

## Tumormarker beim Blasentumor: Aussichten für den klinischen Alltag

### Tumor markers for bladder cancer: outlook for routine use

Thorsten H. Ecke<sup>1,2,\*</sup>

<sup>1</sup> HELIOS Klinikum Bad Saarow, Bad Saarow, Deutschland

<sup>2</sup> European Group on Tumour Marker (EGTM)

**Keywords:** bladder cancer; tumor marker; urothelial cell carcinoma.

#### Zusammenfassung

In diesem Artikel wird die aktuelle Rolle der Tumormarker beim Harnblasentumor in Diagnostik und Therapie vorgestellt. Die derzeit wichtigsten und interessantesten Tumormarker werden besonders hervorgehoben und ihr Einsatz für den klinischen Alltag diskutiert. Eine Medline-basierte Literaturrecherche wurde auf diesem Gebiet durchgeführt. Weitere Entwicklungen von Tumormarkern bei Rezidivtumoren und progressiven Krankheitsverläufen werden es in Zukunft möglich machen, Therapieoptionen für den einzelnen Patienten zu entwickeln. Molekulares Staging urologischer Tumoren kann Fälle selektieren, die von systemischen Therapien am besten profitieren. Es ist notwendig und wichtig, Grundlagenforschung und klinische Studien unter denselben Gesichtspunkten zu vereinen.

**Schlüsselwörter:** Blasentumor; Tumormarker; Urothelkarzinom.

#### Abstract

This article outlines the role of bladder cancer tumor markers in diagnosis and therapy with a particular focus on the most important biomarkers. A MEDLINE based literature search was performed to examine the field of bladder cancer markers. Further determination of recurrence and progression markers will contribute to establish better treatments for the individual patient. Molecular staging of urological tumors will allow selecting cases that will require systemic treatment. Therapeutically, knowledge of cancer progression pathways allows for drug therapies against specific tumor targets. It is necessary and important to integrate under the same objectives basic translational and clinical research.

#### Einleitung

Nach der Statistik der deutschen Krebsgesellschaft ist das Harnblasenkarzinom, bezogen auf die Neuerkrankungsrate, der vierthäufigste bösartige Tumor des Mannes und der sechsthäufigste der Frau. Im Jahre 2006 sind in Europa 82,800 Männer und 27,100 Frauen an einem Urothelkarzinom der Harnblase neu erkrankt [1]. Die Inzidenz des Harnblasenkarzinoms hat in den letzten Jahrzehnten stetig zugenommen. Die häufigste maligne Entartung des Harnblasenkarzinoms ist das histologisch als Urothelkarzinom klassifizierte, wohingegen es nur wenige Adenokarzinome, Plattenepithelkarzinome oder andere histologische Typen gibt [2].

Das Harnblasenkarzinom hat eine hohe Rezidivrate, einige der nicht-invasiven Tumoren verhalten sich jedoch progressiv und werden muskelinvasiv. Das klinische Erscheinungsbild der Erkrankung und molekulare Studien suggerieren, dass es zwei Wege der Karzinogenese gibt: den pTa pathway und den CIS pathway [3]. pTa-Tumoren, die häufigste Form des Harnblasenkarzinoms, sind meistens vom Low-grade-Typ und rezidivieren oft, ihr Progress durch die Lamina propria ist jedoch eher selten. Invasive Tumoren (pT1) und muskel-invasive Tumoren (pT2-T4) sowie das Carcinoma in situ (CIS) sind praktisch immer High-grade Tumoren. Wegen dieser Heterogenität des Tumors sind auch neue Marker in Hinblick auf den Tumorprogress als klinische Parameter wichtig, die mehr als nur Grade- und Stage-Hinweise auf das klinische Verhalten des Tumors geben und bei der Auswahl der Therapie helfen können, besonders bei High-risk Tumoren [4–11].

Das Harnblasenkarzinom ist auch ökonomisch bedeutsam, da es von allen bösartigen Tumorerkrankungen die höchsten Kosten pro Patient und insgesamt von allen Tumorentitäten die fünfthöchsten Kosten verursacht [10–12]. Auch aus diesem Grunde sind Tumormarker für das Harnblasenkarzinom in Zukunft erforderlich, um Kosten und die Anzahl schmerzhafter Untersuchungen wie Zystoskopien zu reduzieren. Weiterhin ist es wichtig, Risikogruppen zu definieren, um im Voraus zu wissen, welche Behandlung die beste für den individuellen Patienten darstellt.

\*Korrespondenz: Dr. med. Thorsten H. Ecke, HELIOS Klinikum Bad Saarow, Klinik für Urologie, Pieskower Straße 33, 15526 Bad Saarow, Deutschland  
Tel.: +49-33631-72162  
Fax: +49-33631-73136  
E-Mail: tho\_ecke@hotmail.com, thorsten.ecke@helios-kliniken.de

Es scheint, dass urinbasierte Assays einen Blasen-tumor besser detektieren könnten, weil die Erkrankung schließlich ständig im Kontakt mit Urin ist. Es ist anzunehmen, dass sich auch dauerhaft maligne Zellen im Urin befinden. Zu Beginn zeigt Tabelle 1 einen Überblick einiger Gruppen von Tumormarkern für das Harnblasenkarzinom; in Tabelle 2 wird auf die Charakteristik einzelner Marker eingegangen. Dieser Überblick erhebt natürlich keinen Anspruch auf Vollständigkeit.

Das Monitoring von Patienten mit nicht-muskelinvasivem Harnblasenkarzinom ist aufgrund der relevanten Rezidivrate und Progressionsgefahr notwendig. Insofern scheint der Einsatz von Urintests zum Nachweis oder Ausschluss eines Tumorzidivs prinzipiell attraktiv. Die klassische Diagnose Harnblasenkarzinom und auch die Nachsorge basieren auf Urinzytologie, Zystoskopie und histologischer Befund-sicherung. Der Anspruch neuer Marker auf diesem Gebiet besteht unter anderem darin, die bisherige Strategie der Nachsorge zu modifizieren bzw. zu vereinfachen. Insbesondere Aufwand, Patientenbelastung und Kosten der Zystoskopie im Rahmen der Tumornachsorge sind potentielle Argumente für den Einsatz von Urintests.

Es gibt inzwischen mehrere über die traditionellen Untersuchungen wie Zystoskopie, Zytologie, Sonographie, Häma-

turie-Streifentest hinausgehende urinbasierte Verfahren zur Detektion einer Neoplasie im Harntrakt. Einige dieser Methoden sind der konventionellen Urinzytologie in der Spezifität und vor allem in der Sensitivität überlegen und können so im Screening einen wichtigen Stellenwert haben [13]. Man unterscheidet dabei zellgebundene und urinlösliche Marker. Die gängigen Publikationen nennen zur Bewertung des klinischen Nutzens regelhaft die Spezifität und Sensitivität der Verfahren. Nur hohe Prozentzahlen beider Werte machen ein Verfahren für den klinischen Alltag interessant, ein isoliert hoher Prozentwert für Spezifität oder Sensitivität allein sagt über die klinische Wertigkeit wenig aus.

### Über den Wert des ältesten urinlöslichen Markers – die Hämaturie

Der älteste und nach wie vor bekannteste urinlösliche Marker für Blasen-tumoren ist der Nachweis von Blut im Urin (Hämaturie). Etwa 85% der Patienten mit Blasen-tumoren und rund 40% mit Nierentumoren haben entweder Mikro- oder Makrohämaturie [14]. Per definitionem der American Urological Association (AUA) besteht eine mikroskopische

**Tabelle 1** Überblick – Blasen-tumor-Marker.

|  |   |
|--|---|
| Apoptosemarker                                       | Pro-apoptosemarker (Bax, PUMA, Bad, Fas), Anti-apoptosemarker (Bcl-2, Bcl-X, <b>SURVIVIN</b> , LIVIN) |
| Wachstumsfaktoren und Angiogeneseinhibitoren         | VEGF, FGF, EGF, TGF-alpha, TGF-beta, <b>FGFR3</b> , TSP-1   |
| Adhäsive Marker                                      | E-Cadherin, Catenin, Integrin, ICAM, CD44   |
| Proteolytische Enzyme und Basalmembran-Abbauprodukte | MMP, TIMP, u-PA, u-PAR, Cathepsin, Laminin-P1   |
| Onkogene   | Ras, c-Myc, EGFR-HER1, <b>HER2/neu</b>  |
| Angiogenesemarker                                    | COX-2 (Cyclooxygenase-2)  |
| Tumorsuppressor-Gene                                 | <b>TP53</b> , p27, p21, p16, RB   |
| Zytokine   | IL-2, IL-8  |
| Proliferationsantigene                               | Ki-67   |
| Tumor-assoziierte Antigene                           | <b>TPA</b> , <b>NMP22</b> , T138, 19A211, LDQ19, M344, BTA  |
| Zytokeratine   | <b>CK-8</b> , <b>CK-18</b> , <b>CK-19</b> , <b>CK-20</b> , <b>CYFRA 21-1</b>                          |

Fett gedruckt: in diesem Artikel diskutierte Tumormarker.

