällen möglich

3.2.2 Überlebenszeitanalysen: uni- und multivariate Cox-Regressionsanalyse

Um den Einfluß von Rad51 sowie der klinischen und demographischen Parameter auf die Entwicklung des Harnblasenkarzinoms zu überprüfen, wurden zunächst univariate Cox-Regressionen durchgeführt. Hier wurden die genannten Variablen mit der rezidivfreien Überlebenszeit, der pT1-progressionsfreien Überlebenszeit und der pT2-progressionsfreien Überlebenszeit in statistischen Zusammenhang gesetzt. Rad51 wurde in diesen Analysen als kontinuierlich und als kategorial-kodierte Variable (normale, moderate und starke Expression, vgl. Kap. 3.2.1) einbezogen.

Tabelle 9 im Anhang können die Ergebnisse der univariaten Cox-Regressionsanalyse entnommen werden.

Es zeigt sich, daß bezüglich des rezidivfreien Überlebens das „Grading“ ($p=0,006$) und die Rad51-Überexpression (sowohl als kontinuierlich gemessene [$p=0,002$], als auch als kategorial-kodierte Variable [$p=0,005$]) als signifikante Prognosefaktoren ausgewiesen werden konnten. Ein höheres „Grading“ sowie eine stärkere Rad51-Überexpression gehen mit einem höheren Rezidivrisiko einher. Die gleichen signifikanten Effekte können in diesen Variablen für das pT1- („Grading“: $p=0,0001$; Rad51 [kontin.]: $p=0,0001$; Rad51 [kateg.]: $p=0,0001$) und für das pT2-progressionsfreie Überleben („Grading“: $p=0,005$; Rad51 [kontin.]: $p=0,0001$; Rad51 [kateg.]: $p=0,001$) ausgewiesen werden.

Der Variable Ki67 konnte ebenfalls für das pT1- ($p=0,001$) und für das pT2-progressionsfreie Überleben ($p=0,034$) prognostische Signifikanz zugesprochen werden. Auch hier führt eine ausgeprägtere Ki67-Überexpression zu einem höheren Tumorprogressionsrisiko.

Darüber hinaus konnte lediglich für die Variable Alter ein bedeutender Effekt bezüglich des pT1-progressionsfreien Überlebens ($p=0,040$) dahingehend ermittelt

werden, daß ein höheres Alter ein erhöhtes Progressionsrisiko bedeutet. Alle anderen potentiellen Prognosevariablen zeigten keine statistische Signifikanz in dieser Untersuchung.

Die dargestellten Ergebnisse der univariaten Cox-Analysen geben jedoch lediglich an, ob den entsprechenden Variablen prognostische Relevanz zukommt, wenn alle anderen Variablen nicht beachtet werden. Mit weiteren multivariaten Cox-Regressionen sollte daher überprüft werden, welchen Parametern prognostische Signifikanz zugesprochen werden kann, wenn alle Parameter zusammen betrachtet werden. In Tabelle 9 im Anhang sind ebenfalls die Ergebnisse der multivariaten Cox-Regressionsanalysen aufgeführt.

Lediglich die Variable Rad51 konnte in allen drei Analysen als signifikanter unabhängiger Prognosefaktor identifiziert werden. Als kontinuierlicher Parameter zeigte Rad51 einen p-Wert von 0,008 beim rezidivfreien Überleben, 0,001 beim pT1-progressionsfreien Überleben und 0,002 beim pT2-progressionsfreien Überleben. Dem „Grading“ konnte nur für das rezidivfreie Überleben mit einem p-Wert von 0,014 und für das pT1-progressionsfreie Überleben mit einem p-Wert von 0,0001 Signifikanz zugesprochen werden.

Die nachfolgend dargestellten Kaplan-Meier-Kurven (Abb. 5 - 7) verdeutlichen den signifikanten Zusammenhang zwischen Rad51 und rezidivfreiem Überleben, pT1- und pT2-progressionsfreiem Überleben.

Aus den Kaplan-Meier-Überlebenskurven können die Zeiten bis zum Eintritt eines Rezidivs bzw. bis zum Versterben des Patienten jeweils in Abhängigkeit der kategorial-kodierten Variable Rad51 entnommen werden.

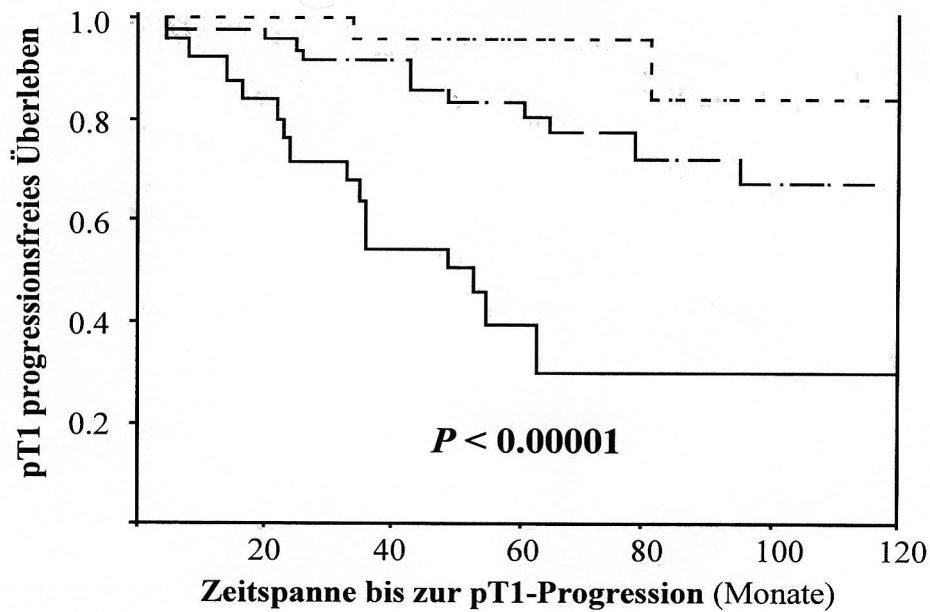


Abb. 5: Kaplan-Meier-Kurve: Zeitspanne bis zur pT1-Progression in Abhängigkeit von der Rad51-Expression

--- = Rad51 <5%; — = Rad51=5-15% - - - = Rad51 >15%

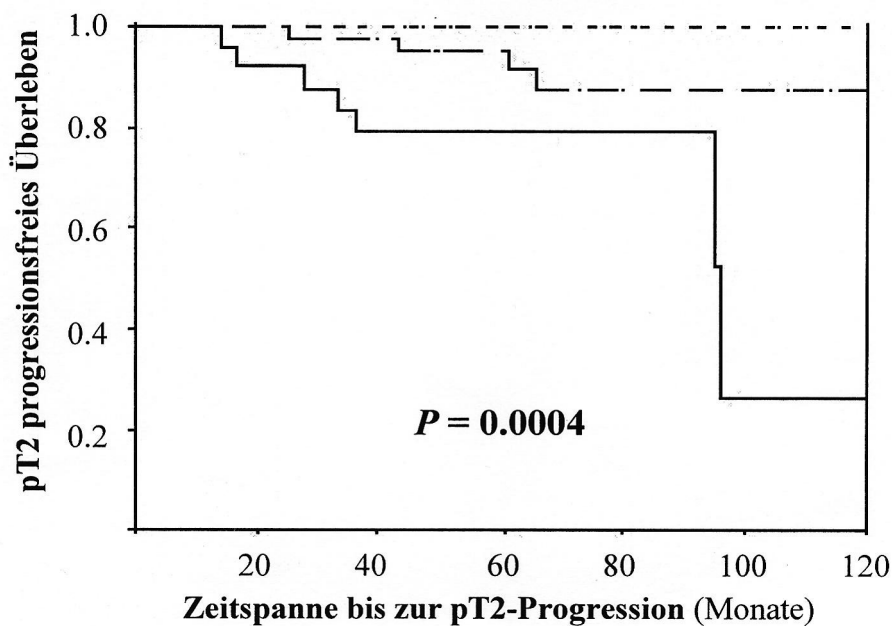


Abb. 6: Kaplan-Meier-Kurve: Zeitspanne bis zur pT2-Progression in Abhängigkeit von der Rad51-Expression;

--- = Rad51 <5%; — = Rad51=5-15% ; - · - = Rad51 >15%

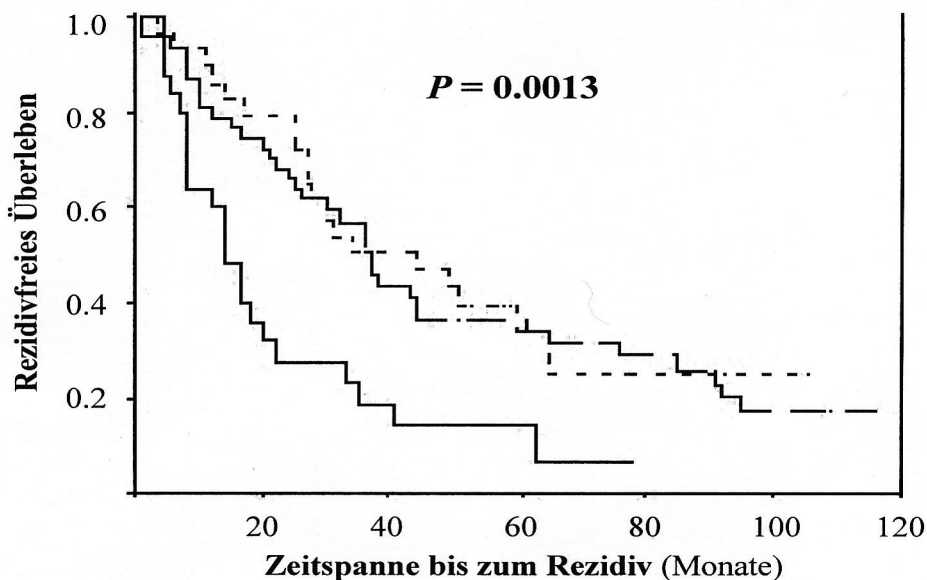


Abb. 7: Kaplan-Meier-Kurve: Zeitspanne bis zum Auftreten eines Rezidivs in Abhängigkeit von der Rad51-Expression;

--- = Rad51 <5%; — = Rad51=5-15%; - · - = Rad51 > 15%

Die Abbildungen enthalten Überlebenskurven, die nach der Methode von Kaplan-Meier berechnet wurden. Bei der Kaplan-Meier-Methode werden nach Eintritt eines vorher definierten Ereignisses (z. B. „Auftreten eines Rezidivs“ bei einem Patienten) für die restlichen Personen der Stichprobe die Wahrscheinlichkeiten, daß das Ereignis bei ihnen nicht eintritt („Überlebenswahrscheinlichkeiten“), neu berechnet. Diese Berechnungen können auch für unterschiedliche Personengruppen durchgeführt und die Ergebnisse in entsprechenden Schaubildern veranschaulicht werden. Die so entstandenen „Überlebenskurven“ der verschiedenen Gruppen können mit dem Log-Rank-Test auf statistisch signifikante Unterschiede in der Überlebenszeit getestet werden. Die Ergebnisse der durchgeführten Log-Rank-Tests können ebenfalls den Abbildungen 5 - 7 entnommen werden.

Sowohl für die Progression zu einem pT1, als auch pT2 Tumor gilt, daß Patienten mit einer Rad51-Expression unter 5% die längste progressionsfreie Überlebenszeit haben (Siehe Abb. 5 und 6). Im Durchschnitt die kürzeste rezidivfreie Überlebenszeit haben Patienten, deren Tumor >15% Rad51 exprimiert, wie man Abbildung 7 entnehmen kann. Die dazu durchgeführten Log-Rank-Tests bestätigen, daß die Zugehörigkeit zu einer der drei verschiedenen kategorial-kodierten Rad51-Gruppen sowohl auf das rezidivfreie Überleben ($p=0,0013$), als auch auf das pT1- ($p<0,00001$) und pT2-progressionsfreie Überleben ($p=0,0004$) einen statistisch signifikanten Einfluß ausübt.

