

2. Einleitung

2.1. Epidemiologie und Symptomatik des Harnblasenkarzinoms

Jährlich steigt in den Industrieländern die Anzahl an Neuerkrankungen und Todesfällen durch ein Harnblasenkarzinom. Das Urothelkarzinom der Harnblase ist bei Männern das vierthäufigste und bei Frauen das achthäufigste Malignom in der westlichen Welt. Die American Cancer Society veröffentlichte Prognosen für das Harnblasenkarzinom mit schätzungsweise 102.740 Neuerkrankungen (70.940 Männer und 31.800 Frauen) sowie 26.670 Todesfällen (17.530 Männer und 9.140 Frauen) in den USA im Jahre 2006 [1]. Damit ist das Harnblasenkarzinom eines der Hauptursachen für tumorassoziierte Mortalität und Morbidität in den Industrieländern. Therapie- und Präventionsmöglichkeiten für diese Tumorentität sind von großem medizinischem und volkswirtschaftlichem Interesse. Das Urothelkarzinom ist der häufigste Harnblasentumor und nimmt einen Anteil von ca. 95% aller Harnblasentumoren ein [2]. Etwa 80% der Urothelkarzinome treten superfiziell papillär auf und besitzen eine hohe Rezidivrate von ca. 70% [3]. Darüber hinaus haben die Tumorrezidive häufig ein höheres malignes Potential, welches sich in zunehmender Invasivität und schlechterem Tumorgrading widerspiegelt. Bei 15% aller Patienten mit einem papillären Urothelkarzinom ist mit einer Progression zu einem niedrig differenzierten Karzinom mit hoher Mortalität zu rechnen [4,5]. Von den papillären Urothelkarzinomen werden solide und primär invasiv wachsende Urothelkarzinome abgegrenzt, die oftmals erst im fortgeschrittenen Stadium erkannt werden und häufig aus einem Carcinoma in situ (Cis) urothelialer Schleimhaut hervorgehen. Die Hauptsymptome des Urothelkarzinoms sind Hämaturie und/ oder Dysurie; aber bereits etwa die Hälfte der gering bis mäßig differenzierten Karzinome sind zu diesem Zeitpunkt der Diagnose bereits metastasiert [6]. In einer neuen Klassifikation von 2004 berücksichtigt die WHO zur Einteilung von Harnblasenkarzinomen nicht mehr nur das biologisch-morphologische Verhalten der Tumore, sondern jetzt auch zytogenetische und

molekularbiologische Aspekte zur besseren Prognose- und Risikoeinschätzung [7].

Eine Gewebeentnahme durch transurethrale Tumorsektion oder Biopsie mit Zytologiegewinnung ist immer noch die beste diagnostische Methode mit der höchsten Sensitivität und Spezifität von jeweils über 90%. Die alleinige Zytologie ist eine nicht-invasive Methode mit nur geringer Sensitivität von ca. 30% bei gut differenzierten Harnblasenkarzinomen. Deshalb ist der Fokus derzeit auf die Suche, nicht-invasive Vorgehen zu finden, gerichtet, wie durch Nutzung von Urin [8,9] oder Blut [10-12], die zur früheren Tumordetektion bzw. zur Tumorverlaufsbeurteilung mit ebenso hoher Sensitivität und Spezifität [2,13] geeignet sind. Die Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) ist zum gegenwärtigen Zeitpunkt ein viel versprechender Urintest, bei dem Chromosomenabnormalitäten bei Patienten mit Harnblasenkarzinom mit Sensitivitäten von über 80% und Spezifitäten bis zu 96% detektiert werden können [14,15]. Eine Zeit- und Kosten-effiziente Umsetzung zur Nutzung neuer Urinmarker im klinischen Alltag bleibt abzuwarten.

2.2. Intra- und interzelluläre stromal-epitheliale Wechselwirkungen

Stromal-epitheliale Wechselwirkungen in einem Organ bestimmen Wachstums-, Differenzierungs- und Alterungsprozesse. *In vitro* und *in vivo* wurden Signalübertragungen durch sezernierte Substanzen zwischen beiden Zelltypen beschrieben, die gegenseitig den Phänotyp verändern [16,17]. Wir konnten *in vitro* in Co-Zellkulturen eine Stimulation von Urothelzellen durch lösliche, sezernierte Substanzen der Fibroblasten nachweisen [18].

