

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

**MOLEKULARE PROGNOSEFAKTOREN BEIM
OBERFLÄCHLICH INVASIVEN UROTHELKRZINOM
DER HARNBLASE (pT1)**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Medizinischen Fakultät
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Johann Lorenz Lermer

2010

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

**MOLEKULARE PROGNOSEFAKTOREN BEIM
OBERFLÄCHLICH INVASIVEN UROTHELKRZINOM
DER HARNBLASE (pT1)**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Medizinischen Fakultät
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Johann Lorenz Lermer

2010

Dekan:

1. Berichterstatter:

2. Berichterstatter:

Tag der mündlichen Prüfung:

Prof. Dr. Bernhard Weber

Prof. Dr. Arndt Hartmann

PD Dr. Maximilian Burger

8. November 2010

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	1
1.1 Das Urothelkarzinom der Harnblase	1
1.1.1 Epidemiologie, Ätiologie und Pathogenese	1
1.1.2 Morphologie und Histopathologie der Urotheltumoren der Harnblase	1
1.1.3 Klassifikationen.....	3
1.1.4 Molekulargenetik	6
1.1.4.1 Chromosomale Aberrationen	8
1.1.4.2 Klonalität multifokaler Harnblasenkarzinome	9
1.1.4.3 Tumorsuppressorgene	10
1.1.4.4 Onkogene	11
1.1.4.5 FGFR3-Mutationen bei Harnblasentumoren.....	13
1.1.4.6 Immunhistochemische Marker (CK20, p53, MIB-1, andere)	14
1.1.4.7 Bedeutung von LOH und MSI in der Karzinogenese	17
1.1.4.8 Bedeutung der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung	18
1.1.5 pT1-Tumoren als Grenzfall	18
1.1.5.1 Besonderheit der pT1-Urothelkarzinome der Harnblase	19
1.1.5.2 Bisherige Empfehlungen zum Behandlungsvorgehen	19
1.2 Fragestellung und Zielsetzung der Dissertation	21
1.2.1 Untersuchung von pT1G2/3-Tumoren mit Hilfe von LOH- und MSI-Analysen ...	22
1.2.2 Untersuchung von pT1G2/3-Tumoren mit Hilfe der FISH-Technik	22
1.2.3 Vergleich mit weiteren Markern	22
1.2.4 Korrelation der Ergebnisse mit dem Krankheitsverlauf der Tumorpatienten	23
2 Material und Methoden	24
2.1 Material	24
2.1.1 Gewebeproben und klinisch-pathologische Daten	24
2.1.2 Grundchemikalien	27

2.1.3 Reagenzien und Lösungen	28
2.1.3.1 Allgemeine Lösungen	28
2.1.3.2 Lösungen für die HE-Färbung von Paraffinschnitten	29
2.1.3.3 Lösungen für die DNA-Isolation aus Paraffinmaterial	29
2.1.3.4 Material für die LOH- und MSI-Analysen.....	30
2.1.3.4.1 Material für die Amplifikation genomischer DNA durch PCR	30
2.1.3.4.2 Lösungen für die PAA-Gelelektrophorese	31
2.1.3.4.3 Lösungen für die Silberfärbung.....	32
2.1.3.5 Material für die Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung	33
2.1.3.6 Material für die TP53-Sequenzierung auf den Exons 5 bis 8	34
2.1.3.6.1 Lösungen für die Fällung und Reinigung von DNA zur Sequenzierung ..	34
2.1.3.6.2 Lösungen für die Agarose-Gelelektrophorese.....	34
2.1.3.6.3 Ansätze für die Sequenzreaktion.....	35
2.1.3.7 Material für die FGFR3-Mutationsanalyse	37
2.1.3.8 Material für die immunhistochemischen Färbungen.....	38
2.1.4 Laborgeräte/Hilfsmittel	40
2.1.5 Photodokumentation.....	42
2.1.6 Datendokumentation und Auswertung am Computer	42
2.2 Methoden.....	43
2.2.1 Herstellung von Paraffinschnitten	43
2.2.2 Entparaffinieren der Gewebeschnitte	44
2.2.3 HE-Färbung der Schnitte.....	44
2.2.4. LOH- und MSI-Analysen.....	45
2.2.4.1 Mikrodissektion der Tumorareale	45
2.2.4.2 Proteinase-K-Verdau und DNA-Isolierung.....	46
2.2.4.3 Amplifikation von DNA mittels PCR-Technik.....	47
2.2.4.4 Anwendung der PCR für die LOH- und MSI-Analyse	49
2.2.4.5 Auftrennen der PCR-Produkte mittels Polyacrylamid-Gelelektrophorese	51
2.2.4.6 Silberfärbung von Polyacrylamid-Gelen.....	53
2.2.4.7 Interpretation des Bandenmusters von Polyacrylamid-Gelen.....	54
2.2.5 Gewebs-Mikroarrays (Tissue-Micro-Arrays, TMA).....	57
2.2.6 Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung	58
2.2.6.1 Experimentelle Durchführung der FISH	59
2.2.6.2 Bewertungs- und Auswertungskriterien der FISH-Signale.....	61