4 Diskussion

4.1 Das Harnblasenkarzinom im Überblick

Harnblasenkarzinome weisen im Vergleich zu anderen Tumoren eine überaus große biologische Variabilität hinsichtlich Progressionsrate und Prognose auf. Eine hohe Rate an lokalen Rezidiven und das häufig multifokale Wachstum sind kennzeichnend (Souchon, 2003). Die Rezidivrate bei Patienten mit oberflächlichem Harnblasenkarzinom liegt bei 60-80% innerhalb von vier Jahren nach kompletter Resektion, ein Viertel dieser Tumoren ist, abhängig vom „Grading“ und „Staging“ des Primärtumors, zusätzlich progressiv (Stein et al., 1998b). Das maligne Potential des Harnblasenkarzinoms ist also sehr groß und die Heterogenität ein Kennzeichen für dieses Karzinom.

Entscheidend für die Prognose und damit für die Therapiewahl ist das „Tumorgrading“ und „-staging“. Eine konventionelle histopathologische Beurteilung hinsichtlich „Grading“ und „Staging“ eines Harnblasenkarzinoms reicht aber nicht aus, um eine genaue Vorhersage des biologischen Verhaltens des Tumors zu erhalten (Williams und Stein, 2004). Die Beurteilung des „Grading“ ist oft von der Erfahrung und persönlichen Einschätzung des untersuchenden Pathologen abhängig und variiert daher entsprechend (Schapers et al., 1994). Somit besteht die Notwendigkeit, verlässliche Tumormarker für das Harnblasenkarzinom zu identifizieren (Ozen und Hall, 2000). Neben den Standarduntersuchungen wie Harnzytologie und Blasenzystoskopie sollen Tumormarker die Entscheidung über Art und Abstand der Nachuntersuchungen erleichtern und verfeinern. Diese Tumormarker sollen also helfen, eine eindeutigere Prognose für Tumoren entwickeln zu können und werden dann als Prognosemarker bezeichnet. Klinisch einsetzbare molekulare Prognosemarker können dazu beitragen, individuelle Therapieentscheidungen zu treffen. Diese basieren auf der dank der Marker besser vorhersehbaren biologischen Evolution des Tumors.

Im Moment existiert kein aussagefähiger Prognosemarker beim Harnblasenkarzinom (Kausch und Bohle, 2002). Ein denkbarer Prognosemarker ist Rad51, das für die homologe Rekombination bei Doppelstrangbrüchen verantwortliche Protein.

In den letzten Jahren zeigte sich, daß dieser zentrale Faktor der homologen Rekombination einen wichtigen Beitrag in der Erhaltung der genomischen Integrität der Zelle leistet (Lambert und Lopez, 2000). Das 36,9 kDa große Protein hat sein Gen auf dem langen Arm des Chromosoms 15 (Takahashi et al., 1994).

Hinweise auf eine mögliche Prognosemarkerqualität dieses Proteins gaben unter anderem zwei Studien am Pankreas- und Mammakarzinom. In der Studie am Pankreaskarzinom zeigte sich eine Rad51-Überexpression in 66% der untersuchten Proben (Maacke et al., 2000a). Eine Korrelation zwischen dem „Grading“ und einer Überexpression von Rad51 konnte in der Studie am sporadischen Mammakarzinom nachgewiesen werden (Maacke et al., 2000b).

Die hier vorliegende Arbeit gibt Aufschluß darüber, inwieweit Rad51 beim Harnblasenkarzinom als Tumormarker genutzt werden kann.

4.2 Methodenanalyse

4.2.1 Umfang der Studie

Die histopathologische Klassifikation von Harnblasenkarzinomen erfolgte bisher mittels „Grading“ und „Staging“ der Tumoren und bildete somit die Grundlage für die Auswahl der Studienteilnehmer. Um die Ergebnisse einer Studie mit den Aussagen anderer Studien vergleichen zu können, muß man die Einschlusskriterien der jeweiligen Studie kennen. Einschlusskriterien einer Studie sind die Kriterien, die ein Tumor erfüllen muß, um in der Studie berücksichtigt zu werden. Wichtig ist auch die der jeweiligen Studie zugrunde gelegten „Grading“- und „Staging“-Einteilungen zu beachten. Für das Harnblasenkarzinom werden verschiedene „Grading“-Einteilungen

benutzt und auch die Einschlußkriterien hinsichtlich des „Staging“-Stadiums sind bei den verschiedenen Studien nicht einheitlich. Somit können vordergründig widersprüchliche Ergebnisse durch unterschiedliche Studien-Zusammensetzungen begründet sein. Ein aussagekräftiger Vergleich von Ergebnissen ist also nur unter Studien mit den gleichen Einschlußkriterien möglich.

4.2.1.1 „Grading“ in dieser Studie

In dieser Studie wurden nur „papillary urothelial neoplasm of low malignant potential“ (PUNLMP), „low-grade“ und „high-grade“ Harnblasenkarzinome berücksichtigt.

Entsprechend der auf Seite 17-19 beschriebenen „Grading“-Einteilung wurden in dieser Studie 31 Tumoren als PUNLMP, 48 Tumoren als niedriggradig und 22 Tumoren als höhergradig eingestuft.

Die Zusammensetzung des Kollektivs bezogen auf das „Grading“ erfolgte rein zufällig. Beim Vergleich mit anderen Studien, in denen die WHO/ISUP „Grading“-Einteilung verwendet wurde, kann man eine große Übereinstimmung dieser Studien hinsichtlich der Zusammensetzung des Kollektivs feststellen.

Desai et al. untersuchten 112 Patienten, wobei 8 zum „Grading“ PUNLMP gehörten, 42 zum „low-grade“ Harnblasenkarzinom und 62 zum „high-grade“ Harnblasenkarzinom (Desai et al., 2000). In einer weiteren Studie an 363 Patienten fanden sich überwiegend niedriggradige Harnblasentumoren, gefolgt von den hochgradigen Tumoren und den PUNLMP (Holmang et al., 2001). Alsheikh et al. beschränkten ihre Studie auf den Unterschied zwischen PUNLMP und dem niedriggradigen Harnblasenkarzinom, wobei letzteres in dieser Studie überwog (Alsheikh et al., 2001). Einen Überblick verschafft Tabelle 7.

	n	PUNLMP	„LOW- GRADE“	„HIGH- GRADE“
Desai et al., 2000	112	8	42	62
Alsheikh et al., 2001	49	20	29	-
Holmang et al., 2001	363	95	160	108
Vorliegende Studie	101	31	48	22

Tab. 7: Verteilung des histologischen „Gradings“ gemäß WHO/ISUP-Einteilung in verschiedenen Studien zum Harnblasenkarzinom

n: Studienumfang

PUNLMP: „papillary urothelial neoplasm of low malignant potential“

Somit kann man also von einer repräsentativen Studienzusammensetzung ausgehen.

4.2.1.2 „Staging“ und Einschlußkriterien von Studien

Bei Harnblasenkarzinomen wird das „Staging“ mittels der pTNM-Klassifikation vorgenommen (siehe auch Einleitung 1.4.1).

nicht-muskelinvasive Harnblasenkarzinome

pTa	-	nicht invasiv
pCis	-	Carcinoma in situ
pT1	-	Infiltration des subepithelialen Bindegewebes

invasive Harnblasenkarzinome

pT2	-	Infiltration der Muscularis propria
pT3	-	Infiltration über die Muscularis hinaus

Tab. 8: Überblick über die „Staging“-Einteilung der Harnblasenkarzinome

Wichtig im Hinblick auf die Studieneinteilung ist die Definition der Einschlusskriterien, das heißt die Festlegung der Kriterien, die ein Tumor erfüllen muß, um in der Studie berücksichtigt zu werden.

In der hier vorliegenden Studie wurden nur pTa Tumoren untersucht. Auch pT1 wird immer noch von vielen Arbeitsgruppen als „oberflächliches Karzinom“ bezeichnet (Siehe Tabelle 8 und Einleitung 1.4.1). Sobald allerdings die Lamina propria erreicht ist, haben diese Patienten ein erhöhtes Risiko eines invasiven Karzinoms (Abel et al., 1988; Epstein, 2003), d. h. pT1-Tumoren zeigen sich häufiger progressiv als pTa-

Tumoren (Heney et al., 1983). Ein Einschluß von pTa und pT1–Tumoren in einer Studie führt also zu einer inhomogenen Patientengruppe, obwohl beide Tumoren in einer Gruppe zusammengefaßt werden. Somit wird also die mögliche Aussagekraft eines Prognosemarkers verfälscht, da zwei in ihrem Progressionsverhalten unterschiedliche Tumoren als Einheit gesehen werden.

Einige Studien schließen auch Carcinoma in situ (Cis)-Patienten ein. Obwohl Cis eher flach sind, gehören sie zu den aggressiveren Tumoren in der Harnblase (Epstein, 2003). Schließt man Cis in Studien von nicht-invasiven Harnblasenkarzinomen ein, muß man wieder mit einer Inhomogenität der Patientengruppe rechnen, was bei der Studienanalyse zu berücksichtigen ist.

Desweiteren muß man die Unterschiede in der Definition der Progression des Tumors in den unterschiedlichen Studien beachten, um einen korrekten Vergleich von Studienergebnissen anstellen zu können. Während einige Studien nur eine Progression von pTa nach pT1 einschließen, ist für andere das Fortschreiten des Tumors nach pT2 Voraussetzung für den Eingang in die Studie. Manchmal wird auch eine Veränderung im „Grading“ als Progression gewertet (Epstein, 2003). Daher sind Vergleiche von Studien am Harnblasenkarzinom nicht einfach.

Immer noch werden unterschiedliche Einteilungen nebeneinander verwendet und die Einschlußkriterien variieren doch stark. Will man die unterschiedlichen Studienergebnisse vergleichen, muß man also zuerst die zugrunde gelegte „Grading“-Einteilung, sowie die Einschlußkriterien, die für die Studie gelten, beachten.

4.2.2 Objektivität, Reliabilität und Validität der Methodik

Die Spezifität des in der hier vorliegenden Studie verwendeten Primärantikörpers ist im Westernblot (Buchhop et al., 1996) dokumentiert worden. Auch in dieser Studie konnte die Spezifität durch ein Ersetzen des Erstantikörpers durch einen

unspezifischen Maus-IgG-Antikörper bestätigt werden.

Die Sensitivität wurde durch Anpassung der verschiedenen Protokollparameter wie die Konzentration und Einwirkdauer des Primärantikörpers erreicht, so daß Zellen mit einem normalen Gehalt an Rad51 gerade kein Färbesignal mehr lieferten.

Exakte Abarbeitung des Färbeprotokolls und konstante Versuchsbedingungen über den gesamten Zeitraum der Studie sicherten die erreichte Sensitivität und Spezifität, Kontrollfärbungen bestätigten die Reliabilität der Versuchsanordnung. Die Auswertung der Färbungen erfolgte durch zwei unabhängige Untersucher (PD Dr. Stefan Krüger, Belinda Oidtmann).

4.3 Studienergebnisse

Will man dem „Geheimnis (...) Krebs“ (Cabanne et al., 2000) näher kommen, muß man die molekularen Mechanismen der Krebsentstehung verstehen. Einen Überblick über die Kenntnisse bezüglich der molekularen Mechanismen der Tumorgenese verschafft die von Hanahan und Weinberg verfaßte Zusammenfassung der von Tumorzellen im Laufe ihrer Entwicklung erworbenen Eigenschaften.

Tumorzellen werden im Verlauf der Tumorentstehung unempfindlich gegenüber wachstumsinhibierenden Signalen und können sich unabhängig von Wachstumsfaktoren teilen. Mechanismen werden entwickelt, die die Apoptose, den programmierten Zelltod, unterbinden. Maligne Tumorzellen haben die Eigenschaft, sich unlimitiert zu teilen. Sie bilden neue Blutgefäße und decken so ihren Bedarf an Sauerstoff und Nährstoffen. Die Fähigkeit zu invasivem und destruktivem Wachstum und zur Metastasierung sind weitere Kennzeichen für maligne Tumorzellen (Hanahan und Weinberg, 2000).