Eine Bedingung für die Tumorinvasion ist die Degradation der Basalmembran und extrazellulären Matrix (ECM). Verschiedene Proteasen, beispielsweise Metalloproteinasen, Cathepsine, Urokinasen, gehören zur Gruppe der ECM katabolisierenden Enzyme. Die Balance zwischen den vom Gewebe sezernierten Proteasen und den spezifischen Inhibitoren spielen eine wichtige

Rolle im Erhalt der Homöostase von normalen Gewebeverbänden [10]. Ein Ungleichgewicht führt zur Tumorentstehung und –invasion [19,20].

Die bisherige Karzinomforschung stellte Untersuchungen der epithelialen Tumorkomponente in den Vordergrund [21-23]. Die Veränderungen des Stromas in einem Tumor wurden zwar beobachtet, jedoch als Reaktion auf das maligne Epithel gewertet. Erst mit der Möglichkeit, durch in-situ Methoden die epithelial-stromale Interaktion in Tumoren molekular zu untersuchen, rückte das Tumorstroma mit seinen verschiedenen Komponenten, wie beispielsweise Makrophagen [24], verstärkt in den Vordergrund der Forschung [25-31]. Die Bedeutung des unmittelbaren Zell-Zellkontaktes auf die gegenseitige Stimulation und Beeinflussung des Phänotyps der Zellen wurde in der Literatur an 4 Modellen beschrieben:

- (1) an Stroma/Epithel-Co-Kulturen *in vitro* [18,32];
- (2) durch konditionierte Medien [33];
- (3) Filterexperimente [34-36] und
- (4) Zellrekombination *in vivo* [37-40].

Humane Fibroblasten stimulieren Urothelzellen in Co-Kultivierungsexperimenten *in vitro* zur Proliferation. Dabei sezernieren Fibroblasten des Stromas lösliche Faktoren, wie z.B. Wachstumsfaktoren, ins Medium. Die Zugabe dieses konditionierten Mediums zu den Urothelzellen bewirkte ein statistisch signifikantes erhöhtes Wachstum der Urothelzellen. Der Einsatz von konditionierten Medien [18] oder von Filterexperimenten ist auf lösliche Faktoren, die ins Medium sezerniert werden, beschränkt. Durch Filterexperimente konnte nachgewiesen werden, dass die Differenzierung des Blasenstromas auch von löslichen Faktoren des Urothels abhängig ist [36]. Der Einfluss von unlöslichen Sezernierungsfaktoren auf Proliferation und Differenzierung sowie die räumliche Ausbreitung der Zellen kann allerdings nur durch einen direkten Zell-Zellkontakt, wie in Co-Kulturen oder *in vivo* durch Geweberekombinationen, untersucht werden. Der genaue Wirkungsmechanismus und die Zusammensetzung dieser

wachstumsstimulierenden Faktoren sowie einzelne Eigenschaften von möglichen unlöslichen Faktoren sind bisher nicht hinreichend bekannt [18].

Die Methode der Zell- und Geweberekombination erlaubt, dass Stroma- und Epithelzellen in unmittelbarem Kontakt unter *in vivo*-Bedingungen interagieren (siehe Kapitel 3.1.). In diesem Modell können Stroma- und Epithelzellen unterschiedlicher Dignität miteinander rekombiniert werden [37]. Der Zellrekombination wird *in vivo* ein dreidimensionales Wachstum ermöglicht. Es können mit diesem Modell Entwicklung, Differenzierung und krankheitsbezogene Wechselwirkungen *in vivo* simuliert werden [41]. Auf die Harnblase wurde das Modell der Zellrekombination und Implantation unter die Nierenkapsel bisher mit kinderurologischem Forschungsschwerpunkt zur Untersuchung mesenchymal-epithelialer Wechselwirkungen bei der Entwicklung der glatten Muskulatur der Harnblase angewendet [16,42].

2.3. Bedeutung von Proteasen auf die Karzinogenese und Tumorinvasion des Harnblasenkarzinoms

Die Karzinogenese verschiedener Tumorentitäten wird durch die Sekretion proteolytischer Enzyme gefördert. Der Plasminogenaktivator vom Urokinase-Typ (uPA) sowie Cathepsine sind proteolytische Enzyme, die eine Tumorzellinvasion in das umliegende Gewebe fördern und eine aktive Rolle während der Karzinogenese des Harnblasenkarzinoms spielen. Ein Ungleichgewicht zwischen der relativen Aktivität proteolytischer Enzyme und ihrer Inhibitoren steht mit der Tumorprogression in Zusammenhang [43,44].