2.2.7 TP53-Sequenzierung auf den Exons 5 bis 8.....	62
2.2.7.1 Amplifikation der DNA durch nested-PCR	63
2.2.7.2 PEG-Fällung der PCR-Produkte	64
2.2.7.3 Agarose-Gelelektrophorese	64
2.2.7.4 Sequenzreaktion nach Sanger.....	65
2.2.7.5 Ethanol-fällung der Reaktionsprodukte.....	66
2.2.7.6 Detektion und Auswertung der Fluoreszenzsignale.....	67
2.2.8 Technik der FGFR3-Mutationsanalyse	68
2.2.9 Immunhistochemische Färbungen.....	70
2.2.9.1 Protokoll der immunhistochemischen Färbungen.....	71
2.2.9.2 Auswertungskriterien der immunhistochemischen Färbungen	73
2.2.10 Auswertung und Dokumentation der Daten.....	74
2.2.11 Statistische Analysen.....	74
2.2.12 Photodokumentation.....	76
3 Ergebnisse	77
3.1 Molekulare Marker und klassische/traditionelle Histopathologie	77
3.1.1 Ergebnisse der Mikrosatelliten-Analyse	77
3.1.2 Ergebnisse der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung.....	79
3.1.3 Ergebnisse der TP53-Sequenzierung auf den Exons 5 bis 8.....	80
3.1.4 Ergebnisse der FGFR3-SNaPshot-Sequenzierung	83
3.1.5 Ergebnisse der Immunhistochemie (CK20, p53, MIB-1)	85
3.2 Vergleich der molekularen Parameter untereinander	90
3.3 Marker und Krankheitsverlauf	92
3.3.1. Einfluss einzelner Parameter.....	93
3.3.1.1 Einfluss klinischer Daten und histopathologischer Marker	93
3.3.1.2. Einfluss molekularer Marker.....	93
3.3.2 Einfluss von Marker-Kombinationen.....	96

4 Diskussion	102
4.1. Kritische Betrachtung der verwendeten Methoden und Daten	102
4.1.1 Kritische Betrachtung der PCR-Reaktion/-Ergebnisse	102
4.1.2 Kritische Betrachtung der LOH- und MSI-Analyse	103
4.1.3 Kritische Betrachtung der UroVysion-Färbung TM für die FISH.....	105
4.1.4 Kritische Betrachtung der Verwendung von Tissue-Micro-Arrays	105
4.1.5 Kritische Betrachtung der TP53-Sequenzierung der Exons 5 bis 8	106
4.1.6 Kritische Betrachtung der FGFR3-Mutationsanalyse	107
4.1.7 Kritische Betrachtung der histopathologischen und klinischen Daten.....	107
4.2 Genetische Veränderungen als molekulare Prognosefaktoren?	109
4.2.1 Vorbemerkung zur Diskussion.....	109
4.2.2 Bedeutung von Deletionen / LOH auf dem Chromosom 8(p)	110
4.2.3 Bedeutung der p16-Deletion und Polysomie (der Chromosomen 3, 7 und 17)	111
4.2.4 Bedeutung von FGFR3-Mutationen.....	112
4.2.5 Bedeutung von Mutationen auf den Exons 5 bis 8 des TP53-Gens	114
4.2.6 Bedeutung der Immunhistochemie.....	119
4.2.6.1 Diskussion der Ergebnisse von CK20	119
4.2.6.2 Diskussion der Ergebnisse von p53	120
4.2.6.3 Diskussion der Ergebnisse von MIB-1.....	122
4.2.7 Bedeutung von Markerkombinationen/molekularem Grading	125
4.2.8 Schlussbemerkung zur Diskussion.....	127
5 Zusammenfassung und Ausblick	130
5.1 Zusammenfassung	130
5.2 Ausblick.....	133
6 Quellenverzeichnis.....	135