Der für die Zelle wohl gefährlichste DNA-Schaden ist ein Doppelstrangbruch (DSB) der DNA (Khanna und Jackson, 2001). Chemotherapeutika, Sauerstoffradikale, mechanischer Streß von Chromosomen und ionisierende Strahlung können einen DSB verursachen. Einerseits kann ein einziger DSB ausreichend sein, um die betroffene Zelle durch Apoptose oder Geninaktivierung zu töten. Andererseits kann eine fehlerhafte DSB-Reparatur eine Translokation oder Deletion verursachen und so beispielsweise Tumorsuppressorgene inaktivieren, was wiederum die Entstehung von Neoplasien fördern kann (Baumann und West, 1998; Khanna und Jackson, 2001).

Die homologe Rekombination ist ein Mechanismus zur Reparatur eines DSB. In eukaryotischen Zellen ist das Rekombinationsprotein Rad51 essentiell an der homologen Rekombination beteiligt.

4.3.1 Die Bedeutung von Rad51

Die Reparatur von DNA-Schäden wie zum Beispiel einem DNA-DSB ist essentiell um die genomische Integrität einer Zelle zu erhalten. Wird ein DSB nur ungenügend repariert, führt dies zu chromosomaler Instabilität, was ein Zeichen für maligne Zellen ist (Gee und Harris, 1979; Hoeijmakers, 2001). Demzufolge können also eine Mißfunktion von DSB-Reparatur und homologer Rekombination zu Malignität führen (Abel et al., 1988; Vogelstein et al., 1990; Levine, 1997).

Das 37 kDa große Rad51-Protein ist in Säugerzellen maßgeblich an der homologen Rekombination beteiligt. Diese ist für einige Zellfunktionen wie Reparatur von DSB und blockierter Rekombinationsgabeln, die Verteilung der Chromosomen in der Meiose und die Durchmischung des Erbgutes durch Austausch homologer Chromosomenabschnitte verantwortlich (Abel et al., 1988; Knippers, 1997; Bishop und Schiestl, 2000).

Die höchsten Rad51-Spiegel sind in der S- und G2-Phase des Zellzyklus nachweisbar, d. h. der Rad51 Gehalt unterliegt Schwankungen in verschiedenen Phasen des Zellzyklus (Yamamoto et al., 1996). Immunhistochemisch positive Tumorzellen enthalten aber deutlich mehr Rad51 als von zellzyklusabhängigen Schwankungen zu erwarten ist (Maacke et al., 2000b). Zum Zeitpunkt der beiden Zellzyklus-„Checkpoints“ G1 und G2 ist die Rad51-Konzentration also am höchsten. Dies unterstreicht die DNA-Reparatur-Funktion von Rad51 (Yamamoto et al., 1996).

Die genauen Regulationsmechanismen des Rad51-Gehalts im Zellzyklus sind noch weitgehend unbekannt. Die Steuerung von Produktion, Aktivität und Abbau von Rad51 sind nur teilweise verstanden. Slupianek et al. zeigten, daß STAT5 (Signal transducer and activator of transcription 5) notwendig für eine FTK-abhängige (Fusionstyrosinkinase wie z. B. BCR/ABL) Hochregulation von Rad51 ist (Slupianek et al., 2002). Die Autoren begründeten erhöhte Rad51-Level mit einer STAT5-abhängigen Transaktivierung des Rad51-Gens und andererseits einer Reduzierung der Rad51-Spaltung durch Caspase-3 (Slupianek et al., 2001). Gemäß Slupianek et al. unterstützt BCR/ABL Interaktionen des Bloom-Proteins (BLM) mit Rad51, wobei eine gemeinsame Überexpression der beiden Proteine in normalen Zellen eine Medikamentenresistenz verstärkt (Slupianek et al., 2005).

Die Rad51-Expression scheint sehr genau kontrolliert zu sein. Es bestehen zahlreiche Interaktionen des Rad51-Proteins mit Zellzyklusregulatoren und Tumorsuppressoren wie p53 (Sturzbecher et al., 1996; Buchhop et al., 1997) oder BRCA1 (Scully et al., 1997b) und BRCA2 (Sharan et al., 1997). Dies gibt wiederum Hinweise auf die Wichtigkeit der exakten Regulierung von Rad51 und damit auch der zentralen Bedeutung dieses Proteins.

p53 ist bei der Untersuchung des Harnblasenkarzinoms ein besonders interessanter Parameter. Dieser Tumorsuppressor wird unter anderem für die Tumorprogression und die Entstehung des Carcinoma in situ (Cis) im Harnblasenkarzinom mitverantwortlich gemacht (Knowles, 1995).

Der Tumorsuppressor p53 hat eine zentrale Funktion in der Kontrolle des Zellzyklus

(Lane, 1992). Dieses Protein ist in der Lage, die Transkription einer Vielzahl von Genen zu aktivieren oder zu inhibieren (el-Deiry et al., 1992; Jackson et al., 1993). Ziel ist ein Zellzyklusarrest, um so bei vorliegenden DNA-Schäden die DNA-Reparatur zu ermöglichen oder bei irreparablen Schäden die Apoptose einzuleiten (Kuerbitz et al., 1992).

p53 bindet direkt an Rad51 (Sturzbecher et al., 1996; Buchhop et al., 1997). De Toledo et al. fanden heraus, daß der Rad51-Gehalt der Zellen nach Bestrahlung p53-abhängig vermindert werden kann (de Toledo et al., 1998). Andererseits wurden erhöhte Rad51-Spiegel in Zellen mit mutiertem p53 beobachtet (Magnusson et al., 2000). p53-Mutationen findet man sehr häufig in den verschiedensten Tumoren (Hollstein et al., 1991). Auch die in dieser Studie gefundene Rad51-Überexpression könnte also durch mutiertes p53 erklärbar sein.

In der hier vorliegenden Studie wurde der p53-Gehalt in den Tumoren und das Vorliegen einer p53 Mutation nicht untersucht.

Hinweise auf eine Zusammenarbeit von Rad51 und p53 zeigten sich in weiteren Studien. Zink et al. fanden eine teilweise Überlappung von Rad51- und p53-Foci (Zink et al., 2002). Yang et al. bestätigten eine Kolo-kalisation von Rad51 und p53 nach DNA-Schaden (Yang et al., 2002). Auch andere Autoren konnten die direkte Interaktion von Rad51 und p53 bestätigen (Henning und Sturzbecher, 2003; Linke et al., 2003; Sengupta und Harris, 2005).

Folgestudien könnten eine Untersuchung der p53-Expression mit einschließen, um so weitere Hinweise auf die p53-Rad51-Interaktion zu bekommen.

Auch Mutationen im Rad51-Gen wurden als Ursache für eine Rad51-Überexpression diskutiert. Bisher konnten solche allerdings nur vereinzelt nachgewiesen werden. Kato et al. wiesen bei zwei Mammakarzinompatientinnen eine Mutation im Exon 6 von Rad51 nach. Ein Einfluß dieser Mutation auf die Rad51-Expression ist nicht

beschrieben (Kato et al., 2000). Dies ist bisher die einzige Studie mit einer Mutation in der kodierenden Region von Rad51.

Weitere Erklärungen für die Ursache eines vermehrten Rad51-Gehalts sind eine verlängerte Proteinhalbwertszeit oder Polymorphismen in der Promotorregion mit daraus folgender Änderung in der Genexpression (Wang et al., 2001). Definierte Start-Sequenzen eines Gens leiten die mRNA-Synthese ein. Die Transkriptionsrate und damit die Expression eines Proteins können durch Mutationen, Polymorphismen und Methylierung dieser Gensequenzen beeinflusst werden. Ein Polymorphismus der Promotorregion wurde für Rad51 beschrieben. Wobei für Frauen, die zusätzlich eine Keimbahnmutation des BRCA2-Gens aufweisen, ein erhöhtes Brustkrebsrisiko zu resultieren scheint (Levy-Lahad et al., 2001). Da das Untersuchungskollektiv aber zu klein war, können keine definitiven Aussagen hierüber gemacht werden. In Mammakarzinomen konnten Schmutte et al. keine Methylierungen der Rad51 Start-Sequenz nachweisen (Schmutte et al., 1999). Wie diese beiden Ergebnisse belegen, gibt es keine eindeutigen Hinweise hinsichtlich veränderter Gensequenzen bei Rad51.

Hasselbach et al. konnten drei verschiedene Cis-Sequenzen in der Rad51-Promotorregion identifizieren. Eine Cis-Sequenz ist für die basale Rad51-Expression zuständig, die anderen beiden limitieren die Rad51-Expression auf ein niedriges Niveau. Die Autoren kommen zum Schluß, daß eine Charakterisierung der Bindung von Transkriptionsfaktoren helfen kann, hohe Rad51-Expressionsniveaus in Tumoren zu erklären (Hasselbach et al., 2005).

Eine reduzierte Rad51-Expression wurde in einer Studie am sporadischen Mammakarzinom beschrieben (Yoshikawa et al., 2000). Keiner der etablierten Tumormarker wie „Grading“ und Nodalstatus korrelierte mit der immunhistochemisch nachgewiesenen Reduktion des Rad51-Niveaus in 30% der untersuchten Karzinome.

Ein Erklärungsversuch für die Diskrepanz der Ergebnisse, Überexpression von Rad51 einerseits und reduzierte Rad51-Expression andererseits, ist die

unterschiedliche Sensitivität der immunhistochemischen Verfahren. Yoshikawa et al. verwenden einen polyklonalen Antikörper gegen Rad51. Polyklonale Antikörper erkennen mehrere verschiedene Epitope und sind damit für fixationsbedingte Maskierungen von Antigenen weniger anfällig. Daher haben diese Antikörper an fixierten, paraffinierten Geweben eine höhere Sensitivität (Noll und Schaub-Kuhnen, 2000a). Desweiteren spielen auch die Antikörperkonzentration und die verschiedenen Demaskierungsverfahren eine Rolle.

Der Rad51-Gehalt der Zellen wurde schon in einigen Karzinomarten untersucht. Eine vergleichbare Studie am Harnblasenkarzinom liegt im Moment nicht vor. In einer Studie am Pankreaskarzinom fand sich eine erhöhte Rad51-Expression (Maacke et al., 2000a). Darüber hinaus konnte in einer Pilotstudie am Mammakarzinom eine positive Korrelation des Rad51-Gehaltes mit dem „Tumorgrading“ festgestellt werden (Maacke et al., 2000b). In einer erst kürzlich veröffentlichten Studie am nicht-kleinzelligen Lungenkarzinom konnte Rad51 als unabhängiger Prognosemarker für das Überleben nachgewiesen werden (Qiao et al., 2005).

In der hier vorliegenden Studie wurde wiederum eine Korrelation der Rad51-Überexpression mit dem „Tumorgrading“ gefunden. Das „Tumorgrading“ mit einem p-Wert von 0,002 korreliert signifikant mit der Rad51-Überexpression. In der Gruppe des niedrigen Rad51-Gehalts finden sich überwiegend LMP (Tumoren mit einem niedrigen malignen Potential), die in dieser Studie am wenigsten malignen Tumoren. Die hochmalignen Tumoren finden sich hingegen in der Gruppe der hohen Rad51-Überexpression. Eine hohe Rad51-Überexpression spricht also für ein höhergradigeres „Grading“.

Außerdem konnte der Rad51-Gehalt auch mit den Patientendaten und damit mit den Zeiträumen des progressionsfreien Überlebens, beziehungsweise des Auftretens eines Rezidivs korreliert werden. Rad51 zeigte sich hierbei als unabhängiger Prognosefaktor für die Rezidiventstehung und für das rezidivfreie Überleben. Bezüglich des progressionsfreien Überlebens konnte die Rad51-Überexpression in

der univariaten Coxanalyse sowohl als kontinuierlich gemessene Variable mit einem p-Wert von 0,002, als auch als kategorial-kodierte Variable mit einem p-Wert von 0,005 als signifikanter Prognosefaktor bestätigt werden.

Eine stärkere Rad51-Überexpression geht also mit einem höheren Rezidivrisiko einher.

Die gleichen signifikanten Effekte können für das pT1- (Rad51 [kontin.]: $p=0,0001$; Rad51 [kateg.]: $p=0,0001$) und für das pT2-progressionsfreie Überleben (Rad51 [kontin.]: $p=0,0001$; Rad51 [kateg.]: $p=0,001$) ausgewiesen werden. Auch hier bedeutet eine hohe Rad51-Überexpression ein höheres Risiko eine Tumorprogression zu erleiden.