Der Plasminogenaktivator vom Urokinase-Typ ist eine tumorassoziierte Serinprotease, die an der Blutkoagelauflösung beteiligt ist und zum Erhalt der Gewebeplastizität dient. Plasmin nimmt eine Mediatorrolle unter physiologischen und pathophysiologischen Bedingungen bei perizellulärer Proteolyse während der Zellmigration und des Gewebeumbaus ein [45]. Von Tumorzellen und Stromazellen wird uPA als enzymatisch inaktives Pro-Enzym (Pro-uPA) sezerniert. Nach Rezeptorbindung (uPAR) wird Pro-uPA durch Plasmin, Trypsin,

Plasma-Kallikrein, Cathepsin B oder L aktiviert. Das aktive, rezeptorgebundene uPA katalysiert Plasminogen in Plasmin. Plasmin baut Bestandteile des Tumorstromas um, wie z.B. Fibrin, Fibronectin, Proteoglykane, Laminin [46]. Plasmin ist weiterhin in der Lage, die Pro-Kollagenase Typ IV zu aktivieren, die am Abbau von Kollagen IV, dem Hauptbestandteil der Basalmembran, beteiligt ist. Verschiedene Studien haben eine Korrelation zwischen der Expression von uPA und uPAR im Tumorgewebe und der Tumorprognose belegt [19,47,48]. uPA und uPAR sind unmittelbar an Zellmigration, Zellinvasion und am Gewebeumbau beteiligt [49-51]. Im Tumorgewebe der Brust, der Ovarien, der Prostata, der Cervix uteri, der Lunge, des Gastrointestinaltraktes, der Harnblase [45] sowie der Nieren [52] wurde eine erhöhte uPA-Konzentration festgestellt. Beim Urothelkarzinom der Harnblase sind uPA und uPAR hochreguliert [53] und direkt mit der Zellinvasion und Metastasierung beim Harnblasenkarzinom assoziiert. Bisher finden sich in der Literatur nur wenige Studien, die die Bedeutung von uPA und uPAR als Prognosefaktor beim Harnblasenkarzinom untersucht haben [54]. Nach meiner Kenntnis existiert in der Literatur bisher nur eine *in vivo* Studie am Mausmodell zur Untersuchung pulmonaler Metastasierung nach Injektion einer entdifferenzierten Urothelkarzinomzelllinie T24T [55]. Es zeigte sich eine Hochregulation der uPA-Genexpression. Diese Beobachtung bestätigte sich auch im weiteren Verlauf dieser Studie bei Patienten mit pulmonal metastasiertem Urothelkarzinom. uPA war in Abhängigkeit vom Tumorstadium hochreguliert. Weiterführende Studien sind notwendig, um uPA und uPAR als Prognoseparameter beim Harnblasenkarzinom besser beurteilen zu können. Wir stellen ferner die Hypothese auf, dass eine Verschiebung in der uPA- und uPAR-Expression zwischen Stroma und Urothel mit Zunahme der Entdifferenzierung stattfindet. Eine weiterführende Aufklärung dieser Expressionsunterschiede zwischen verschiedenen Gewebekomponenten könnte dazu beitragen, neue therapeutische Ansätze bei der Behandlung des Harnblasenkarzinoms zu entwickeln.

Cathepsine B, H und L sind Cysteinproteasen, die im Sinne einer Kaskade wiederum andere proteolytische Enzyme aktivieren und Komponenten der

extrazellulären Matrix und der Basalmembran über eine Aktivierung von Kollagenase IV zersetzen [56]. Der genaue molekularbiologische Mechanismus dieser Kaskade ist noch nicht vollständig geklärt. In verschiedenen Tumoren wurde eine erhöhte Expression der Cathepsine nachgewiesen. Budihna *et al.* [57] haben bei Plattenepithelkarzinomen im Hals-, Nackenbereich signifikant erhöhte Cathepsin B und L Konzentrationen im Vergleich zum normalen Gewebe gefunden. Erhöhte Cathepsin H-Expressionen wurden beim Adenokarzinom des Colons [58] und auch in Primärzellkulturen beim Prostatakarzinom festgestellt [59]. Die Rolle einiger Cathepsine als potentielle Tumormarker im Gewebe [60,61], im Blut [62] oder im Urin [8,63] werden in der Literatur, auch durch eigene Publikationen vertreten, diskutiert. Bisher existiert noch kein praktikabler und ökonomisch vertretbarer Ansatz für die klinische Umsetzung.