**Tabelle 2** Charakteristik der Blasen-tumormarker.

| Marker                         | Antigen Typ  | Sensitivität, % | Spezifität, % | Methode      |
|--------------------------------|--------------|-----------------|---------------|--------------|
| Zytologie                      | Zellgebunden | 19–70           | 73–100        |              |
| Hämaturie                      | Löslich      | 47–74           | 68–100        | Streifentest |
| BTA-stat                       | Löslich      | 51–90           | 54–93         |              |
| BTA-TRAK                       | Löslich      | 58–66           | 62–79         | ELISA        |
| NMP22                          | Löslich      | 45–92           | 54–91         | EIA          |
| BLCA-4                         | Löslich      | 89–96           | 95–100        |              |
| FISH (UroVysion <sup>®</sup> ) | Zellgebunden | 69–87           | 89–96         |              |
| TPA                            | Löslich      | 16–80.2         | 73–100        | ECLIA        |
| u-PAR                          | Löslich      | 80              | 70            |              |
| HER-2/neu                      | Löslich      | 89              | 63            |              |
| CYFRA 21-1                     | Löslich      | 65–99           | 57–88         | ECLIA        |
| Hyaluronsäure/Hyaluronidase    | Löslich      | 83–94           | 77–93         |              |
| Survivin                       | Löslich      | 64–94           | 93–100        |              |
| ImmunoCyt                      | Zellgebunden | 39–100          | 73–84         |              |
| UBC (Zytokeratine 8 und 18)    | Löslich      | 40–81           | 72–97         |              |

Hämaturie bei mehr als drei roten Blutkörperchen pro Gesichtsfeld in zwei von drei Untersuchungen [15].

Die Sensitivität reicht in der Literatur von 47% bis 74% [16, 17]. Ein Grund dafür mag darin liegen, dass Hämaturie oft intermittierend auftritt und demnach Wiederholungen der Untersuchung erforderlich sind, um eine höhere Sensitivität zu erreichen. Hämaturie kann auch durch Infektionen und Steinleiden verursacht sein [16–21].

Zusammenfassend ist die Hämaturie trotz allem der First-line-Marker bei der Detektion von Blasen-tumoren. Eine Kombination von sich wiederholenden Messungen einer Hämaturie und Markern mit einer hohen Spezifität kann ein gutes Hilfsmittel sein [22].

Neben der Hämaturie stellt die Zytologie den zweiten „alten“ nichtinvasiven Standardmarker für das Harnblasenkarzinom dar. Die Sensitivität für G1-Tumoren liegt unter 30%, für G2-Tumoren liegt sie bei etwa 60% und für G3-Tumoren bei etwa 90%. Die Spezifität liegt bei etwa 90–95%. Urintests müssen sich gegen diese Ergebnisse der Urinzytologie behaupten.

Tatsächlich wurden in den meisten Studien die jeweiligen Urintests mit der Urinzytologie verglichen. Beispielhaft wurde in einer prospektiven Studie die Wertigkeit der Immunzytologie bei Patienten mit Hämaturie untersucht [23]. Zu diesem Zweck wurden 301 konsekutive Patienten mit Hämaturie und ohne Tumorgeschichte mittels eines kommerziell erhältlichen Urintests untersucht. Bei 10 von 228 Patienten (4,6%) mit Mikro-hämaturie und 17 von 66 Patienten (27%) mit Makro-hämaturie zeigte sich ein Harnblasenkarzinom. Bei Patienten mit Mikro-hämaturie und Harnblasenkarzinom lagen Sensitivität und Spezifität der Urinzytologie bei 40% und 97% und der Immunzytologie bei 80% und 89%. Die alleinige Zystoskopie erreichte 80% und 99%. Eine Kombination der genannten Untersuchungen, vermochte die Sensitivität bei gleichbleibender Spezifität zu erhöhen. Bei Patienten mit Makro-hämaturie und einem Harnblasenkarzinom lagen Sensitivität und Spezifität der Urinzytologie bei 47% und 91% und der Immunzytologie bei 88% und 80%. Die alleinige Zystoskopie erreichte 87% und 96%. Eine Kombination der genannten Untersuchungen, vermochte wiederum die Sensitivität bei gleichbleibender Spezifität zu erhöhen.

### **Aufwändiges Testverfahren, gute Ergebnisse – Fluorescence in situ hybridisation (FISH) – UroVysion®**

Chromosomale Veränderungen der Urothelzellen werden mit fluoreszenzmarkierten DNS-Sonden markiert und dann mikroskopisch ausgezählt. Der kommerziell verfügbare UroVysion® Bladder Cancer Kit (Vysis Inc., Downers Grove, IL, USA) kombiniert 4 DNS-Sonden: Chromosom 3, 7 und 17, sowie 9p21 [24]. Die Kriterien zur Detektion eines Blasen-tumors mit Hilfe des UroVysion®-Tests wurden wie folgt definiert:  $\geq 5$  Zellen mit einer Zunahme von  $\geq 2$  Chromosomen,  $\geq 10$  Zellen mit einer Zunahme von einem Chromosom

oder  $\geq 20$  Zellen mit einem „loss of 9p21 locus“. Der Test ist von der FDA als Diagnostik und Überwachung zugelassen und kostet etwa \$475 bis 700 pro Untersuchung [25].

In verschiedenen Studien wurde die Sensitivität von UroVysion® mit Werten zwischen 69% und 87% angegeben [26–29]. Der Test hat eine sehr hohe Sensitivität, um Carcinoma-in-situ und High-grade Tumoren zu detektieren (83% bis 100%). Es ist interessant, dass FISH-Analysen hilfreich sein können, Tumoren zu finden, die in der Zystoskopie nicht gesehen wurden. Eine Studie konnte zeigen, dass 89% der Patienten mit einer negativen Biopsie der Harnblase, einer atypischen Zytologie und einem positiven FISH Ergebnis innerhalb von 12 Monaten ein histologisch gesichertes Harnblasenkarzinom entwickelten [30].

Zusammenfassend handelt es sich um einen vielversprechenden Test zur Detektion von High-grade Tumoren der Harnblase. Weiterhin scheint das Potential zur Rezidiv- und Progressionsvorhersage innerhalb von 6 bis 12 Monaten möglich zu sein. FISH sollte ausgewählten klinischen Situationen vorbehalten sein. Der Gebrauch im klinischen Alltag ist nach wie vor gering wegen der hohen Kosten und dem hohen Arbeitsaufwand.

### **Möglicher Marker in der Zukunft mit hervorragenden Ergebnissen – der Apoptosemarker Survivin**

Survivin ist ein unlösliches Apoptose-Inhibitor-Protein und kann mittels polyklonalem Antikörper nachgewiesen werden. Es wird von vielen Tumoren exprimiert [31]. Survivin kann im Urin und in Blasen-tumorgewebe gemessen werden, aber nicht im normalen Urothel. In den Studienergebnissen einer Gruppe von Watson konnten eine hohe Sensitivität (94%) und Spezifität (95%) bestimmt werden; dabei wurde Survivin mRNA im Urinsediment mittels RT-PCR gemessen [32].

Survivin ist mit 16,5 kDa das bislang kleinste identifizierte antiapoptotische Protein aus der Gruppe der „inhibitor of apoptosis proteins“. Survivin initiiert ferner die Zellproliferation und Angiogenese. Die Expression von Survivin ist mit einer schlechten Prognose und einer Resistenz gegenüber Radio- und Chemotherapie assoziiert.