Auch in der multivariaten Coxanalyse, die die Signifikanz der untersuchten Parameter unabhängig von anderen Variablen analysiert, bestätigte sich Rad51 als bedeutender Prognosefaktor. Als kontinuierlicher Parameter zeigte Rad51 einen p-Wert von 0,008 beim rezidivfreien Überleben, 0,001 beim pT1-progressionsfreien Überleben und 0,002 beim pT2-progressionsfreien Überleben. Nur Rad51 konnte in allen drei Analysen (Rezidiventstehung, Progression zu pT1 und pT2) als signifikanter unabhängiger Prognosefaktor in der multivariaten Coxanalyse identifiziert werden.

Insgesamt bestätigte sich Rad51 in dieser Studie als signifikanter unabhängiger Prognosemarker in Tumoren.

Weiterführende Studien sind nun notwendig um dieses Ergebnis zu bestätigen und damit Rad51 als Prognosefaktor für die Tumorprogression und das rezidivfreie Überleben in der klinischen Anwendung zu diskutieren. Für ein effizientes Studiendesign wurde ein „Tumor marker utility grading system“ (TMUGS) entwickelt (Hayes et al., 1996; Hayes, 2000). Um die objektive Beurteilungsmöglichkeit der Studien zu gewährleisten, werden „Level of Evidence“ I und II Studien bevorzugt. Level I Untersuchungen sind prospektive Studien, bei denen primär der Tumormarker im Rahmen einer Metaanalyse untersucht wird. Bei ebenfalls prospektiven Level II

Studien ist der Tumormarker nicht das primäre Studienobjekt. Studien dieser Kategorien sollen es ermöglichen, die klinische Einsetzbarkeit und Notwendigkeit der untersuchten Tumormarker zu bestimmen.

4.3.2 Folgen der Rad51-Überexpression

In verschiedenen Tumorarten konnte eine Rad51-Überexpression nachgewiesen werden. Folgen einer solchen vermehrten Expression scheinen sehr weitreichend und mitentscheidend für die Therapierbarkeit eines Tumors zu sein.

In einem Hamsterzell-Modell wurde eine Überexpression von Rad51 um den Faktor 2-3 bewirkt, was zu einer bis zu 20-fachen Erhöhung der Rekombinationsrate sowie zu einer erhöhten Resistenz gegenüber ionisierender Strahlung führte (Vispe et al., 1998). Auch die Chemotherapieresistenz maligner Zellen wurde mit der erhöhten Expression von Rad51 in Verbindung gebracht (Christodoulopoulos et al., 1999; Kremer, 2003).

In einigen malignen Tumoren ist eine erhöhte Radio- und Chemoresistenz zu finden, wobei hier Rad51 mitbeteiligt sein könnte. Diese Zellen können möglicherweise DNA-Schäden schneller und effektiver reparieren (Saintigny et al., 2001) und somit zu einer Selektion von Zellen mit erhöhtem Rad51-Gehalt führen.

Außerdem können durch eine Rad51-Überexpression gesteigerte Rekombinationsvorgänge eine erhöhte Mutationsrate in Tumorzellen und somit eine genetische Instabilität bedingen (Vispe et al., 1998). Dies führt dann zu einer verbesserten Anpassungsfähigkeit an die Tumorumgebung und unterstützt so die Tumorprogression (Cahill et al., 1999).

Hier wäre zu überprüfen, ob es auch bei einem Patientenkollektiv einen Zusammenhang zwischen dem Rad51-Gehalt einer Zelle und der Wirksamkeit

verschiedener Chemotherapeutika gibt. Somit könnte eine Rad51-Überexpression weitergehende Hinweise auf die effektivste Therapie geben.

4.3.3 Rad51 und p21^{Waf-1}

Es finden sich Hinweise auf eine Verbindung zwischen Rad51 und p21^{Waf-1}. Die positive Korrelation einer Rad51- und p21^{Waf-1}-Überexpression wurde von Raderschall et al. beschrieben. Auch der umgekehrte Fall, die Herunterregulation von p21^{Waf-1} bei suppremierter Rad51-Expression konnte gezeigt werden (Raderschall et al., 2002a). Rad51 scheint auch verantwortlich für eine p53-unabhängige Hochregulation von p21^{Waf-1} zu sein (Kremer, 2003).

Mehrere Arbeitsgruppen klonierten das p21 Gen unabhängig voneinander und bezeichneten es als Waf1 (wt-p53 activated fragment 1), Cip1 (cyclin-dependent kinase interaction protein 1) oder SC11 (senescent cell-derived inhibitor 1) (el-Deiry et al., 1993; Harper et al., 1993; Noda et al., 1994). Das p21^{Waf-1}-Gen ist auf dem Chromosom 6 des Menschen lokalisiert und kodiert für ein nukleäres 21 kDa Protein. Es gehört der Gruppe der Inhibitoren Cyclin-abhängiger Kinasen (CDKI) an, die einen Arrest des Zellzyklus in der G1- und auch G2-Phase hervorrufen (Dotto, 2000). Eine Transaktivierung durch p53 von p21^{Waf-1} bedingt den p53-vermittelten Zellzyklusarrest (Waldman et al., 1996).

Auch eine negative Kontrolle der Apoptose fällt ins Aufgabengebiet von p21^{Waf-1}. So scheint p21^{Waf-1} die p53 vermittelte Apoptose in Kolorektalkarzinomzellen und Melanomzellen zu verhindern (Gorospe et al., 1996; Polyak et al., 1996; Gorospe et al., 1997), während eine durch Antisense-Technologie erzeugte p21^{Waf-1}-Inhibition die Apoptose fördert (Gorospe und Holbrook, 1996; Poluha et al., 1996; Marches et al., 1999).

Unter dem Einfluß von Wachstums- und Zelldifferenzierungsfaktoren kann p21^{Waf-1}, aber auch unabhängig von p53 wirken (Michieli et al., 1994; Datto et al., 1995a). BRCA1 (Somasundaram et al., 1997), TGF- β (Datto et al., 1995b; Li et al., 1998; Moustakas und Kardassis, 1998), IFN – γ (Chin et al., 1996) und IL6 (Bellido et al., 1998) sind beispielsweise p53 unabhängige p21^{Waf-1}-Aktivatoren.

Wie eingangs erwähnt fanden Raderschall et al. einen erhöhten p21^{Waf-1}-Level in Rad51 überexprimierenden Zellen (Raderschall et al., 2002a). In einer Studie in unserem Labor konnte nachgewiesen werden, daß Rad51-überexprimierende Zellen überwiegend in der G2-Phase einen Zellzyklusarrest machen (Henning und Sturzbecher, 2003). Die homologe Rekombination und damit Rad51 ist gerade in der G2-Phase des Zellzyklus besonders bedeutend. Zum einen werden DSBs in der G1-Phase überwiegend durch andere Reparaturmechanismen als homologe Rekombination ausgebessert. Zum anderen konnten in Studien von Tashiro et al. und Scully et al. keine Rad51-Foci in der G1-Phase nachgewiesen werden (Tashiro et al., 1996; Scully et al., 1997a). Henning und Sturzbecher schließen daraus, daß dieser Zellzyklusarrest in der G2-Phase durch p21^{Waf-1} ausgelöst wird (Henning und Sturzbecher, 2003; Kremer, 2003). Um die Vergesellschaftung von Rad51 und p21^{Waf-1} weiter zu untersuchen, wurde auch in der vorliegenden Arbeit p21^{Waf-1} mituntersucht. Mit einem p-Wert von 0,710 konnte sich keine Korrelation zwischen der Rad51- und p21^{Waf-1}-Überexpression bestätigen lassen. Das kann verschiedene Ursachen haben. Zum einen ist eine Überexpression von p21^{Waf-1} nicht immer mit einem Wachstumsarrest vergesellschaftet, man kann sie vielmehr auch bei Zellen finden, die sich in der Wachstumsphase befinden (Gartel und Tyner, 1999). Eine Erklärung für diese konträren Resultate ist, daß p21^{Waf-1} sowohl als Inhibitor für CDKs agiert, als auch in die Formation von CDK Komplexen eingreift und somit positiv beeinflusst (LaBaer et al., 1997). Zum anderen gibt es zahlreiche p53-unabhängige Wege, p21^{Waf-1} zu aktivieren. Es ist also vorstellbar, daß in Harnblasenkarzinomen die Rad51-vermittelte p21^{Waf-1}-Aktivierung nur eine untergeordnete Rolle spielt und alternative Wege der Aktivierung von p21^{Waf-1} genommen werden. In weiteren

Studien könnte man den p21^{Waf-1}-Gehalt an unterschiedlichen Tumoren mit Rad51 korrelieren, um dadurch tumorspezifische Besonderheiten des Harnblasenkrebses ausschließen zu können.

Durch die hier vorliegende immunhistochemische Analyse kann aber keine Aussage über die Vorgänge auf Einzelzellebene gemacht werden. Vielmehr wurde ein Querschnittswert der ausgezählten Zellen gebildet. Wie aber der Rad51- bzw. der p21^{Waf-1}-Gehalt der einzelnen Zelle ist, kann man mit dieser Untersuchung nicht feststellen.

Ein nächster Schritt ist also, durch Doppelfärbungen den Rad51- und p21^{Waf-1}-Gehalt auf Einzelzellebene zu analysieren. So könnte man die Konzentrationsunterschiede der beiden Proteine zu einem bestimmten Zeitpunkt feststellen.

In der vorliegenden Studie konnten nur 72 Fälle erfolgreich auf den p21^{Waf-1}-Gehalt untersucht werden. Die positiven Nachweise variierten zwischen 0,3% und 36,1%, bei einem Median von 5,2%. In einer anderen Studie konnte eine noch höhere Spannbreite der p21^{Waf-1} Werte gemessen werden 0 – 85% (Lipponen et al., 1998), der p21^{Waf-1} Nachweis zeigte sich dort den schon bekannten Prognosemarkern nicht ebenbürtig. Ähnlich wurde auch in der vorliegenden Studie keine Korrelation von p21^{Waf-1} mit der Tumorentwicklung festgestellt.

Auch die theoretisch denkbare Korrelation mit Rad51, die schwerpunktmäßig in dieser Studie mituntersucht wurde, konnte sich nicht bestätigen.

p21^{Waf-1} als unabhängiger Prognosefaktor für die Rezidiventstehung und Gesamtüberleben konnte in zwei Studien herausgearbeitet werden (Stein et al., 1998a; Chatterjee et al., 2004).

Insgesamt zeigen sich sehr widersprüchliche Daten hinsichtlich der Verwendung von p21^{Waf-1} als Prognosefaktor. Möglicherweise ist eine Kombination verschiedener Marker aufschlußreicher.

Zum jetzigen Zeitpunkt gibt es noch keine weiteren Studien zur immunhistochemischen Expressionskorrelation von Rad51 und p21^{Waf-1} im Harnblasenkarzinom.

4.3.4 Ki67 in der Studie

Während p21^{Waf-1} einen Zellzyklusarrest auslöst und damit primär in nicht proliferierenden Zellen nachweisbar ist, ist Ki67 ein immunhistochemischer Marker für proliferierendes Gewebe. Das Ki67-Antigen ist ein nukleäres Protein, welches in zahlreichen Neoplasien nachweisbar ist, darunter auch das Harnblasenkarzinom (Mellon et al., 1990; Okamura et al., 1990). Es detektiert ein Protein, dessen Gen auf Chromosom 10 liegt, während der G1, S, G2 und M-Phase des Zellzyklus, jedoch nicht in ruhenden Zellen in der G0-Phase (Gerdes et al., 1984; Gerdes et al., 1991). Als Proliferationsmarker eines Tumors könnte Ki67 also Hinweise auf die biologische Entwicklung des Tumors geben.

In zwei Studien (Gontero et al., 2000; Oosterhuis et al., 2000) konnte Ki-67 als Indikator für ein Tumorrezidiv im Harnblasenkarzinom nachgewiesen werden, was in der vorliegenden Studie nicht gelang.

Eine Korrelation zwischen dem Ki67-Index und der Progression des Tumors konnte hingegen in dieser Studie gefunden werden, was sich mit einer Studie von Oosterhuis deckt (Oosterhuis et al., 2000).