Ioachim *et al.* [64] betrachteten Expressionsunterschiede zwischen Stroma und Urothel. In ihrer immunhistochemischen Untersuchung zur Expression von Cathepsin D wurde eine erhöhte Expression im Tumorstroma, die signifikant mit dem Tumorgrad und dem Stadium korrelierte, festgestellt. Weiterhin wurde eine umgekehrt proportionale Expression von Cathepsin D im Tumorstroma gegenüber der Expression im malignen Urothel beschrieben. Daraus kann man schließen, dass maligne Urothelzellen und Stromazellen eine bedeutende Rolle in der Expansion der Urothelkarzioms der Harnblase einnehmen. Weiterführende Untersuchungen wurden bisher hierzu nicht in der Literatur beschrieben. Die Bedeutung der Cathepsine auf die Tumorentstehung, Tumorprogression und Metastasierung des Harnblasenkarzinoms wird durch vielfältige Arbeiten *in vitro* bestätigt. Bisher existieren allerdings keine *in vivo* Studien, die eine klinische Signifikanz aufzeigen.

2.4. Genetische Veränderungen beim Harnblasenkarzinom

Die Entwicklung und Progression des Harnblasenkarzinoms ist eine schrittweise Abfolge multifaktorieller molekularbiologischer Veränderungen. Genetische Alterationen in pTa Tumoren unterscheiden sich von pT1 und

muskel-invasiven pT2 Harnblasentumoren [65-67]. Die Anzahl dieser genetischen Veränderungen ist in muskel-invasiven Tumoren signifikant erhöht [2]. Potentielle Kandidaten-Gene sind u.a.:

- Tumorsuppressor-Gene (z.B. p53, Retinoblastom-Gen) [68-70];
- Onkogene (z.B. ras, erbB-2, c-myc, c-jun, wnt) [70,71];
- Zellzyklus-Gene (z.B. Cycline, p15, p16) [72,73];
- Transkriptionsfaktoren (z.B. p63) [74];
- Wachstumsfaktoren (z.B. VEGF, IGF-I, IGF-II, EGF-Familie, FGF-Familie) [75];
- Zelladhäsionsmoleküle (z.B. E-Cadherin, Integrin) [76,77];
- Extrazelluläre Matrixmoleküle (z.B. MMP2, MMP9, ADAMs-/ADAMTs-Familie) [78-80].

Bisher wurden einzelne Gene und Chromosomen beschrieben, die den Genotyp der Harnblase und des Harnblasenkarzinoms charakterisieren. Wenig ist zu Wechselwirkungen zwischen Epithel und Stroma während der Tumorgenese des Harnblasenkarzinoms bekannt sowie zu möglichen Auswirkungen auf den Genotyp.

Nur auf einige Vertreter der großen Gruppe der Zelladhäsionsmoleküle und extrazellulären Matrixmoleküle kann an dieser Stelle eingegangen werden. Bei diesem multifaktoriellen Prozess der Tumordinvasion nimmt die Proteolyse durch Proteinasen eine wichtige Rolle ein. In einer eigenen Arbeit wurde gezeigt, dass die Proteasen Cathepsin B, H und L im Urin bei Patienten mit einem diagnostizierten Harnblasenkarzinom statistisch signifikant erhöht sind [63]. Im Gewebe wurden speziell beim fortgeschrittenen Harnblasenkarzinom die Gelatin-bindenden Metalloproteinasen, MMP2 und MMP9, erhöht vorgefunden. Es wurde in verschiedenen Studien gezeigt, dass zwischen dem Grad der Expression von MMP2 und MMP9 eine Korrelation zwischen Tumorstadium, -grad und Prognose besteht [12,81]. Die Gewebeinhibitoren der Metalloproteinasen, TIMP1 und TIMP2, hemmen aktivierte MMPs. Die Bedeutung verschiedener Gene auf die Tumorgenese und -progression des Urothelkarzinoms ist in der Literatur belegt. Bis dato existiert allerdings noch kein Marker, der klinisch sinnvolle Ableitungen

zur Prognose eines Harnblasenkarzinoms treffen kann bzw. interessant für weiterführende Untersuchungen zur möglichen Gentherapie wäre. Durch die DNA-Mikroarray-Technologie können effizient und umfangreich differentiell exprimierte Gene ermittelt werden, die eine Aufklärung bei der Frage nach der Tumorentstehung des Urothelkarzinoms erbringen. Zukünftig muß untersucht werden, welche genetischen Veränderungen bei der Umwandlung von normalem zum malignem Urothel auftreten. Ebenso muß der Einfluss des angrenzenden Stromas auf Expressionsveränderungen im Urothel während der Karzinogenese untersucht werden.