Die Survivin-mRNA wurde in 118 Urinproben von Patienten mit anamnestisch bekanntem oder manifestiertem Blasenkarzinom untersucht [33]. Die Bestimmung erfolgte mittels PCR und erbrachte eine Sensitivität und Spezifität von 79% und 93% bezogen auf alle Patienten, 83% und 95% für neudiagnostizierte Karzinome sowie 82% und 90% für Karzinomrezidive.

Survivin wurde als der vielversprechendste Marker identifiziert, um bei Patienten mit primärem Ta-Urothelkarzinom der Harnblase zwischen einem langen oder kurzen rezidivfreien Intervall zu unterscheiden [34].

Aufgrund dieser und einiger anderer Daten hat Survivin mit solch hohen Sensitivitäten und Spezifitäten ein großes Potential, nach Testung an größeren Kollektiven einen hohen Stellenwert einzunehmen [35]. Zusammenfassend kann Survivin mRNA-Expression helfen bei der individuellen The-

rapie von Patienten und in Subgruppen auf unnötige Zystoskopien zu verzichten.

Immunhistochemische Untersuchungen wurden zur Expression von Survivin an 222 Blasen tumoren durchgeführt [36]. Bei 64% bzw. 94% der Blasen tumorproben bzw. positiven Lymphknoten fand sich eine Expression von Survivin. Demgegenüber zeigte keine der Kontrollen (normales Blasen gewebe) eine derartige Expression. In einer multivariaten Analyse zeigte sich die Expression von Survivin mit den Endpunkten Progressionsfreiheit, tumorspezifisches Überleben und Gesamtüberleben statistisch signifikant korreliert [36].

Eine andere Gruppe untersuchte immunhistochemisch die Expression von Emmpin und Survivin bei 124 Patienten mit einem Harnblasenkarzinom, die mittels cisplatinhaltiger Chemotherapien behandelt worden waren [37]. Die Expression der genannten Marker sowie das Vorhandensein viszeraler Metastasen waren in der multivariaten Analyse die einzigen Parameter mit statistischer Signifikanz hinsichtlich einer schlechten Prognose bzw. Nichtansprechen auf die Chemotherapie. In der Untergruppe der Patienten ohne viszerale Metastasen und Expression der genannten Marker (negative vs. einfach positive vs. zweifach positive) lag das zugehörige 5-Jahres-Überleben bei 44% vs. 21,1% vs. 0% [37].

### Ein idealer Marker für das nicht-invasive Blasenkarzinom – der Wachstumsfaktor und Angiogeneseinhibitor FGFR3

Der Fibroblast growth factor receptor 3 (FGFR3) reguliert das Zellwachstum, deren Differenzierung und Angiogenese [38]. Mutationen von *FGFR3* treten bei nicht-invasiven papillären Low-grade-Tumoren häufiger auf und sind mit einem besseren Überleben von Patienten mit Ta- und T1-Tumoren assoziiert [39].

*FGFR3* Mutationen charakterisieren den Pathway der papillären Low-grade Tumoren, die Häufigkeit der Mutationen steigt bei nicht-invasiven Tumoren. Der Nachweis von *FGFR3* Mutation hat gute Aussichten, ein hilfreiches Werkzeug in der Routine für Patienten mit low-grade papillären Blasen tumoren zu werden [40, 41].

### Auch beim Blasenkarzinom eine Option – das Onkogen HER-2/neu

Das Onkoprotein HER-2/neu codiert ein transmembranes Glycoprotein, ähnlich dem epidermal growth factor (EGF) Rezeptor [42–44]. Das HER-2/neu Protein wird von einigen Karzinomen überexprimiert.

HER-2/neu zeigt eine hohe Sensitivität und eine gute Spezifität in einigen Studien, aber es kann nicht zwischen invasiven und nicht-invasiven Karzinomen unterscheiden. Es wurde gezeigt, dass erhöhte erb-b2-Messwerte mit dem Tumorgrad nicht-invasiver Blasen tumoren korrelierten [6, 43].

### Die große Sektion der Zytokeratine und ihre Untergruppen

Zytokeratine sind Intermediär-Filamente. Die Hauptfunktion der Zytokeratine ist es, den Zellen eine mechanische Stabilität zu geben. 20 unterschiedliche Zytokeratine konnten beim Menschen identifiziert werden, die Zytokeratine 8, 18, 19, und 20 spielen beim Blasen tumor eine Rolle [45]. Mittels Immunoradiometrie oder Elektrochemilumineszenz kann Zytokeratin 19 nachgewiesen werden; schon vor einigen Jahren zeigten Studien für diesen Test Sensitivitäten von 75% bis 97% und eine Spezifität von etwa 70% [28].

Zytokeratin 20 wird im Urothelkarzinom von allen Zellen exprimiert, während beim gesunden Urothel nur die Deckschicht dieses Zytokeratin exprimiert. Es kann also in erhöhtem Maße beim Tumor nachgewiesen werden.

Die anderen Zytokeratine wie CK 8, 18 und 19 werden in erhöhtem Maße von Urothelzellen exprimiert und können so aufgrund des gesteigerten Zellumsatzes erhöht sein. Reverse Transkriptase-PCR (RT-PCR) oder Immunzytochemie wurde zum Messen von Zytokeratin-20 (CK20) in abgeschilferten Zellen benutzt. Die Sensitivität von CK20 – egal mit welcher Technik gemessen – variiert zwischen 78% und 87%. Die Spezifität liegt zwischen 55% und 80% [28, 46, 47].

Es wurde CYFRA 21-1 an 446 Patienten bei nicht-muskelinvasiven Harnblasenkarzinomen getestet [48]. Als Kontrollgruppe dienten 185 Patienten ohne Tumor. Bei allen Patienten wurde eine Urinzytologie, ein Urin-Streifentest zum Nachweis von Hämoglobin und CYFRA 21-1 bestimmt und mit dem histologischen Ergebnis korreliert. In 134 Fällen wurde ein Tumorezidiv mittels TUR-Blase detektiert (34×pTaG1; 53×pTaG2/pT1G1-2; 23×pTa-1G3/CIS und 15×pT2-4). CYFRA 21-1 zeigte bei einem Schwellenwert von 1,5 mg/mL eine Sensitivität und Spezifität von 73,8% und 41%. Die Sensitivität für Zytologie und Urin-Streifentest auf Hämoglobin lagen bei jeweils 33,6% und die Spezifität bei 98,9% bzw. 88,8%. Eine Kombination aller drei Parameter erbrachte den Nachweis von 91,3% aller nicht-muskelinvasiven und 93,3% aller muskelinvasiven Harnblasen tumoren [48].

Zusammenfassend haben die Zytokeratin-Marker eine akzeptable Sensitivität, aber eine geringe Spezifität, besonders bei Patienten mit begleitenden Entzündungen. Demnach haben sie eine eher beschränkte klinische Anwendbarkeit. CYFRA 21-1 scheint der beste urinbasierte Zytokeratin-Marker für das Blasenkarzinom zu sein.

### UBC-Rapid-Test

Fragmente von CK 8 und 18 werden beim UBC-rapid-Test rein qualitativ nachgewiesen. Die Aussagekraft ist gering bei niedriggradigen Tumoren und bei benignen urologischen Erkrankungen [17]. Die unlöslichen Zytokeratine 8 und 18 können auch durch monoklonale Antikörper mittels Sandwich-ELISA im Fremdlabor quantitativ nachgewiesen wurden.



## Immer noch aktuell – das Tumor-assoziierte Antigen TPA

Tissue polypeptide antigen (TPA) gehört als epithelialer Marker zu den tumor-assoziierten Antigenen und wurde 1957 als potentieller Tumormarker entdeckt [49]. TPA ist in den proteolytischen Fragmenten der Zytokeratine 8, 18 und 19 vorhanden, die als Zeichen des Zelltods in den Körperflüssigkeiten nachweisbar sind [50, 51]. In Normalgewebe kann TPA auch gefunden werden [51]. Erhöhte Werte von TPA sind auch bei Lebererkrankungen und Entzündungen beschrieben worden [52–57].

Die Sensitivität erreichte 16%–68,6% für TPA im Serum, 33,3% bis 80,2% im Urin; die Spezifität wurde mit 73% bis 95% im Serum und 95% bis 100% im Urin bestimmt [52, 54, 56–58].

Ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen invasiven/nicht-invasiven Blasen-tumoren und erhöhten TPA-Werten in Serum und/oder Urin konnte in mehreren Studien nicht gefunden werden [6, 54, 59].

## Weitere Tumor-assoziierte Antigene – BTA (Bladder Tumor Antigen)

Der klassische BTA-Test weist Basalmembran-Fragmente nach, von denen man zunächst dachte, dass sie tumorspezifisch seien. Nach neueren Erkenntnissen hat sich dies nicht bestätigt. Sie zeigen aber das Ausmaß einer Basalmembranzerstörung an und scheinen vermehrt im Urin vorzuliegen, wenn die Invasivität eines Tumors zunimmt. Die Sensitivität des Tests ist mit der Zytologie vergleichbar, die Spezifität aber deutlich geringer [60].

Der BTA-Stat- und BTA-Trak-Test weisen ein anderes Protein nach als der klassische BTA-Test. Dieses andere Protein ist dem menschlichen Komplement H sehr ähnlich (Complement-H-related protein) und verhindert in Blasen-tumorzellen die Lyse durch Immunzellen.

Während der BTA-Trak ein quantitativer Test ist, der mittels monoklonalen Antikörpern das genannte Protein nachweist, ist mit dem BTA-Stat ein rein qualitativer Schnelltest verfügbar, der mit einigen Tropfen Urin immunochromatografisch in der Praxis durchgeführt werden kann.

Beiden neuen BTA-Verfahren ist gemein, dass die Zahl der falsch positiven Ergebnisse, insbesondere in der Zielgruppe älterer Patienten mit urologischen Begleiterkrankungen, die klinische Aussagekraft limitiert.

Jüngst wurden die Ergebnisse einer FinnBladder-Studie hinsichtlich des BTA-Stat-Tests im Vergleich zur Urinzytologie publiziert [61]. Von 501 Patienten (48% mit pTa und 38% mit pT1 und 2% mit pT2–3) hatten im Rahmen der Nachsorgeuntersuchungen 133 (26,5%) ein Tumorrezidiv, welches in 71 Fällen (53,4%) durch BTA-Stat detektiert wurde. Von den 368 Patienten ohne Tumorrezidiv hatten 96 (26,1%) einen positiven BTA-Stat-Test. Die Ursache waren insbesondere Harnwegsinfektionen bzw. eine stattgehabte intravesikale BCG-Therapie. Die Sensitivität für den BTA-Stat-Test und die Zytologie wurde mit 56% bzw. 19,2% angegeben. Die Spezifität lag bei 85,7% bzw. 98,3%.

BTA-Stat/Trak ist von der FDA als Überwachungsmarker zugelassen.

## Ein Marker in der Routine – oder doch noch nicht? Das Tumor-assoziierte Antigen NMP22

Beim NMP22 handelt es sich um ein nukleäres Matrix-Protein (NMP), genauer um ein Protein des nukleären Spindelapparates. Es ist zusammen mit anderen nukleären Proteinen bei der Mitose verantwortlich für die korrekte Verteilung des Chromatins auf die Tochterzellen. In der normalen Zelle außerhalb des Mitosezyklus ist es nur sehr spärlich vorhanden. Im Rahmen der Apoptose wird NMP22 von Tumorzellen freigesetzt und findet sich im Urin, wo es qualitativ mittels Schnelltest nachgewiesen werden kann. Nach dem ersten quantitativen ELISA-Test für NMP22 wird oft der ImmunoCyt™ (Freiberg, Germany) als ein Assay mit einem Cut-off-Wert von 10 U/mL benutzt. Problematisch ist die große Zahl von Ausschlusskriterien, die für die Anwendung angegeben werden; so können sehr häufige Begleiterscheinungen wie Hämaturie, Leukozyturie, benigne Prostatahyperplasie (BPH), Harnwegsinfekte und Steinleiden die Ergebnisse verfälschen.

In einer Studie mit 1331 eingeschlossenen Patienten wurde eine Sensitivität von 55,7% und eine Spezifität von 85% für NMP22 ermittelt. Verglichen mit der Zytologie in dieser Gruppe lag die Sensitivität bei 15,8%, die Spezifität bei 99,2% [62].

Einige Studien berichteten über viele unterschiedliche Werte für die Sensitivität des NMP22 ELISA-Tests zwischen 47% und 100% [28]. Dennoch konnten wieder andere Studien zeigen, dass NMP22 im Überleben weniger gut ist, verglichen mit der Detektion von Erstbefunden von Blasen-tumoren; trotz allem ist die Sensitivität besser als bei der Zytologie [63]. Die Kombination von NMP22 und Zystoskopie zeigte eine höhere Sensitivität als die Zystoskopie, vor allem bei der Detektion von Rezidivtumoren. NMP22 wurde auch als eine Art Gehilfe bei der Zystoskopie oder Zytologie bezeichnet. Urin-Zytologie in Kombination mit Zystoskopie war jedoch statistisch nicht signifikant besser als die Zystoskopie alleine [9].

Eine Gruppe verglich den NMP22 Bladder Chek mit der Urinzytologie, Spülzytologie und der photodynamischen Diagnostik (PDD) bei 100 Patienten mit klinischem Verdacht auf das Vorliegen eines Harnblasenkarzinoms [64]. Bei 40 Patienten lag ein Tumor vor. Die Sensitivität von NMP22 Bladder Chek lag bei 65%, die der Urinzytologie bei 44%, der Spülzytologie bei 75% und der PDD bei 93%. Hinsichtlich der Spezifität ergaben sich für die genannten Tests Werte von 40%, 78%, 62% und 43%. Die positiven Vorhersagewerte lagen bei 42%, 58%, 52% und 52%. Die negativen Vorhersagewerte wurden mit 63%, 68%, 82% und 90% berechnet [64].

Zusammenfassend ist der NMP22 Test einfach durchzuführen, mit einer besseren Sensitivität als die Zytologie und einer akzeptablen Spezifität. NMP22 ist auch bei Low-grade-Tumoren messbar [65]. Das Hauptproblem von NMP22 liegt in der hohen Rate von falsch-positiven Ergebnissen, aber

nach sorgfältiger Patientenselektion kann NMP22 eine bessere Sensitivität zeigen als die Zytologie; die Spezifität könnte verbessert werden.

Der NMP22-Test ist von der FDA (Food and Drug Administration) der USA als diagnostischer Test und Überwachungsmarker für Risikopatienten zugelassen.

### Der klassische genetische Marker – das Tumorsuppressor Gen *TP53*

Mutationen des Tumorsuppressor-Gens *TP53* sind die häufigste genetische Veränderung bei humanen Malignomen [66]. *TP53* hat unter anderem Einfluss auf die Regulation des Zellzyklus, die Gentranskription, die Reparatur der DNA, die Stabilität des Genoms, die Trennung der Chromosomen, die Angiogenese und die Apoptose. Genetische Alterationen sind der häufigste Grund für eine Funktionsveränderung von *TP53*. Der Funktionsverlust kann auch durch eine Bindung an virale Onkoproteine oder zelluläre Genprodukte verursacht werden [67, 68]. Eine sehr wichtige Funktion des Wildtyps von *TP53* ist die Induktion der Apoptose [69]. 40% der Blasen-tumore zeigen eine Mutation in *TP53* [70]. Eine starke Assoziation einer Über-Expression des p53 Proteins mit einer höheren Rate von Progress und Rezidiven von Blasen-tumoren konnte gezeigt werden [71].

*TP53* Mutationen wurden bei nicht-invasiven Blasen-tumoren in einer Frequenz von etwa 35%, bei muskelinvasiven Tumoren in 70% der Fälle nachgewiesen [72, 73]. Interessanterweise wird bei den Tumoren, bei denen *TP53* nicht direkt inaktiviert wurde, vermutet, dass die Funktion durch mutierte Komponenten des Signalweges behindert wird, der sonst p53 aktiviert [3]. In einer In-vitro-Studie konnte gezeigt werden, dass Organismen mit multiplen *TP53* Genen „tumoresistent“ sind [74].