Cina et al. schlugen vor, Ki67 als Entscheidungshilfe bei histopathologisch unklaren Harnblasenkarzinomen hinzuzuziehen (Cina et al., 2001). In dieser Studie konnte ein deutlicher Unterschied der Ki67-Expression zwischen „low-grade“ und „high-grade“ Karzinomen festgestellt werden.

Insgesamt zeigte Ki67 also in der hier vorliegenden Studie nur eine Korrelation mit der Progression des Tumors, ist aber kein unabhängiger Prognosemarker in diesem Patientenkollektiv.

Auch wenn sich in der Literatur immer wieder Studien finden, die Ki67 als Prognosemarker identifizieren, scheint aufgrund der teilweise widersprüchlichen Ergebnisse auch hier die Tendenz zu kombinierten Prognosemarkern zu gehen.

4.3.5 Kombination von Parametern

Andere Arbeitsgruppen haben durch einen Zusammenschluß mehrerer Faktoren versucht, einen Prognosefaktor für das Harnblasenkarzinom zu erarbeiten. Chatterjee et al. konnten eine Korrelation zwischen der Kombination von p53, p21 und pRb mit einer Rezidiventstehung und dem Gesamtüberleben feststellen. Hierfür teilten sie die Patienten in vier Gruppen ein, von keiner Veränderung bis hin zur Veränderung aller drei Parameter (Chatterjee et al., 2004). Shariat und Mitarbeiter kamen in ihrer Studie zu dem Schluß, daß die Kombination von zumindest teilweise unabhängig voneinander wirkenden Parametern zu einer verbesserten prognostischen Aussage für den einzelnen Patienten führt. Untersucht wurden p53, p21, pRB und p16, wobei das Risiko einer Progression mit der Anzahl der veränderten Parameter korrelierte (Shariat et al., 2004).

Die kombinierte Analyse verschiedener Marker scheint eine Möglichkeit zu sein, eine klinische Entscheidungshilfe zu finden. Die Aussagekraft der einzelnen Parameter wird durch die Zusammenschau mit anderen Faktoren verstärkt und somit kann eine exaktere Aussage hinsichtlich der biologischen Aktivität des Tumors getroffen werden.

Auch in der hier vorliegenden Studie wurde untersucht, ob es einen Zusammenhang zwischen Rad51- und p21-Expression im Harnblasenkarzinom gibt. Eine Verschränkung dieser beiden Parameter ließ sich in dieser Untersuchung nicht bestätigen.

4.3.6 Andere Prognosemarker im Harnblasenkarzinom

Die bisher untersuchten Prognosemarker im Harnblasenkarzinom zeigen hinsichtlich Ergebnissen und Art der potentiellen Marker ein sehr heterogenes Bild. Man kann diese Prognoseindikatoren für das Harnblasenkarzinom in mehrere Gruppen einteilen. Zum einen gibt es die Gruppe der Proto-Onkogene/Onkogene, zu der der

Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) gerechnet wird, Tumorsuppressoren wie p53 und Rb, Zellzyklusregulatoren (p21 und Ki67), Angiogenese Faktoren wie Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) und Cyclooxygenase-2, sowie Zelloberflächenmarker wie CD44 (Habuchi et al., 2005). Eine relativ neue Gruppe umfasst die Detektion tumorspezifischer Genexpressionsprofile mit Hilfe der Array-Technologie. Hierbei kann mittels cDNS-Mikroarray die Über- bzw. Unterexpression einzelner Gene in einem Tumorpräparat nachgewiesen werden, was man auch als Markersuche bezeichnet. Die Markertestung erfolgt mit der Tissue-Mikroarray-Technik, wobei hier identifizierte Gene an einem großen Kollektiv getestet werden (Suhr et al., 2002).

Doch keine der bisher untersuchten Prognosemarker wurde in großen prospektiven Studien bestätigt. Die Resultate von Multicenter-Studien mit standardisierten Methoden müssen abgewartet werden, um eine endgültige Aussage über die klinische Anwendbarkeit der einzelnen potentiellen Marker machen zu können (Habuchi et al., 2005).

4.4 Ausblick

Eine Rad51-Überexpression in Tumorzellen hat eine Chemo- und Radioresistenz zur Folge. Bei einer Verminderung des Rad51-Gehalts dieser Zellen, könnte man also eine gesteigerte Sensitivität dieser Tumoren für Radio- und Chemotherapie erwarten. Erste Erfolge zeigten sich mit Rad51-Antisense-Oligonukleotiden, die die Radiosensitivität von Gliomzellen und Prostatakarzinom-Zelllinien steigern konnten (Yamamoto et al., 1996; Ohnishi et al., 1998; Collis et al., 2001).

Beim Harnblasenkarzinom ist aufgrund der großen biologischen Variabilität die Selektion der Patienten im Sinne der Radikalität bei der Therapieplanung wichtig.

Starke Lebensqualitätseinbußen aufgrund des Verlustes der Harnblase können zu weniger invasiven Therapien in strittigen Fällen veranlassen. Andererseits kann eine sehr radikale Therapieplanung dazu führen, daß sich in unklaren Fällen die Entfernung der Harnblase nachträglich als nicht notwendig erweist.

Der molekulare Marker Rad51 könnte hier Hilfestellung leisten, patientenspezifisch die Radikalität der Therapie zu planen. Bei niedrigerem Risiko der Tumorprogression könnte man mit aggressiveren Therapien zuwarten, während bei Hochrisikopatienten die Harnblase frühzeitig entfernt werden sollte.

Für eine exakte Diagnose und Prognose müssen neue Anhaltspunkte für die biologische Aktivität eines Tumors gefunden werden. Gerade das Harnblasenkarzinom mit den doch sehr variablen und durch die etablierten Untersuchungen nicht eindeutig vorhersehbaren Entwicklungsmöglichkeiten benötigt neue Prognosefaktoren.

Rad51 scheint eine Möglichkeit zu sein, das biologische Verhalten im Sinne von Rezidiventstehung und rezidivfreiem Überleben besser einschätzen zu können. Somit könnte die Zusammenschau klinischer und molekulargenetischer Daten zu differenzierten Risikoziffern und individuellen Vorsorge-, Behandlungs- und Nachsorgekonzepten führen.

5 Zusammenfassung

Eine maligne Neubildung in der Harnblase zeichnet sich durch eine große biologische Variabilität aus, was die Vorhersagbarkeit der Entwicklung des Tumors erschwert. Molekulare Tumormarker sollen hier helfen, individuelle Therapieentscheidungen zu treffen.

In Studien am Mamma- und Pankreaskarzinom zeigte sich Rad51 überexprimiert. Rad51 spielt eine zentrale Rolle bei der homologen Rekombination, einem wichtigen Reparaturmechanismus für DNA-Doppelstrangbrüche. Eine Korrelation der Rad51-Überexpression mit dem „Grading“ im Mamma-Ca deutete auf eine potentielle Prognosemarkerqualität dieses Proteins hin. Aus diesem Grunde wurde Rad51 in der hier vorliegenden Studie immunhistochemisch untersucht und mit den entsprechenden Patientendaten bezüglich Rezidiv und Überleben korreliert.

101 pTa-Tumor-Patienten mit einem Altersschnitt von 67 Jahren und einem medianen Follow-up von 59 Monaten wurden in die Studie aufgenommen.

Der Median der Rad51 positiven Tumorzellen lag bei 9,5%, der geringste Wert bei 1,1%, der größte zeigte eine deutliche Rad51-Überexpression von 37,2%. Der Anteil Rad51-exprimierender Tumorzellen korrelierte signifikant und unabhängig von anderen Markern mit einem Tumorrezidiv und einer Tumorprogression. Es zeigte sich, daß bezüglich des rezidivfreien Überlebens die Rad51-Überexpression ($p=0,002$) als signifikanter Prognosefaktor ausgewiesen werden konnte. Eine stärkere Rad51-Expression geht mit einem höheren Rezidivrisiko einher. Die gleichen signifikanten Effekte zeigten sich für das pT1- ($p=0,0001$) und für das pT2-progressionsfreie Überleben ($p=0,0001$).

Mit Hilfe von Rad51-Expressionsniveaus könnte man die wirkungsvollste Therapie herausfiltern und so eine Tumorprogression oder die Bildung eines Rezidivs verhindern oder so lange wie möglich hinauszögern. Prospektive Studien müssen nun den prädiktiven Wert der Rad51-Expression bestätigen.

6 Literaturverzeichnis

Abel PD, Hall RR, Williams G (1988): Should pT1 transitional cell cancers of the bladder still be classified as superficial? *Br J Urol* 62 (3): 235-9.

Alken P, Mickisch G (1998): Blasentumoren. In: Alken P, Walz PH: *Urologie*. 2. Aufl., 221, Chapman&Hall, Weinheim.

Alsheikh A, Mohamedali Z, Jones E, Masterson J, Gilks CB (2001): Comparison of the WHO/ISUP classification and cytokeratin 20 expression in predicting the behavior of low-grade papillary urothelial tumors. *World/Health Organization/International Society of Urologic Pathology. Mod Pathol* 14 (4): 267-72.

Baumann P, West SC (1998): Role of the human RAD51 protein in homologous recombination and double-stranded-break repair. *Trends Biochem Sci* 23 (7): 247-51.

Bellido T, O'Brien CA, Roberson PK, Manolagas SC (1998): Transcriptional activation of the p21(WAF1,CIP1,SDI1) gene by interleukin-6 type cytokines. A prerequisite for their pro-differentiating and anti-apoptotic effects on human osteoblastic cells. *J Biol Chem* 273 (33): 21137-44.

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

Bishop AJ, Schiestl RH (2000): Homologous recombination as a mechanism for genome rearrangements: environmental and genetic effects. *Hum Mol Genet* 9 (16): 2427-334.

Brandau S, Bohle A (2001): Bladder cancer. I. Molecular and genetic basis of carcinogenesis. *Eur Urol* 39 (5): 491-7.

Brugarolas J, Chandrasekaran C, Gordon JI, Beach D, Jacks T, Hannon GJ (1995): Radiation-induced cell cycle arrest compromised by p21 deficiency. *Nature* 377 (6549): 552-7.

Brugarolas J, Moberg K, Boyd SD, Taya Y, Jacks T, Lees JA (1999): Inhibition of cyclin-dependent kinase 2 by p21 is necessary for retinoblastoma protein-mediated G1 arrest after gamma-irradiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96 (3): 1002-7.

Buchhop S, Donzelmann B, Nastainczyk W, Sturzbecher HW (1996): Isolation and characterization of six monoclonal antibodies raised against human RAD51 recombinant protein. *Hybridoma* 15 (3): 205-10.

Buchhop S, Gibson MK, Wang XW, Wagner P, Sturzbecher HW, Harris CC (1997): Interaction of p53 with the human Rad51 protein. *Nucleic Acids Res* 25 (19): 3868-74.

Cabanne F, Gérard-Marchant R, Destaing F (2000): Geschichte des Krebses. In: Toellner R, *Illustrierte Geschichte der Medizin*, Vol. 5, 2757, Genehmigte Lizenzausgabe fuer Weltbild Verlag GmbH, Augsburg.

Cahill DP, Kinzler KW, Vogelstein B, Lengauer C (1999): Genetic instability and darwinian selection in tumours. *Trends Cell Biol* 9 (12): M57-60.

Chatterjee SJ, Datar R, Youssefzadeh D, George B, Goebell PJ, Stein JP, Young L, Shi SR, Gee C, Groshen S, Skinner DG, Cote RJ (2004): Combined effects of p53, p21, and pRb expression in the progression of bladder transitional cell carcinoma. *J Clin Oncol* 22 (6): 1007-13.

Chen X, Ko LJ, Jayaraman L, Prives C (1996): p53 levels, functional domains, and DNA damage determine the extent of the apoptotic response of tumor cells. *Genes Dev* 10 (19): 2438-51.

Chin YE, Kitagawa M, Su WC, You ZH, Iwamoto Y, Fu XY (1996): Cell growth arrest and induction of cyclin-dependent kinase inhibitor p21 WAF1/CIP1 mediated by STAT1. *Science* 272 (5262): 719-22.