7 Anhang	149
7.1 Abkürzungsverzeichnis	149
7.2 Danksagung	155
7.3 Lebenslauf	156
7.4 Eidesstattliche Erklärung	158

1 Einleitung

1.1 Das Urothelkarzinom der Harnblase

1.1.1 Epidemiologie, Ätiologie und Pathogenese

Das Harnblasenkarzinom ist die fünfthäufigste Tumorerkrankung des Menschen, beim Mann an vierter Stelle (nach Lungen-, Prostata- und Kolonkarzinom) und bei der Frau an zehnter Stelle. Insgesamt macht es zwei bis drei Prozent aller malignen Tumoren aus. Bei einer Inzidenz von 20/100.000 pro Jahr und zirka 15/100.000 Neuerkrankungen pro Jahr in Deutschland liegt das Maximum zwischen dem 65. und 75. Lebensjahr mit einer deutlichen Geschlechtsverteilung von 3-4:1 zuungunsten der Männer. Neben Alter und Geschlecht spielen bei der Entstehung des Harnblasenkarzinoms vor allem Nikotinabusus, chronische Zystitis, aromatische Amine sowie Medikamente und Bestrahlungstherapie im kleinen Becken eine Rolle.

In der Bundesrepublik sind mehr als 95% aller Harnblasenkarzinome urothelialen Ursprungs. Seltener sind Plattenepithelkarzinome, Adenokarzinome sowie das anaplastische Karzinom (Müller, 2003). Deshalb bezieht sich diese Dissertation auf Harnblasenkarzinome urothelialen Ursprungs.

1.1.2 Morphologie und Histopathologie der Urotheltumoren der Harnblase

Die bei Erstdiagnose eines Harnblasentumors am häufigsten gefundene Entität stellen die **papillären Tumoren** dar. Charakteristisch ist das exophytische Wachstum (Abb. 1) mit fingerförmigen Verzweigungen, die mikroskopisch betrachtet ein fibrovaskuläres Stroma zeigen, das von beiden Seiten mit Urothelzellen bedeckt ist. Sie können beträchtliche Größen annehmen und dabei einzeln oder zusammen mit anderen papillären Tumoren auftreten. Dabei zeigt diese Tumorart ein geringes malignes Potential und ein vermindertes aggressives Verhalten bei einem allerdings hohen Rezidivrisiko. Aus dem anfangs rein oberflächlich wachsenden papillären Tumor kann sich mit zunehmender Aggressivität auch ein invasiver, in die Tiefe des Gewebes wachsendes Urothelkarzinom mit hohem Malignitätsgrad entwickeln (Grignon, 1997).