Die Mutationshäufigkeit der sogenannten „high-risk“ Exons 5–8 des *TP53* Gens liegt bei etwa 40% im Blasen-tumorgewebe [72, 75, 76]. Mutationen von *TP53* können die Karzinogenese beschleunigen, besonders bei der Steigerung der Zellproliferation, dem Verlust der Apoptose oder bei insuffizienter DNA Reparatur [77].

Zusammenfassend scheinen Mutationen im *TP53* Gen ein unabhängiger prognostischer Faktor für ein schlechtes progressionsfreies Überleben bei nicht-invasiven Blasen-tumoren zu sein. Mutationen an definierten Orten und Funktionseinheiten von p53 können nützliche molekularbiologische Marker für Prognose und Therapiestrategien von nicht-invasiven Urothelkarzinomen sein. Diese Erkenntnisse sind umso wertvoller, seit *TP53* Mutationen auch im Urinsediment durch nicht-invasive Methoden analysiert werden können [78–80]. Mit neueren und schnelleren Techniken für genetische Analysen könnten diese in die tägliche Routine der Zukunft eingeschlossen werden.

### Marker der Zukunft – DNA-Hypermethylierung

Bei der Progression von Harnblasenkarzinomen sind insbesondere die Vorgänge der Hypermethylierung sowie eine ver-

änderte Expression von Genen, die den Zellzyklus bzw. die Apoptose betreffen, zu nennen. Die DNA-Hypermethylierung im Promotorbereich verschiedener Gene bewirkt eine Gen-Inaktivierung („gene silencing“). Zu den wichtigsten Regulatoren des Zellzyklus gehören p53, p21, p27 und Rb.

Untersuchungen zum Methylierungsstatus von 17 Gen-Promotoren wurden bei 96 Patienten mit einem Harnblasen-tumor und 30 benignen Kontrollen durchgeführt [81]. Bei 5 Gen-Promotoren (RASSF1a, E-Cadgerin, TNF-SR25, EDNRB und APC) zeigte sich eine Korrelation zu einem höheren Stadium und Tumorprogression. Der Methylierungsstatus war in der multivariaten Analyse statistisch signifikant mit Progression und Gesamtüberleben korreliert [81].

Immunhistochemische Untersuchungen zu p53, p21, p27 und pRB konnten an 74 Patienten mit einem Harnblasen-tumor im Stadium pTa, CIS und/oder pT1 nach erfolgter TUR-Blase bzw. 226 Patienten nach erfolgter Zystektomie durchgeführt werden [82]. Die Marker p53, pRB und p27 waren mit dem pathologischen Stadium, der lymphovaskulären Invasion bzw. dem Lymphknotenbefall korreliert. Ferner waren die Marker p21, p27 und p53 in der multivariaten Analyse mit dem progressionsfreien Überleben und dem tumorspezifischen Überleben korreliert. Bei 22 Patienten konnte ein Vergleich zwischen Resektat, welches im Rahmen der TUR-Blase entfernt worden war, und dem Zystektomiepräparat vorgenommen werden. Es fand sich hierbei eine Übereinstimmung in 77% bis 86% der Fälle. Auch beim Vergleich vom Zystektomiepräparat und positiven Lymphknoten lag die Übereinstimmung bei 70% bis 92% [82].

Verschiedene Apoptosemarker wie Bcl-2, Caspase-3 p53 und Survivin wurden untersucht und eine immunhistochemische Färbung von Zystektomiepräparaten von 226 konsekutiven Patienten mit einem muskelinvasiven Harnblasenkarzinom durchgeführt [83]. Die mediane Nachbeobachtungszeit lag bei 37 Monaten. Die Expression von Bcl-2, Caspase-3, p53 und Survivin war bei 73 (32%) bzw. 111 (49%) bzw. 120 (53%) und 141 (64%) Patienten beeinträchtigt. In einer univariaten Analyse zeigte sich die Expression aller Parameter mit einem 2- bis 3-fachen Risiko eines Tumorrezidivs und dem tumorspezifischen Überleben assoziiert. Diese Aussagekraft hielt auch in der multivariaten Analyse stand [83].

Beispielhaft konnte in einer Arbeit die Methylierung des polyamine modulated factor-1 (PMF1) als prognostischer Faktor beim Blasenkarzinom identifiziert werden [84]. Das unterstreicht, neben vielen anderen Arbeiten auf diesem Gebiet, die Wichtigkeit der Epigenetik, gerade für das Blasenkarzinom. Damit wird sowohl den Erklärungsmodellen der Vergangenheit [3] als auch der genetischen Forschung der Gegenwart und der Zukunft [4, 7, 85] Ausdruck verliehen; das Blasenkarzinom sollte also weiterhin als genetische Erkrankung gesehen werden.

### Andere interessante Marker

#### Immunocyt

Beim ImmunoCyt Test (Diagno-Cure Inc., Sainte-Foy, Quebec, Canada) werden immunozytochemisch mit drei

monoklonalen Antikörpern gegen CEA sowie zwei blasentumorassoziierte Mucine maligne Urothelzellen markiert, die dann fluoreszenzmikroskopisch nachgewiesen werden [86]. In einer Studie konnte gezeigt werden, dass der Test eine Sensitivität von 81% und eine Spezifität von 75% bei der Detektion von Blasen-tumoren aufweist [87]; diese Ergebnisse wurden durch frühere Untersuchungen bestätigt [88, 89].

Immunocyt ist von der FDA als Überwachungsmarker zugelassen.

### DD23

Mittels eines monoklonalen Antikörpers gegen ein 185-kDa-Antigen kann dieses nicht vollständig charakterisierte, aber auf normalen Urothelzellen nicht vorkommende Protein, immunhistochemisch mikroskopisch auf Urothelzellen nachgewiesen werden [90, 91]. Die Sensitivität ist unabhängig vom Tumorigrad hoch, die Spezifität leider gering [92].

### HA-Haase

Hyaluronsäure und Hyaluronidase, die bei einem Urothelkarzinom im Urin erhöht sein können, wurden kombiniert in ELISA-ähnlichen Testassays untersucht. Eine Studie zeigte Spezifität und Sensitivitätswerte oberhalb derer von Immunocyt [93]. Die Testassays sind noch nicht kommerziell verfügbar und sehr aufwändig.

## Schlussfolgerungen

Beim Monitoring des Harnblasenkarzinoms bleibt die Zystoskopie unverzichtbarer Bestandteil und kann derzeit nicht durch Urintests ersetzt werden. Gleichwohl können einige Tests zusätzliche Informationen zur Urinzytologie liefern. Allerdings herrscht keine Übereinkunft, in welcher individuellen Situation welcher Tumormarker oder welche Kombination von Tumormarkern Verwendung finden sollte. Dies misslingt leider oft wegen der fehlenden Standardisierung und der unterschiedlichen Betrachtung von Störfaktoren wie Zystitis, Trauma (vor allem Zystoskopie), Urolithiasis und Hämaturie, die bei vielen Tumormarkern zu falsch-positiven Ergebnissen führen können.

Serummarker sind zum Monitoring des muskelinvasiven Harnblasenkarzinoms leider nicht in standardisierter Form verfügbar. Demgegenüber lässt Tumorgewebe insbesondere die Analyse auf Hypermethylierung sowie Veränderungen von Parametern des Zellzyklus und der Apoptose zu. Survivin ist an dieser Stelle besonders herauszustreichen. Dieser Marker wird nach seiner Markteinführung zeigen müssen, ob die exzellenten Zahlen der ersten Publikationen gehalten werden können. Sollte dem so sein, bietet sich hiermit ein Verfahren mit anscheinend hoher Genauigkeit.

Allerdings ist die vom p53 bekannte Problematik verschiedener Antikörper, unterschiedlicher Schwellenwerte bei der Beurteilung positiver Tumortuben und dem zumeist retrospektiven Charakter der Studien mit zu wenig Patienten ein potentiell Problem derartiger Untersuchungen.

Ein Screening der asymptomatischen Normalbevölkerung wird heute nicht empfohlen. Risikogruppen haben eine deut-

lich höhere Prävalenz für Urothelkarzinome und Exponierte können durch frühere Erkennung, vor allem schlecht differenzierter Tumoren, profitieren. Die Zytologie, die Hämatiediagnostik und die in der Praxis verfügbaren Schnelltests bieten ggf. in Kombination für die Zukunft eine Chance, den Detektionszeitpunkt vorzulegen, ohne bei einer hohen Zahl von Probanden Blasenspiegelungen durchführen zu müssen. Das stellt aufgrund der Tumorbio-logie des Urothelkarzinoms einen echten Vorteil für die Betroffenen dar.