Christodoulopoulos G, Malapetsa A, Schipper H, Golub E, Radding C, Panasci LC (1999): Chlorambucil induction of HsRad51 in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Clin Cancer Res* 5 (8): 2178-84.

Cina SJ, Lancaster-Weiss KJ, Lecksell K, Epstein JI (2001): Correlation of Ki-67 and p53 with the new World Health Organization/International Society of Urological Pathology Classification System for Urothelial Neoplasia. *Arch Pathol Lab Med* 125 (5): 646-51.

Cohen SM, Garland EM, St John M, Okamura T, Smith RA (1992): Acrolein initiates rat urinary bladder carcinogenesis. *Cancer Res* 52 (13): 3577-81.

Collis SJ, Tighe A, Scott SD, Roberts SA, Hendry JH, Margison GP (2001): Ribozyme minigene-mediated RAD51 down-regulation increases radiosensitivity of human prostate cancer cells. *Nucleic Acids Res* 29 (7): 1534-8.

Datto MB, Li Y, Panus JF, Howe DJ, Xiong Y, Wang XF (1995a): Transforming growth factor beta induces the cyclin-dependent kinase inhibitor p21 through a p53-independent mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92 (12): 5545-9.

Datto MB, Yu Y, Wang XF (1995b): Functional analysis of the transforming growth factor beta responsive elements in the WAF1/Cip1/p21 promoter. *J Biol Chem* 270 (48): 28623-8.

de Toledo SM, Azzam EI, Keng P, Laffrenier S, Little JB (1998): Regulation by ionizing radiation of CDC2, cyclin A, cyclin B, thymidine kinase, topoisomerase IIalpha, and RAD51 expression in normal human diploid fibroblasts is dependent on p53/p21Waf1. *Cell Growth Differ* 9 (11): 887-96.

Desai S, Lim SD, Jimenez RE, Chun T, Keane TE, McKenney JK, Zavala-Pompa A, Cohen C, Young RH, Amin MB (2000): Relationship of cytokeratin 20 and CD44 protein expression with WHO/ISUP grade in pTa and pT1 papillary urothelial neoplasia. *Mod Pathol* 13 (12): 1315-23.

Dotto GP (2000): p21(WAF1/Cip1): more than a break to the cell cycle? *Biochim Biophys Acta* 1471 (1): M43-56.

Dt.Krebsgesellschaft (2002): Kurzgefasste Interdisziplinäre Leitlinien 2002. 3.Auflage.

el-Deiry WS, Kern SE, Pietenpol JA, Kinzler KW, Vogelstein B (1992): Definition of a consensus binding site for p53. *Nat Genet* 1 (1): 45-9.

el-Deiry WS, Tokino T, Velculescu VE, Levy DB, Parsons R, Trent JM, Lin D, Mercer WE, Kinzler KW, Vogelstein B (1993): WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell* 75 (4): 817-25.

Epstein JI, Amin MB, Reuter VR, Mostofi FK (1998): The World Health Organization/International Society of Urological Pathology consensus classification of urothelial (transitional cell) neoplasms of the urinary bladder. Bladder Consensus Conference Committee. *Am J Surg Pathol* 22 (12): 1435-48.

Epstein JI (2003): The new World Health Organization/International Society of Urological Pathology (WHO/ISUP) classification for TA, T1 bladder tumors: is it an improvement? *Crit Rev Oncol Hematol* 47 (2): 83-9.

Fernandes ET, Manivel JC, Reddy PK, Ercole CJ (1996): Cyclophosphamide associated bladder cancer--a highly aggressive disease: analysis of 12 cases. *J Urol* 156 (6): 1931-3.

Gartel AL, Tyner AL (1999): Transcriptional regulation of the p21((WAF1/CIP1)) gene. *Exp Cell Res* 246 (2): 280-9.

Gee CJ, Harris H (1979): Tumorigenicity of cells transformed by Simian virus 40 and of hybrids between such cells and normal diploid cells. *J Cell Sci* 36: 223-40.

Gerdes J, Lemke H, Baisch H, Wacker HH, Schwab U, Stein H (1984): Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67. *J Immunol* 133 (4): 1710-5.

Gerdes J, Li L, Schlueter C, Duchrow M, Wohlenberg C, Gerlach C, Stahmer I, Kloth S, Brandt E, Flad HD (1991): Immunobiochemical and molecular biologic characterization of the cell proliferation-associated nuclear antigen that is defined by monoclonal antibody Ki-67. *Am J Pathol* 138 (4): 867-73.

Gontero P, Casetta G, Zitella A, Ballario R, Pacchioni D, Magnani C, Muir GH, Tizzani A (2000): Evaluation of P53 protein overexpression, Ki67 proliferative activity and mitotic index as markers of tumour recurrence in superficial transitional cell carcinoma of the bladder. *Eur Urol* 38 (3): 287-96.

Gorospe M, Holbrook NJ (1996): Role of p21 in prostaglandin A2-mediated cellular arrest and death. *Cancer Res* 56 (3): 475-9.

Gorospe M, Wang X, Guyton KZ, Holbrook NJ (1996): Protective role of p21(Waf1/Cip1) against prostaglandin A2-mediated apoptosis of human colorectal carcinoma cells. *Mol Cell Biol* 16 (12): 6654-60.

Gorospe M, Cirielli C, Wang X, Seth P, Capogrossi MC, Holbrook NJ (1997): p21(Waf1/Cip1) protects against p53-mediated apoptosis of human melanoma cells. *Oncogene* 14 (8): 929-35.

Gupta RC, Bazemore LR, Golub EI, Radding CM (1997): Activities of human recombination protein Rad51. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94 (2): 463-8.

Haaf T, Golub EI, Reddy G, Radding CM, Ward DC (1995): Nuclear foci of mammalian Rad51 recombination protein in somatic cells after DNA damage and its localization in synaptonemal complexes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92 (6): 2298-302.

Habuchi T, Marberger M, Droller MJ, Hemstreet GP, 3rd, Grossman HB, Schalken JA, Schmitz-Drager BJ, Murphy WM, Bono AV, Goebell P, Getzenberg RH, Hautmann SH, Messing E, Fradet Y, Lokeshwar VB (2005): Prognostic markers for bladder cancer: International Consensus Panel on bladder tumor markers. *Urology* 66 (6 Suppl 1): 64-74.

Hanahan D, Weinberg RA (2000): The hallmarks of cancer. *Cell* 100 (1): 57-70.

Hansen LT, Lundin C, Spang-Thomsen M, Petersen LN, Helleday T (2003): The role of RAD51 in etoposide (VP16) resistance in small cell lung cancer. *Int J Cancer* 105 (4): 472-9.

Harper JW, Adami GR, Wei N, Keyomarsi K, Elledge SJ (1993): The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases. *Cell* 75 (4): 805-16.

Hasselbach L, Haase S, Fischer D, Kolberg HC, Stuerzbecher HW (2005): Characterisation of the promoter region of the human DNA-repair gene rad51. *European Journal of Gynaecological Oncology* (26): 589-598.

Hayes DF, Bast RC, Desch CE, Fritsche H, Jr., Kemeny NE, Jessup JM, Locker GY, Macdonald JS, Mennel RG, Norton L, Ravdin P, Taube S, Winn RJ (1996): Tumor marker utility grading system: a framework to evaluate clinical utility of tumor markers. *J Natl Cancer Inst* 88 (20): 1456-66.

Hayes DF (2000): Designing tumor marker studies: will the results provide clinically useful information. *Arch Pathol Lab Med* 124 (7): 952-4.

Heney NM, Ahmed S, Flanagan MJ, Frable W, Corder MP, Hafermann MD, Hawkins IR (1983): Superficial bladder cancer: progression and recurrence. *J Urol* 130 (6): 1083-6.

Henning W, Sturzbecher HW (2003): Homologous recombination and cell cycle checkpoints: Rad51 in tumour progression and therapy resistance. *Toxicology* 193 (1-2): 91-109.

Hoeijmakers JH (2001): Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. *Nature* 411 (6835): 366-74.

Hollstein M, Sidransky D, Vogelstein B, Harris CC (1991): p53 mutations in human cancers. *Science* 253 (5015): 49-53.

Holmang S, Andius P, Hedelin H, Wester K, Busch C, Johansson SL (2001): Stage progression in Ta papillary urothelial tumors: relationship to grade, immunohistochemical expression of tumor markers, mitotic frequency and DNA ploidy. *J Urol* 165 (4): 1124-8; discussion 1128-30.

Jackson P, Bos E, Braithwaite AW (1993): Wild-type mouse p53 down-regulates transcription from different virus enhancer/promoters. *Oncogene* 8 (3): 589-97.

Jemal A, Siegel R, Ward E, Murray T, Xu J, Smigal C, Thun MJ (2006): Cancer statistics, 2006. *CA Cancer J Clin* 56 (2): 106-30.

Jung I, Messing E (2000): Molecular mechanisms and pathways in bladder cancer development and progression. *Cancer Control* 7 (4): 325-34.

Kaldor JM, Day NE, Kittelmann B, Pettersson F, Langmark F, Pedersen D, Prior P, Neal F, Karjalainen S, Bell J, et al. (1995): Bladder tumours following chemotherapy and radiotherapy for ovarian cancer: a case-control study. *Int J Cancer* 63 (1): 1-6.

Kanaar R, Hoeijmakers JH (1998): Genetic recombination. From competition to collaboration. *Nature* 391 (6665): 335, 337-8.

Kato M, Yano K, Matsuo F, Saito H, Katagiri T, Kurumizaka H, Yoshimoto M, Kasumi F, Akiyama F, Sakamoto G, Nagawa H, Nakamura Y, Miki Y (2000): Identification of Rad51 alteration in patients with bilateral breast cancer. *J Hum Genet* 45 (3): 133-7.

Kausch I, Bohle A (2002): Molecular aspects of bladder cancer III. Prognostic markers of bladder cancer. *Eur Urol* 41 (1): 15-29.

Kausch I, Bohle A (2003): [Non-invasive urinary diagnosis of bladder cancer. What do we know?]. *Urologe A* 42 (7): 912-21.

Khanna KK, Jackson SP (2001): DNA double-strand breaks: signaling, repair and the cancer connection. *Nat Genet* 27 (3): 247-54.

Kirkali Z, Chan T, Manoharan M, Algaba F, Busch C, Cheng L, Kiemeny L, Kriegmair M, Montironi R, Murphy WM, Sesterhenn IA, Tachibana M, Weider J (2005): Bladder cancer: epidemiology, staging and grading, and diagnosis. *Urology* 66 (6 Suppl 1): 4-34.

Knippers R (1997): Rekombination und Transposition. In: Knippers R, Molekulare Genetik. 7. Auflage, 195-225, Georg Thieme Verlag, Stuttgart.

Knowles MA (1995): Molecular genetics of bladder cancer. Br J Urol 75 Suppl 1: 57-66.

Kremer T (2003): Auswirkungen einer Ueberexpression des Rekombinationsfaktors Rad51 auf Apoptose und Nekrose in Tumorzellen, Universitaet zu Luebeck.

Kroft SH, Oyasu R (1994): Urinary bladder cancer: mechanisms of development and progression. Lab Invest 71 (2): 158-74.

Kuerbitz SJ, Plunkett BS, Walsh WV, Kastan MB (1992): Wild-type p53 is a cell cycle checkpoint determinant following irradiation. Proc Natl Acad Sci U S A 89 (16): 7491-5.

LaBaer J, Garrett MD, Stevenson LF, Slingerland JM, Sandhu C, Chou HS, Fattaey A, Harlow E (1997): New functional activities for the p21 family of CDK inhibitors. Genes Dev 11 (7): 847-62.

Lambert S, Lopez BS (2000): Characterization of mammalian RAD51 double strand break repair using non-lethal dominant-negative forms. Embo J 19 (12): 3090-9.

Lane DP (1992): Cancer. p53, guardian of the genome. Nature 358 (6381): 15-6.

Levine AJ (1997): p53, the cellular gatekeeper for growth and division. Cell 88 (3): 323-31.

Levy-Lahad E, Lahad A, Eisenberg S, Dagan E, Paperna T, Kasinetz L, Catane R, Kaufman B, Beller U, Renbaum P, Gershoni-Baruch R (2001): A single nucleotide

polymorphism in the RAD51 gene modifies cancer risk in BRCA2 but not BRCA1 carriers. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98 (6): 3232-6.