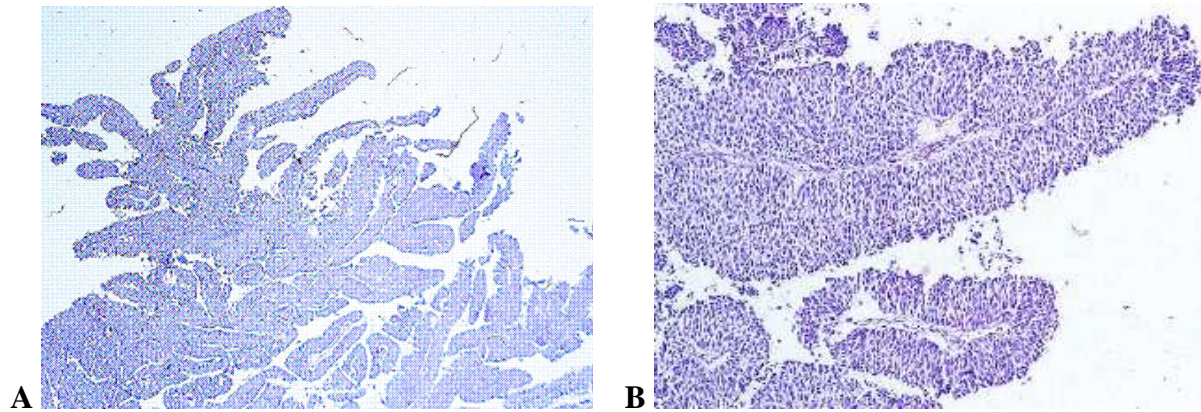


Abb. 1: A: papilläres Urothelkarzinom

B: papilläres Urothelkarzinom, Ausschnitt

Das **Carcinoma in situ (CIS)** hingegen besitzt grundsätzlich ein hohes malignes Potential mit einer schnellen Progression hin zu einem soliden invasiven Tumor. Es tritt meist synchron mit anderen Tumoren in der Harnblase auf, wobei die Häufigkeit dem fortgeschrittenen Ausbreitungs- und Malignitätsgrad der begleitenden Tumoren entspricht (Grignon, 1997). Sein nicht-papilläres, nicht-infiltrierendes, flaches, oberflächliches Wachstumsmuster erkennt man an der komplett aufgehobenen Zellschichtung und an der fehlenden Abgrenzbarkeit von superfizialen Zellen. Verminderte Zelladhäsion in den oberen Schichten führt zum Abschilfern der Tumorzellen, so dass oftmals nur wenige maligne Zellen nachweisbar sind. Die Zellkerne sind stark vergrößert und hyperchromatisch und zeigen vergrößerte Nukleoli. Neben mehrkernigen Zellen findet man auch vermehrt Mitosen.

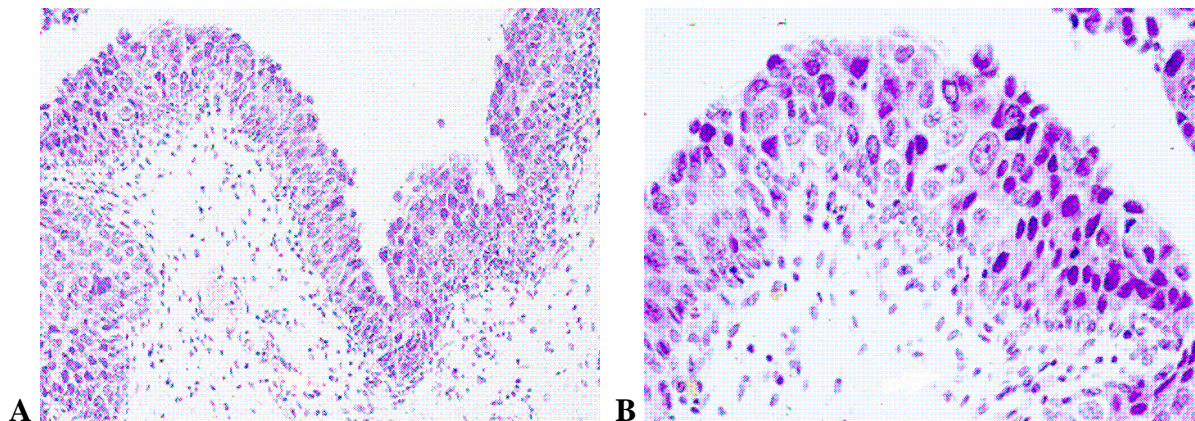


Abb. 2: A: Carcinoma in situ

B: Carcinoma in situ, Ausschnitt

Als dritte Gruppe weist das **solide, nicht-papilläre invasive Urothelkarzinom** eine hohe Variabilität in der Histologie auf und besitzt meist einen hohen Differenzierungsgrad. Die Tumorzellen zeigen vermehrt vergrößerte, pleomorphe und hyperchromatische Zellkerne mit

teils bizarrer Morphologie. Auffällig ist weiterhin eine sehr hohe Mitoserate, welche das hohe Malignitätspotential dieses Tumortyps unterstreicht (Grignon, 1997).

Harnblasentumoren entwickeln sich vor allem an Urothelstellen, die lange in Kontakt mit kanzerogenen Noxen im Urin stehen. Damit lässt sich auch folgende statistische Verteilung erklären: Seitenwand 46%, Hinterwand 18%, Trigonum 13%, Blasendach 9%, Vorderwand 8%, Blasen Hals 6% (Helpap, 1993). Tumoren, die an Stellen gefunden werden, die weniger in Kontakt mit Urin kommen, können neben der de-novo-Entstehung auch durch Kontakt mit in der Blase gegenüberliegenden Tumoren entstehen, wie das vor allem nach der Blasenentleerung der Fall ist.

1.1.3 Klassifikationen

Zur Tumorausbreitungsdiagnostik (Staging) wird die TNM-Klassifikation verwendet. Sie beschreibt die Ausbreitung des Primärtumors, die bereits erfolgte Metastasierung in regionäre Lymphknoten und das Vorhandensein von Fernmetastasen. Die Ausbreitung des Tumors kann mit verschiedensten klinischen Verfahren bestimmt werden, präzise aber nur anhand von Operationspräparaten und deren histologischer Aufarbeitung. Eine derartige Aufarbeitung wird durch das Präfix p (für postchirurgisch/pathologisch) gekennzeichnet.