Noch bietet keines der genannten Markersysteme eine ausreichende Genauigkeit, um die nach den Richtlinien der EAU und der DGU geforderten Kontrollzystoskopien zu ersetzen.

Im Screening stellen positive Marker ein weiteres Argument für die dann indizierte Zystoskopie dar. Weitere prospektive Studien müssen die Annahme belegen, dass trotz Mikrohämaturie bei negativen Tumormarkern ohne Blasenspiegelung eine Verlaufskontrolle ausreichend ist. Unter diesen Gesichtspunkten sind Marker mit hoher Genauigkeit schon heute sinnvoll einsetzbar.

Entdecken und Entwickeln neuer Blasen-tumor-Marker ist nach wie vor ein sehr dynamisches Arbeitsgebiet. Wegen der Menge dieser Marker ist es unmöglich, jeden Marker einzuordnen und vorzustellen. In diesem Artikel wurden die wichtigsten Marker mit ihrer prognostischen und diagnostischen Aussagekraft vorgestellt.

Weitere Entwicklungen von Markern für Rezidive und Progress der Erkrankung werden auch helfen, bessere Therapien für den einzelnen Patienten zu etablieren. Molekulares Staging von urologischen Tumoren wird es ermöglichen, Patienten zu selektieren, die von einer systemischen Therapie profitieren. Um solche Vorhaben in die Tat umzusetzen, bedarf es der Zusammenarbeit von Grundlagenforschung und klinischer Forschung. Solche Teams würden die Integration der klinischen Follow-up-Daten der Tumortubierten mit Tumor- und Serumbanken benötigen.

Gerade auf dem Feld der Blasen-tumor-Marker zeigt auch diese Übersicht, dass es keinen Sinn ergibt, nur einen Marker zu fokussieren. Vielmehr ist es notwendig, eine mögliche Kombination von mehreren Tumormarkern zu entwickeln, um zum Beispiel die Intervalle der Zystoskopien zu verlängern oder die Notwendigkeiten von Nachresektionen zu hinterfragen. Diese Marker sollten auf ihren charakteristischen Eigenschaften und dem speziellen Risikoprofil der einzelnen Patienten basieren.

Einige vielversprechende Blasen-tumormarker haben selbst eine bessere Genauigkeit als das prostata-spezifische Antigen (PSA) bei Prostatakarzinom. Es hängt vom Willen der Ärzte und Patienten ab, ob einer oder mehrere der Blasen-tumor-Marker zukünftig einen größeren Einfluss im klinischen Alltag haben und die Diagnostik und Therapie der Blasenkarzinoms in Zukunft verändern werden.

## Literatur

1. Horstmann M, Witthuhn R, Falk M, Stenzl A. Gender-specific differences in bladder cancer: a retrospective analysis. *Gender Med* 2008;5:385–94.



2. Dinney CP, McConkey DJ, Millikan RE, Wu X, Bar-Eli M, Adam L, et al. Focus on bladder cancer. *Cancer Cell* 2004;6: 111–6.
3. Spruck CH 3rd, Ohneseit PF, Gonzales-Zulueta M, Esrig D, Miyao N, Tsai YC, et al. Two molecular pathways to transitional cell carcinoma of the bladder. *Cancer Res* 1994;54:784–8.
4. Theodorescu D, Wittke S, Ross MM, Walden M, Conaway M, Just I, et al. Discovery and validation of new protein biomarkers for urothelial cancer: a prospective analysis. *Lancet Oncol* 2006;7:230–40.
5. Sánchez-Carbayo M, Cordon-Cardó C. Molecular alterations associated with bladder cancer progression. *Semin Oncol* 2007;34:75–84.
6. Ecke TH, Schlechte HH, Schulze G, Lenk SV, Loening SA. Four tumour markers for urinary bladder cancer – tissue polypeptide antigen (TPA), HER-2/neu (ERB B2), urokinase-type plasminogen activator receptor (uPAR) and TP53 mutation. *Anticancer Res* 2005;25:635–41.
7. Sánchez-Carbayo M. Recent advances in bladder cancer diagnostics. *Clin Biochem* 2004;37:562–71.
8. Mhawech-Fauceglia P, Cheney RT, Schwaller J. Genetic alterations in urothelial bladder cancer. *Cancer* 2006;106:1205–16.
9. Agarwal PK, Black PC, Kamat AM. Considerations on the use of diagnostic markers in management of patients with bladder cancer. *World J Urol* 2008;26:39–44.
10. Botteman MF, Pashos CL, Redaelli A, Laskin B, Hauser R. The health economics of bladder cancer: a comprehensive review of the published literature. *Pharmacoeconomics* 2003;21:1315–30.
11. Mitra N, Indurkha A. A propensity score approach to estimating the cost-effectiveness of medical therapies from observational data. *Health Econ* 2005;14:805–15.
12. Lotan Y, Roehrborn CG. Cost-effectiveness of a modified care protocol substituting bladder tumor markers for cystoscopy for the follow-up of patients with transitional cell carcinoma of the bladder: a decision analytical approach. *J Urol* 2002;167:75–9.
13. Lotan Y, Roehrborn CG. Sensitivity and specificity of commonly available bladder tumor markers versus cytology: results of a comprehensive literature review and meta-analyses. *Urology* 2003;61:109–18.
14. Wakui M, Shiigai T. Urinary tract cancer screening through analysis of urinary red blood cells volume distribution. *Int J Urol* 2000;7:248–53.
15. Grossfeld GD, Wolf JS Jr, Litwan MS, Hricak H, Shuler CL, Agertor DC, et al. Asymptomatic microscopic hematuria in adults: summary of the AUA best practice policy recommendations. *Am Fam Physician* 2001;63:1145–54.
16. Halling KC, King W, Sokolova IA, Karnes RJ, Meyer RG, Powell EL, et al. A comparison of BTA stat, haemoglobin dipstick, telomerase, and Vysis UroVysion assay for the detection of urothelial carcinoma in urine. *J Urol* 2002;167:2001–6.
17. Schroeder GL, Lorenzo-Gomez MF, Hautmann SH, Friedrich MG, Ekici S, Huland H, et al. A side-by-side comparison of cytology and biomarkers, HA-HAse, hematuria detection, BTA-Stat, UBC-Rapid for bladder cancer detection. *J Urol* 2004; 172:1123–6.
18. Ramakumar S, Bhuiyan J, Besse JA, Roberts SG, Wollan PC, Blute ML, et al. Comparison of screening methods in the detection of bladder cancer. *J Urol* 1999;161:388–94.
19. Messing EM, Young TB, Hunt VB, Gilchrist KW, Newton MA, Bram LL, et al. Comparison of bladder cancer outcome in men undergoing hematuria home screening versus those with standard clinical presentations. *Urology* 1995;45:387–96.
20. Messing EM, Young TB, Hunt VB, Roecker EB, Vaillancourt AM, Hisgen WJ, et al. Home screening for hematuria: results of a multiclinic study. *J Urol* 1992;148:289–92.
21. Britton JP, Dowell AC, Whelan P, Harris CM. A community study of bladder cancer screening by the detection of occult urinary bleeding. *J Urol* 1992;148:788–90.
22. Lokeshwar VB, Selzer MG. Urinary bladder tumor markers. *Urol Oncol* 2006;24:528–37.
23. Schmitz-Dräger BJ, Tirsar LA, Schmitz-Dräger C, Dörsam J, Mellan Z, Bismarck E, et al. Immunocytology in the assessment of patients with asymptomatic hematuria. *World J Urol* 2008; 26:31–7.
24. Van Rhijn BW, van der Poel HG, van der Kwast TH. Urine markers for bladder cancer surveillance: a systematic review. *Eur Urol* 2005;47:736–48.
25. Konety BR. Molecular markers in bladder cancer: a critical appraisal. *Urol Oncol* 2006;24:326–37.
26. Bollmann M, Heller H, Bánkfalvi A, Griefingholt H, Bollmann R. Quantitative molecular urinary cytology by fluorescence in situ hybridization: a tool for tailoring surveillance of patients with superficial bladder cancer? *BJU Int* 2005;95:1219–25.
27. Kipp BR, Karnes RJ, Brankley SM, Harwood AR, Pankratz VS, Sebo TJ, et al. Monitoring intravesical therapy for superficial bladder cancer using fluorescence in situ hybridization. *J Urol* 2005;173:401–4.
28. Lokeshwar VB, Habuchi T, Grossmann B. Bladder tumor markers beyond cytology: international consensus on bladder tumor markers. *Urology* 2005;66:35–63.
29. Gudjónsson S, Isfoss BL, Hansson K, Domanski AM, Wahrenholt J, Soller W, et al. The value of the UroVysion® assay for surveillance of non-muscle – invasive bladder cancer. *Eur Urol* 2008;54:402–8.
30. Skacel M, Fahmy M, Brainard JA, Pettay JD, Biscotti CV, Liou LS, et al. Multitarget fluorescence in situ hybridization assay detects transitional cell carcinoma in the majority of patients with bladder cancer and atypical or negative urine cytology. *J Urol* 2003;169:2101–5.
31. Dabrowski A, Filip A, Zgodzinski W. Assessment of prognostic significance of cytoplasmic survivin expression in advanced oesophageal cancer. *Folia Histochem Cytobiol* 2004;42:169–72.
32. Moussa O, Abol-Enein H, Bissada NK, Keane T, Ghoneim MA, Watson DK. Evaluation of survivin reverse transcriptase-polymerase chain reaction for noninvasive detection of bladder cancer. *J Urol* 2006;175:2312–6.
33. Kenney DM, Geschwindt RD, Kary MR, Linic JM, Sardesai NY, Li ZQ. Detection of newly diagnosed bladder cancer, bladder cancer recurrence and bladder cancer in patients with hematuria using quantitative rt-PCR of urinary survivin. *Tumour Biol* 2007;28:57–62.
34. Schultz IJ, Wester K, Straatman H, Kiemeny LA, Babjuk M, Mares J, et al. Gene expression analysis for the prediction of recurrence in patients with primary Ta urothelial cell carcinoma. *Eur Urol* 2007;51:416–23.
35. Smith SD, Wheeler MA, Plescia J, Colberg JW, Weiss RM, Altieri DC. Urine detection of survivin and diagnosis of bladder cancer. *J Am Med Assoc* 2001;285:324–8.
36. Shariat SF, Ashfaq R, Karakiewicz PI, Saedi O, Sagalowsky AI, Lotan Y. Survivin expression is associated with bladder cancer presence, stage, progression, and mortality. *Cancer* 2007;109:1106–13.
37. Als AB, Dyrskjøt L, von der Maase H, Koed K, Mansilla F, Toldbod HE, et al. Emmprin and survivin predict response and survival following cisplatin-containing chemotherapy in