Li JM, Datto MB, Shen X, Hu PP, Yu Y, Wang XF (1998): Sp1, but not Sp3, functions to mediate promoter activation by TGF-beta through canonical Sp1 binding sites. *Nucleic Acids Res* 26 (10): 2449-56.

Lim DS, Hasty P (1996): A mutation in mouse rad51 results in an early embryonic lethal that is suppressed by a mutation in p53. *Mol Cell Biol* 16 (12): 7133-43.

Linke SP, Sengupta S, Khabie N, Jeffries BA, Buchhop S, Miska S, Henning W, Pedoux R, Wang XW, Hofseth LJ, Yang Q, Garfield SH, Sturzbecher HW, Harris CC (2003): p53 interacts with hRAD51 and hRAD54, and directly modulates homologous recombination. *Cancer Res* 63 (10): 2596-605.

Lipponen P, Aaltomaa S, Eskelinen M, Ala-Opas M, Kosma VM (1998): Expression of p21(waf1/cip1) protein in transitional cell bladder tumours and its prognostic value. *Eur Urol* 34 (3): 237-43.

Maacke H, Jost K, Opitz S, Miska S, Yuan Y, Hasselbach L, Luttes J, Kalthoff H, Sturzbecher HW (2000a): DNA repair and recombination factor Rad51 is over-expressed in human pancreatic adenocarcinoma. *Oncogene* 19 (23): 2791-5.

Maacke H, Opitz S, Jost K, Hamdorf W, Henning W, Kruger S, Feller AC, Lopens A, Diedrich K, Schwinger E, Sturzbecher HW (2000b): Over-expression of wild-type Rad51 correlates with histological grading of invasive ductal breast cancer. *Int J Cancer* 88 (6): 907-13.

Magnusson KP, Sandstrom M, Stahlberg M, Larsson M, Flygare J, Hellgren D, Wiman KG, Ljungquist S (2000): p53 splice acceptor site mutation and increased

HsRAD51 protein expression in Bloom's syndrome GM1492 fibroblasts. *Gene* 246 (1-2): 247-54.

Marches R, Hsueh R, Uhr JW (1999): Cancer dormancy and cell signaling: induction of p21(waf1) initiated by membrane IgM engagement increases survival of B lymphoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96 (15): 8711-5.

Marmorstein LY, Ouchi T, Aaronson SA (1998): The BRCA2 gene product functionally interacts with p53 and RAD51. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95 (23): 13869-74.

Matullo G, Guarrera S, Carturan S, Peluso M, Malaveille C, Davico L, Piazza A, Vineis P (2001): DNA repair gene polymorphisms, bulky DNA adducts in white blood cells and bladder cancer in a case-control study. *Int J Cancer* 92 (4): 562-7.

Mazin AV, Alexeev AA, Kowalczykowski SC (2003): A novel function of Rad54 protein. Stabilization of the Rad51 nucleoprotein filament. *J Biol Chem* 278 (16): 14029-36.

Mellon K, Neal DE, Robinson MC, Marsh C, Wright C (1990): Cell cycling in bladder carcinoma determined by monoclonal antibody Ki67. *Br J Urol* 66 (3): 281-5.

Messing EM, Young TB, Hunt VB, Gilchrist KW, Newton MA, Bram LL, Hisgen WJ, Greenberg EB, Kuglitsch ME, Wegenke JD (1995): Comparison of bladder cancer outcome in men undergoing hematuria home screening versus those with standard clinical presentations. *Urology* 45 (3): 387-96; discussion 396-7.

Michieli P, Chedid M, Lin D, Pierce JH, Mercer WE, Givol D (1994): Induction of WAF1/CIP1 by a p53-independent pathway. *Cancer Res* 54 (13): 3391-5.

Moustakas A, Kardassis D (1998): Regulation of the human p21/WAF1/Cip1 promoter in hepatic cells by functional interactions between Sp1 and Smad family members. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95 (12): 6733-8.

Nevins JR, Leone G, DeGregori J, Jakoi L (1997): Role of the Rb/E2F pathway in cell growth control. *J Cell Physiol* 173 (2): 233-6.

Noda A, Ning Y, Venable SF, Pereira-Smith OM, Smith JR (1994): Cloning of senescent cell-derived inhibitors of DNA synthesis using an expression screen. *Exp Cell Res* 211 (1): 90-8.

Noll S, Schaub-Kuhnen S (2000a): Polyklonale Antikörper. In: Höfler H, Müller K: *Praxis der Immunhistochemie*. 1.Aufl., 2, Urban&Fischer, München.

Noll S, Schaub-Kuhnen S (2000b): Enzymatische Demaskierung. In: Höfler H, Müller K: *Praxis der Immunhistochemie*. 1.Aufl., 40, Urban&Fischer, München.

Noll S, Schaub-Kuhnen S (2000c): ABC-Komplex. In: Höfler H, Müller K: *Praxis der Immunhistochemie*. 1.Aufl., 70, Urban&Fischer, München.

Ohnishi T, Taki T, Hiraga S, Arita N, Morita T (1998): In vitro and in vivo potentiation of radiosensitivity of malignant gliomas by antisense inhibition of the RAD51 gene. *Biochem Biophys Res Commun* 245 (2): 319-24.

Okamura K, Miyake K, Koshikawa T, Asai J (1990): Growth fractions of transitional cell carcinomas of the bladder defined by the monoclonal antibody Ki-67. *J Urol* 144 (4): 875-8.

Oosterhuis JW, Schapers RF, Janssen-Heijnen ML, Smeets AW, Pauwels RP (2000): MIB-1 as a proliferative marker in transitional cell carcinoma of the bladder:

clinical significance and comparison with other prognostic factors. *Cancer* 88 (11): 2598-605.

Opitz S (2001): Der Rekombinationsfaktor Rad51 in invasiv duktalem Mammakarzinomen: eine immunhistochemische Studie. Med. Diss. Lübeck.

Ozen H, Hall MC (2000): Bladder cancer. *Curr Opin Oncol* 12 (3): 255-9.

Poluha W, Poluha DK, Chang B, Crosbie NE, Schonhoff CM, Kilpatrick DL, Ross AH (1996): The cyclin-dependent kinase inhibitor p21 (WAF1) is required for survival of differentiating neuroblastoma cells. *Mol Cell Biol* 16 (4): 1335-41.

Polyak K, Waldman T, He TC, Kinzler KW, Vogelstein B (1996): Genetic determinants of p53-induced apoptosis and growth arrest. *Genes Dev* 10 (15): 1945-52.

Qiao GB, Wu YL, Yang XN, Zhong WZ, Xie D, Guan XY, Fischer D, Kolberg HC, Kruger S, Stuerzbecher HW (2005): High-level expression of Rad51 is an independent prognostic marker of survival in non-small-cell lung cancer patients. *Br J Cancer* 93 (1): 137-43.

Raderschall E, Bazarov A, Cao J, Lurz R, Smith A, Mann W, Ropers HH, Sedivy JM, Golub EI, Fritz E, Haaf T (2002a): Formation of higher-order nuclear Rad51 structures is functionally linked to p21 expression and protection from DNA damage-induced apoptosis. *J Cell Sci* 115 (Pt 1): 153-64.

Raderschall E, Stout K, Freier S, Suckow V, Schweiger S, Haaf T (2002b): Elevated levels of Rad51 recombination protein in tumor cells. *Cancer Res* 62 (1): 219-25.

Saintigny Y, Dumay A, Lambert S, Lopez BS (2001): A novel role for the Bcl-2 protein family: specific suppression of the RAD51 recombination pathway. *Embo J* 20 (10): 2596-607.

Sarkis AS, Dalbagni G, Cordon-Cardo C, Zhang ZF, Sheinfeld J, Fair WR, Herr HW, Reuter VE (1993): Nuclear overexpression of p53 protein in transitional cell bladder carcinoma: a marker for disease progression. *J Natl Cancer Inst* 85 (1): 53-9.

Schapers RF, Pauwels RP, Wijnen JT, Arends JW, Thunnissen FB, Coebergh JW, Smeets AW, Bosman FT (1994): A simplified grading method of transitional cell carcinoma of the urinary bladder: reproducibility, clinical significance and comparison with other prognostic parameters. *Br J Urol* 73 (6): 625-31.

Schmutte C, Tomblin G, Rhiem K, Sadoff MM, Schmutzler R, von Deimling A, Fishel R (1999): Characterization of the human Rad51 genomic locus and examination of tumors with 15q14-15 loss of heterozygosity (LOH). *Cancer Res* 59 (18): 4564-9.

Scully R, Chen J, Ochs RL, Keegan K, Hoekstra M, Feunteun J, Livingston DM (1997a): Dynamic changes of BRCA1 subnuclear location and phosphorylation state are initiated by DNA damage. *Cell* 90 (3): 425-35.

Scully R, Chen J, Plug A, Xiao Y, Weaver D, Feunteun J, Ashley T, Livingston DM (1997b): Association of BRCA1 with Rad51 in mitotic and meiotic cells. *Cell* 88 (2): 265-75.

Sengupta S, Harris CC (2005): p53: traffic cop at the crossroads of DNA repair and recombination. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6 (1): 44-55.

Sharan SK, Morimatsu M, Albrecht U, Lim DS, Regel E, Dinh C, Sands A, Eichele G, Hasty P, Bradley A (1997): Embryonic lethality and radiation hypersensitivity mediated by Rad51 in mice lacking Brca2. *Nature* 386 (6627): 804-10.

Shariat SF, Tokunaga H, Zhou J, Kim J, Ayala GE, Benedict WF, Lerner SP (2004): p53, p21, pRB, and p16 expression predict clinical outcome in cystectomy with bladder cancer. *J Clin Oncol* 22 (6): 1014-24.

Sherr CJ, Roberts JM (1999): CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes Dev* 13 (12): 1501-12.

Sidransky D, Von Eschenbach A, Tsai YC, Jones P, Summerhayes I, Marshall F, Paul M, Green P, Hamilton SR, Frost P, et al. (1991): Identification of p53 gene mutations in bladder cancers and urine samples. *Science* 252 (5006): 706-9.

Slupianek A, Schmutte C, Tomblin G, Nieborowska-Skorska M, Hoser G, Nowicki MO, Pierce AJ, Fishel R, Skorski T (2001): BCR/ABL regulates mammalian RecA homologs, resulting in drug resistance. *Mol Cell* 8 (4): 795-806.

Slupianek A, Hoser G, Majsterek I, Bronisz A, Malecki M, Blasiak J, Fishel R, Skorski T (2002): Fusion tyrosine kinases induce drug resistance by stimulation of homology-dependent recombination repair, prolongation of G(2)/M phase, and protection from apoptosis. *Mol Cell Biol* 22 (12): 4189-201.

Slupianek A, Gurdek E, Koptyra M, Nowicki MO, Siddiqui KM, Groden J, Skorski T (2005): BLM helicase is activated in BCR/ABL leukemia cells to modulate responses to cisplatin. *Oncogene* 24 (24): 3914-22.

Somasundaram K, Zhang H, Zeng YX, Houvras Y, Peng Y, Wu GS, Licht JD, Weber BL, El-Deiry WS (1997): Arrest of the cell cycle by the tumour-suppressor BRCA1 requires the CDK-inhibitor p21WAF1/CiP1. *Nature* 389 (6647): 187-90.

Sonoda E, Sasaki MS, Buerstedde JM, Bezzubova O, Shinohara A, Ogawa H, Takata M, Yamaguchi-Iwai Y, Takeda S (1998): Rad51-deficient vertebrate cells accumulate chromosomal breaks prior to cell death. *Embo J* 17 (2): 598-608.

Souchon R (2003): Das lokal begrenzte Harnblasenkarzinom - Wann ist ein interdisziplinärer Ansatz sinnvoll, erforderlich und "Standard"? *Kliniker* 32 (10): 328-332.

Stat.Bundesamt (2004): Gesundheitswesen, Todesursachen in Deutschland 2004. Fachserie 12/Reihe 4, Statistisches Bundesamt, Wiesbaden.