- patients with advanced bladder cancer. *Clin Cancer Res* 2007; 13:4407–14.
38. Powers CJ, McLeskey SW, Wellstein A. Fibroblast growth factors, their receptors and signalling. *Endocr Relat Cancer* 2000; 7:165–97.
  39. van Rhijn BW, Vis AN, van der Kwast TH, Kirkels WJ, Radvanyi F, Ooms EC, et al. Molecular grading of urothelial cell carcinoma with fibroblast growth factor receptor 3 and MIB-1 is superior to pathologic grade for the prediction of clinical outcome. *J Clin Oncol* 2003;21:1912–21.
  40. Hernández S, López-Knowles E, Lloreta J, Kogevinas M, Amorós A, Tardón A, et al. Prospective study of FGFR3 mutations as a prognostic factor in nonmuscle invasive urothelial bladder carcinomas. *J Clin Oncol* 2006;24:3664–71.
  41. van Rhijn BW, Lukin I, Radvanyi F, Kirkels WJ, van der Kwast TH, Zwarthoff EC. The fibroblast growth factor receptor 3 (FGFR3) mutation is a strong indicator of superficial bladder cancer with low recurrence rate. *Cancer Res* 2001;61:1265–8.
  42. Gandour-Edwards R, Lara PN Jr, Folkins AK, LaSalle JM, Beckett L, Li Y, et al. Does HER2/neu expression provide information in patients with advanced urothelial carcinoma? *Cancer* 2002;95:1009–15.
  43. Mellon JK, Lunec J, Wright C, Horne CHW, Kelly P, Neal DE. C-erbB-2 in bladder cancer: molecular biology, correlation with epidermal growth factor receptors and prognostic value. *J Urol* 1996;155:321–6.
  44. Lonn U, Lonn S, Friberg S, Nilsson B, Silfversward C, Stenkvist B. Prognostic value of amplification of c-erb-B2 in bladder carcinoma. *Clin Cancer Res* 1995;1:1189–94.
  45. Southgate J, Harden P, Trejdosiewicz LK. Cytokeratin expression patterns in normal and malignant urothelium: a review of the biological and diagnostic implications. *Histol Histopathol* 1999;14:657–64.
  46. Siracusano S, Niccolini B, Knez R, Tiberio A, Benedetti E, Bonin S, et al. The simultaneous use of telomerase, cytokeratin 20 and CD4 for bladder cancer detection in urine. *Eur Urol* 2005;47:327–33.
  47. Eissa S, Kassim SK, Labib RA, El-Khouly IM, Ghaffer TM, Sadek M, et al. Detection of bladder carcinoma by combined testing of urine for hyaluronidase and cytokeratin 20 RNAs. *Cancer* 2005;103:1356–62.
  48. Fernandez-Gomez J, Rodríguez-Martínez JJ, Barmadah SE, García Rodríguez J, Allende DM, Jalon A, et al. Urinary CYFRA 21.1 is not a useful marker for the detection of recurrences in the follow-up of superficial bladder cancer. *Eur Urol* 2007;51:1267–74.
  49. Björklund B, Björklund V. Antigenicity of pooled human malignant and normal tissues by cito-immunological technique: presence of an insoluble, heatlabile tumor antigen. *Int Arch Allergy* 1957;10:153–84.
  50. Björklund B. On the nature and clinical use of tissue polypeptide antigen (TPA). *Tumor Diagnostik* 1980;1:9–20.
  51. Nathrath WBJ, Heidenkummer P, Björklund V, Björklund B. Distribution of tissue polypeptide antigen (TPA) in normal human tissues: immunohistochemical study on unfixed, methanol-, ethanol-, and formalin-fixed tissues. *J Histochem Cytochem* 1985;33:99–109.
  52. Maulard C, Toubert ME, Chretien Y, Delanian S, Dufour B, Housset M. Serum tissue polypeptide antigen (s-TPA) in bladder cancer as a tumour marker. A prospective study. *Cancer* 1994;73:394–8.
  53. Moraglio D, Pagano M, Galeazzi D, Arnelli A, Bertero L. Tissue polypeptide specific antigen (TPS) in liver disease. *Clin Chim Acta* 1994;224:209–14.
  54. Ecke TH, Lenk SV, Schlechte HH, Loening SA. Tissue polypeptide antigen (TPA) in comparison with mutations of tumour suppressor gene (TP53) in patients with bladder cancer. *Anticancer Res* 2003;23:957–62.
  55. Maulard-Durdux C, Toubert ME, Hennequin C, Housset M. Serum tissue polypeptide antigen in bladder cancer as a tumor marker: a prospective study. *J Clin Oncol* 1997;15:3446–50.
  56. Menendez Lopez V, Galan JA, Fernandez-Suarez A, Lopez-Celada S, Alcover J, Filella X. Usefulness of tissue polypeptide antigen in the follow-up of bladder cancer. *J Urol* 2003;62:243–8.
  57. Sánchez-Carbayo M, Herrero E, Megías J, Mira A, Soria F. Comparative sensitivity of urinary CYFRA 21-1, urinary bladder cancer antigen and NMP22 to detect bladder cancer. *J Urol* 1999;162:1951–6.
  58. Stieber P, Schmeller N, Schambeck C, Hofmann K, Reiter W, Hasholzner U, et al. Clinical relevance of CYFRA 21-1, TPA-IRMA and TPA-LIA-mat in urinary bladder cancer. *Anticancer Res* 1996;16:3793–8.
  59. Casetta G, Piana P, Cavallini A, Vottero M, Tizzani A. Urinary levels of tumour associated antigens (CA 19-9, TPA and CEA) in patients with neoplastic and non-neoplastic urothelial abnormalities. *Br J Urol* 1993;72:60–4.
  60. Schamhart DH, de Reijke TM, van der Poel HG, Witjes JA, de Boer EC, Kurth K, et al. The bard BTA test: its mode of action, sensitivity, specificity, compared to cytology of voided urine, in the diagnosis of superficial bladder cancer. *Eur Urol* 1998; 34:99–106.
  61. Raitanen MP, The FinnBladder Group. The role of BTA stat Test in follow-up of patients with bladder cancer: results from FinnBladder studies. *World J Urol* 2008;26:45–50.
  62. Grossman HB, Messing E, Soloway M, Tomera K, Katz G, Berger Y, et al. Detection of bladder cancer using a point-of-care proteomic assay. *J Am Med Assoc* 2005;293:810–6.
  63. Grossman HB, Soloway M, Messing E, Katz G, Stein B, Kasabian V, et al. Surveillance for recurrent bladder cancer using a point-of-care proteomic assay. *J Am Med Assoc* 2006;295: 299–305.
  64. Tritschler S, Scharf S, Karl A, Tilki D, Knuechel R, Hartmann A, et al. Validation of the diagnostic value of NMP22 BladderChek test as a marker for bladder cancer by photodynamic diagnosis. *Eur Urol* 2007;51:403–7.
  65. Vrooman OP, Witjes A. Urinary markers in bladder cancer. *Eur Urol* 2008;53:909–16.
  66. Spruck III CH, Rideot III WM, Olumi AF, Ohneseit PF, Yang AS, Tsai YC, et al. Distinct pattern of p53 mutations in bladder cancer: relationship to tobacco usage. *Cancer Res* 1993;53: 1162–6.
  67. Harris CC. Structure and function of the p53 tumor suppressor gene: clues for rational cancer therapeutic strategies. *J Natl Cancer* 1996;88:1442–55.
  68. Symonds H, Krall L, Remington L, Saenz-Robles M, Lowe S, Jacks T, et al. p53-Dependent apoptosis suppresses tumor growth and progression in vivo. *Cell* 1994;78:703–11.
  69. Ozbun MA, Butel JS. p53 tumor suppressor gene: structure and function. In: Bertino, ed. *Encyclopedia of cancer, volume II*. New York: Academic Press, 1997:1240–57.
  70. Esrig D, Elmajian D, Groshen S, Freeman JA, Stein JP, Chen SC, et al. Accumulation of nuclear p53 and tumor progression in bladder cancer. *New Engl J Med* 1994;331:1259–64.
  71. Li B, Kanamaru H, Noriki S, Yamaguchi T, Fukuda M, Okada K. Reciprocal expression of bcl-2 and p53 oncoproteins in urothelial dysplasia and carcinoma of the urinary bladder. *Urol Res* 1998;26:235–41.
  72. Schlechte HH, Schnorr D, Löning T, Rudolph BD, Pohrt UM,

- Loening SA. Mutation of the tumor suppressor gene p53 in human prostate and bladder cancers: investigation by temperature gradient gel electrophoresis (TGGE). *J Urol* 1997;157:1049–53.
73. Ecke TH, Sachs MD, Lenk SV, Loening SA, Schlechte HH. TP53 gene mutations as an independent marker for urinary bladder cancer progression. *Int J Mol Med* 2008;21:655–61.
74. García-Cao I, García-Cao M, Martín-Caballero J, Criado LM, Klatt P, Flores JM, et al. “Super p53” mice exhibit enhanced DNA damage response, are tumor resistant and age normally. *EMBO J* 2002;21:6225–35.
75. Kusser WC, Miao X, Glickman BW, Friedland JM, Rothman N, Hemstreet GP, et al. p53 mutations in human bladder cancer. *Env Molec Mutagen* 1994;24:156–60.
76. Schlechte HH, Sachs MD, Lenk SV, Brenner S, Rudolph BD, Loening SA. Progression in transitional cell carcinoma of the urinary bladder: analysis of TP53 gene mutations by temperature gradient gel electrophoresis and sequencing in tumor tissues and in cellular urine sediments. *Cancer Detection Prev* 2000;24:24–32.
77. Sidransky D, Hollstein M. Clinical implications of the p53 gene. *Ann Rev Med* 1996;47:285–301.
78. Sachs MD, Schlechte H, Lenk VS, Brenner S, Schnorr D, Fleige B, et al. Genetic analysis of Tp53 from urine sediment as a tool for diagnosing recurrence and residual of bladder carcinoma. *Eur Urol* 2000;38:426–33.
79. Gao JP, Uchida T, Wang C, Jiang SX, Matsumoto K, Satoh T, et al. Relationship between p53 gene mutation and protein expression: clinical significance in transitional cell carcinoma of the bladder. *Int J Oncol* 2000;16:469–75.
80. Schlichtholz B, Presler M, Matuszewski M. Clinical implications of p53 mutation analyses in bladder cancer tissue and urine sediment by functional assay yeast. *Carcinogenesis* 2004;25:2319–23.
81. Yates DR, Rehman I, Abbod MF, Meuth M, Cross SS, Linkens DA, et al. Promoter hypermethylation identifies progression risk in bladder cancer. *Clin Cancer Res* 2007;13:2046–53.
82. Shariat SF, Zlotta AR, Ashfaq R, Sagalowsky AI, Lotan Y. Cooperative effect of cell-cycle regulators expression on bladder cancer development and biologic aggressiveness. *Mod Pathol* 2007;20:445–59.
83. Karam JA, Lotan Y, Karakiewicz PI, Ashfaq R, Sagalowsky AI, Roehrborn CG, et al. Use of combined apoptosis biomarkers for prediction of bladder cancer recurrence and mortality after radical cystectomy. *Lancet Oncol* 2007;8:128–36.
84. Aleman A, Cebrian V, Alvarez M, Lopez V, Orenes E, Lopez-Serra L, et al. Identification of PMF1 methylation in association with bladder cancer progression. *Clin Cancer Res* 2008;14:8236–43.
85. Esteller M. Epigenetics in Cancer. *New Eng J Med* 2008;358:1148–59.
86. Mian C, Pycha A, Wiener H, Haitel A, Lodde M, Marberger M. Immunocyt: a new tool for detecting transitional cell cancer of the urinary tract. *J Urol* 1999;161:1486–9.
87. Messing EM, Teot L, Korman H, Underhill E, Barker E, Stork B, et al. Performance of urine test in patients monitored for recurrence of bladder cancer: a multicenter study in the United States. *J Urol* 2005;174:1238–41.
88. Toma MI, Friedrich MG, Hautmann SH, Jakel KT, Erbersdobler A, Hellstern A, et al. Comparison of the ImmunoCyt test and urinary cytology with other urine tests in the detection and surveillance of bladder cancer. *World J Urol* 2004;22:145–9.
89. Feil G, Zumbargel A, Paulgen-Nelde HJ, Hennenlotter J, Maurer S, Krause S, et al. Accuracy of the ImmunoCyt assay in the diagnosis of transitional cell carcinoma of the urinary bladder. *Anticancer Res* 2003;23:963–7.
90. Sanchez-Carbayo M, Urrutia M, Gonzalez de Buitrago JM, Navajo JA. Evaluation of two new urinary tumor markers: bladder tumor fibronectin and cytokeratin 18 for the diagnosis of bladder cancer. *Clin Cancer Res* 2000;6:3585–94.
91. Hegele A, Heidenreich A, Varga Z, von Knobloch R, Olbert P, Kropf J, et al. Cellular fibronectin in patients with transitional cell carcinoma of the bladder. *Urol Res* 2003;30:363–6.
92. Sawczuk IS, Pickens CL, Vasa UR, Ralph DA, Norris KA, Miller MC, et al. DD23 Biomarker: a prospective clinical assessment in routine urinary cytology specimens from patients being monitored for TCC. *Urol Oncol* 2002;7:185–90.
93. Hautmann S, Toma M, Lorenzo Gomez MF, Friedrich MG, Jaekel T, Michl U, et al. Immunocyt and the HA-HAase urine tests for the detection of bladder cancer: a side-by-side comparison. *Eur Urol* 2004;46:466–71.