Stein JP, Ginsberg DA, Grossfeld GD, Chatterjee SJ, Esrig D, Dickinson MG, Groshen S, Taylor CR, Jones PA, Skinner DG, Cote RJ (1998a): Effect of p21WAF1/CIP1 expression on tumor progression in bladder cancer. *J Natl Cancer Inst* 90 (14): 1072-9.

Stein JP, Grossfeld GD, Ginsberg DA, Esrig D, Freeman JA, Figueroa AJ, Skinner DG, Cote RJ (1998b): Prognostic markers in bladder cancer: a contemporary review of the literature. *J Urol* 160 (3 Pt 1): 645-59.

Stonehill WH, Dmochowski RR, Patterson AL, Cox CE (1996): Risk factors for bladder tumors in spinal cord injury patients. *J Urol* 155 (4): 1248-50.

Sturzbecher HW, Donzelmann B, Henning W, Knippschild U, Buchhop S (1996): p53 is linked directly to homologous recombination processes via RAD51/RecA protein interaction. *Embo J* 15 (8): 1992-2002.

Suhr J, Goebell PJ, Schmid KW, Worm K, Rübber H, Otto T (2002): Mikroarrays in der Urologie. *Aktuel Urol* (33): 262-267.

Sung P (1997): Function of yeast Rad52 protein as a mediator between replication protein A and the Rad51 recombinase. *J Biol Chem* 272 (45): 28194-7.

Takahashi E, Matsuda Y, Hori T, Yasuda N, Tsuji S, Mori M, Yoshimura Y, Yamamoto A, Morita T, Matsushiro A (1994): Chromosome mapping of the human

(RECA) and mouse (Reca) homologs of the yeast RAD51 and Escherichia coli recA genes to human (15q15.1) and mouse (2F1) chromosomes by direct R-banding fluorescence in situ hybridization. *Genomics* 19 (2): 376-8.

Takahashi R, Hashimoto T, Xu HJ, Hu SX, Matsui T, Miki T, Bigo-Marshall H, Aaronson SA, Benedict WF (1991): The retinoblastoma gene functions as a growth and tumor suppressor in human bladder carcinoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88 (12): 5257-61.

Tan TL, Essers J, Citterio E, Swagemakers SM, de Wit J, Benson FE, Hoeijmakers JH, Kanaar R (1999): Mouse Rad54 affects DNA conformation and DNA-damage-induced Rad51 foci formation. *Curr Biol* 9 (6): 325-8.

Tashiro S, Kotomura N, Shinohara A, Tanaka K, Ueda K, Kamada N (1996): S phase specific formation of the human Rad51 protein nuclear foci in lymphocytes. *Oncogene* 12 (10): 2165-70.

Travis LB, Curtis RE, Glimelius B, Holowaty EJ, Van Leeuwen FE, Lynch CF, Hagenbeek A, Stovall M, Banks PM, Adami J, et al. (1995): Bladder and kidney cancer following cyclophosphamide therapy for non-Hodgkin's lymphoma. *J Natl Cancer Inst* 87 (7): 524-30.

Tsuzuki T, Fujii Y, Sakumi K, Tominaga Y, Nakao K, Sekiguchi M, Matsushiro A, Yoshimura Y, Morita T (1996): Targeted disruption of the Rad51 gene leads to lethality in embryonic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93 (13): 6236-40.

Tuttle TM, Williams GM, Marshall FF (1988): Evidence for cyclophosphamide-induced transitional cell carcinoma in a renal transplant patient. *J Urol* 140 (5): 1009-11.

Venkitaraman AR (2004): Tracing the network connecting BRCA and Fanconi anaemia proteins. *Nat Rev Cancer* 4 (4): 266-76.

Vineis P, Simonato L (1991): Proportion of lung and bladder cancers in males resulting from occupation: a systematic approach. *Arch Environ Health* 46 (1): 6-15.

Vispe S, Cazaux C, Lesca C, Defais M (1998): Overexpression of Rad51 protein stimulates homologous recombination and increases resistance of mammalian cells to ionizing radiation. *Nucleic Acids Res* 26 (12): 2859-64.

Vogelstein B, Civin CI, Preisinger AC, Krischer JP, Steuber P, Ravindranath Y, Weinstein H, Elfferich P, Bos J (1990): RAS gene mutations in childhood acute myeloid leukemia: a Pediatric Oncology Group study. *Genes Chromosomes Cancer* 2 (2): 159-62.

Waldman T, Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B (1996): Uncoupling of S phase and mitosis induced by anticancer agents in cells lacking p21. *Nature* 381 (6584): 713-6.

Wang WW, Spurdle AB, Kolachana P, Bove B, Modan B, Ebbers SM, Suthers G, Tucker MA, Kaufman DJ, Doody MM, Tarone RE, Daly M, Levavi H, Pierce H, Chetrit A, Yechezkel GH, Chenevix-Trench G, Offit K, Godwin AK, Struwing JP (2001): A single nucleotide polymorphism in the 5' untranslated region of RAD51 and risk of cancer among BRCA1/2 mutation carriers. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 10 (9): 955-60.

Wick W, Petersen I, Schmutzler RK, Wolfarth B, Lenartz D, Bierhoff E, Hummerich J, Muller DJ, Stangl AP, Schramm J, Wiestler OD, von Deimling A (1996): Evidence for a novel tumor suppressor gene on chromosome 15 associated with progression to a metastatic stage in breast cancer. *Oncogene* 12 (5): 973-8.

Williams SG, Stein JP (2004): Molecular pathways in bladder cancer. *Urol Res* 32 (6): 373-85.

Wolter C, Lupp P, Breul J, Fink U, Hanauske AR, Praeuer W, Sandler A, Wilhelm O, Neumeier D (1996): Humorale Tumormarker: Praxisorientierte Vorschlaege fuer ihren effizienten Einsatz. *Deutsches Aerzteblatt*. Vol. 93, pp. A-3346/B-2818/C-2616.

Yamamoto A, Taki T, Yagi H, Habu T, Yoshida K, Yoshimura Y, Yamamoto K, Matsushiro A, Nishimune Y, Morita T (1996): Cell cycle-dependent expression of the mouse Rad51 gene in proliferating cells. *Mol Gen Genet* 251 (1): 1-12.

Yang Q, Zhang R, Wang XW, Spillare EA, Linke SP, Subramanian D, Griffith JD, Li JL, Hickson ID, Shen JC, Loeb LA, Mazur SJ, Appella E, Brosh RM, Jr., Karmakar P, Bohr VA, Harris CC (2002): The processing of Holliday junctions by BLM and WRN helicases is regulated by p53. *J Biol Chem* 277 (35): 31980-7.

Yoshikawa K, Ogawa T, Baer R, Hemmi H, Honda K, Yamauchi A, Inamoto T, Ko K, Yazumi S, Motoda H, Kodama H, Noguchi S, Gazdar AF, Yamaoka Y, Takahashi R (2000): Abnormal expression of BRCA1 and BRCA1-interactive DNA-repair proteins in breast carcinomas. *Int J Cancer* 88 (1): 28-36.

Zhong Q, Chen CF, Li S, Chen Y, Wang CC, Xiao J, Chen PL, Sharp ZD, Lee WH (1999): Association of BRCA1 with the hRad50-hMre11-p95 complex and the DNA damage response. *Science* 285 (5428): 747-50.

Zink D, Mayr C, Janz C, Wiesmuller L (2002): Association of p53 and MSH2 with recombinative repair complexes during S phase. *Oncogene* 21 (31): 4788-800.

Parameter	Rezidivfreies Überleben			Univariate Analyse			pT1-progressionsfreies Überleben			pT2-progressionsfreies Überleben			Rezidivfreies Überleben			Multivariate Analyse			pT1-progressionsfreies Überleben			pT2-progressionsfreies Überleben		
	P	RR	95% KI	P	RR	95% KI	P	RR	95% KI	P	RR	95% KI	P	RR	95% KI	P	RR	95% KI	P	RR	95% KI	P	RR	95% KI
Alter*	.329	1.25	0.80-1.96	.040	1.04	1.00-1.08	.206	1.04	0.98-1.10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Geschlecht	.798	.093	0.54-1.62	.516	1.33	0.56-3.14	.244	2.08	0.61-7.18	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
„Grading“	.006	1.54	1.13-2.11	.000	4.24	2.33-7.74	.005	3.87	1.52-9.87	.014	1.59	1.10-2.29	.000	4.08	2.13-7.80	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Tumorgröße**	.222	0.75	0.47-1.19	.896	1.05	0.50-2.23	.696	1.26	0.40-3.97	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Tumorfokalität**	.329	1.25	0.80-1.96	.936	0.97	0.47-2.02	.331	0.55	0.17-1.84	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
p21 ^{Waf-1*}	.828	1.00	0.96-1.03	.696	1.01	0.96-1.07	.389	0.94	0.82-1.08	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ki67*	.710	1.00	0.98-1.02	.001	1.05	1.02-1.08	.034	1.05	1.00-1.10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Rad51 kontinuierlich	.002	1.05	1.02- 1.09	.000	1.11	1.06- 1.15	.000	1.12	1.06- 1.18	.008	1.06	1.01- 1.10	.001	1.09	1.04- 1.15	.002	1.10	1.04- 1.17
Rad51 kategorisiert	.005	1.63	1.16- 2.29	.000	4.16	2.22- 7.79	.001	6.19	2.04- 18.72	-	-	-	.001	4.13	1.73- 9.88	.002	8.42	2.24- 31.63

Tab. 9: Univariate und multivariate Cox-Regressionsanalyse von potentiellen Prognosefaktoren korreliert mit rezidivfreiem und pT1-progressionsfreiem und pT2-progressionsfreiem Überleben von 101 Harnblasenkarzinompatienten

* : Alter, p21^{Waf-1} und Ki67 wurden in kontinuierlicher Form verwendet

** : Tumorgröße und Tumorfokalität wurden in kategorisierter Form verwendet

8 Danksagung

Herrn Prof. Dr. H. W. Stürzbecher danke ich für die Vergabe des Dissertationsthemas und die stetige Betreuung über den gesamten Zeitraum der Studie. Besonders danke ich Herrn Dr. W. Henning, dessen fachkundiger Rat und stetige Unterstützung mir häufig weiterhelfen konnte. Herrn Prof. Dr. E. Schwinger und allen Mitarbeitern am Institut für Humangenetik danke ich für das stets gute und freundliche Arbeitsklima.

Desweiteren möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. A. C. Feller für die Überlassung der Gewebeproben, sowie bei Herrn Prof. Dr. H. H. Wolff und Herrn Prof. Dr. M. Tronnier für die Bereitstellung des Bildanalysemikroskops bedanken. Herrn Dr. S. Krüger danke ich für die fachkundige Betreuung von pathologischer Seite.

Herrn Dr. M. Schuler möchte ich für die Unterstützung bei der statistischen Auswertung danken.

Besondere Dankbarkeit empfinde ich gegenüber meiner Familie, George und Luke für ihre Geduld, meinen Eltern Edelgard und Hans-Dieter, meinen Großeltern Mariechen und Adam und meinem Bruder Frank für ihre vielfältige Unterstützung. Sie alle haben einen wesentlichen Anteil am Gelingen dieser Arbeit.

9 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Oidtmann
Vorname	Belinda Maria
Geburtsdatum/ -ort	10.09.1973 / Schweinfurt
Adresse	Frankensteinstraße 11, 97450 Arnstein

Ausbildung

1980-1984	Grundschule Arnstein
1984-1993	Johann-Schöner-Gymnasium Karlstadt
1993-1995	Ausbildung zur Arzthelferin, Universitätsklinik Würzburg
Oktober 1995 - September 1998	Medizinstudium, Universität Würzburg
Oktober 1998 - August 1999	Medizinstudium, Universität zu Lübeck
September 1999 - Juli 2000	Medizinstudium, Universidad de Barcelona
August 2000 – September 2001	Medizinstudium, Universität zu Lübeck
Oktober 2000 – Dezember 2001	Experimenteller Teil der Dissertation
Januar 2002 – März 2003	PJ Spital Wattwil, Schweiz PJ Universität Toronto, Kanada PJ Universität Buenos Aires, Argentinien PJ Universidad de La Laguna, Spanien
Oktober 2003	3. Staatsexamen
Oktober 2003 – heute	Erziehungszeit