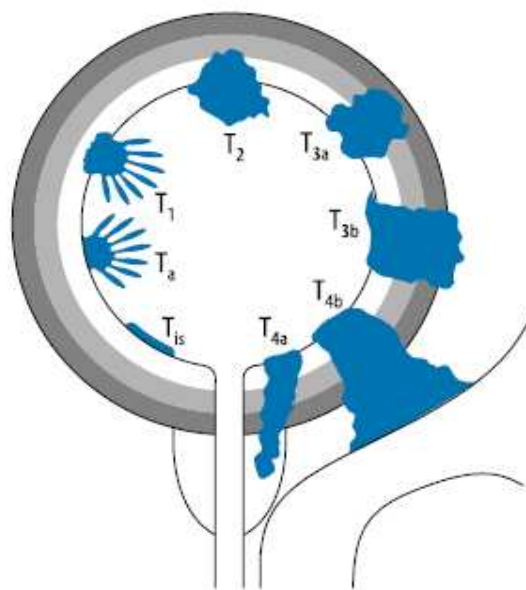


Abb. 3: Blasen tumorstadien im TNM-System: *Ta*, *Tis*, *T1–T4* bedeuten unterschiedliche Infiltrationstiefe, *N0–N+* beurteilen die lymphogene Metastasierung, *M0–M+* beurteilen die Fernmetastasierung (aus: Gasser et Rutishauser, 2006)

T - Primärtumor

TX	Primärtumor kann nicht beurteilt werden
T0	kein Nachweis des Primärtumors
Ta	nicht-invasiver papillärer Tumor
Tis	Carcinoma in situ: „flacher Tumor“
T1	Tumor infiltriert das subepitheliale Bindegewebe
T2	Tumor infiltriert die Muskulatur:
T2a	Tumor infiltriert die oberflächliche Muskulatur (innere Hälfte)
T2b	Tumor infiltriert die tiefe Muskulatur (äußere Hälfte)
T3	Tumor infiltriert das perivesikuläre Gewebe:
T3a	mikroskopisch
T3b	makroskopisch (extravesikale Masse)
T4	Tumor infiltriert eine der folgenden Strukturen: Prostata, Uterus, Vagina, Beckenwand, Bauchwand:
T4a	Tumor infiltriert Prostata, Uterus oder Vagina
T4b	Tumor infiltriert die Beckenwand oder die Bauchwand

N - Lymphknoten

NX	regionale Lymphknoten können nicht beurteilt werden
N0	keine regionalen Lymphknoten-Metastasen
N1	Metastase in einem einzigen Lymphknoten 2 cm oder weniger in der größten Ausdehnung
N2	Metastasen in einem einzigen Lymphknoten größer als 2 cm aber kleiner als 5 cm in der größten Ausdehnung
N3	Metastasen in Lymphknoten mit einer Größe von mehr als 5 cm in der größten Ausdehnung

M - Fernmetastasen

MX	Fernmetastasen können nicht beurteilt werden
M0	keine Fernmetastasen
M1	Fernmetastasen

Im Bereich der molekulargenetischen Forschung am Harnblasenkarzinom gibt es zunehmend Erkenntnisse, die helfen, das morphologische Bild besser zu verstehen und anders zu klassifizieren. Wegweisend und zielführend wird dieses Wissen nur dann sein, wenn es mit dem klinischen Verlauf der Harnblasentumoren und der Histopathologie korreliert werden kann, sodass weltweit Studien miteinander verglichen und Risikoprofile stratifiziert werden können. Durch weitere Forschung im Bereich der Molekulargenetik kann sich eine Verfeinerung dieser Schemata ergeben, beispielsweise eine immunhistochemische Subklassifizierung, um

potentiell genetisch instabile Tumoren herauszufiltern. Um diesem Rechnung zu tragen, beabsichtigte die Weltgesundheitsorganisation (WHO, World Health Organization) und die Internationale Gesellschaft für Urothologie (ISUP, International Society of Urological Pathology), 1998 eine neue Klassifikation herauszugeben. Diese wurde (über Zwischenklassifikationen) im Jahr 2004 veröffentlicht und stellt sich wie folgt dar:

1973 WHO-Grading

Urothelpapillom
Grade 1: gut differenziert
Grade 2: mäßig differenziert
Grade 3: schlecht differenziert

2004 WHO-Grading

Urothelpapillom
papilläres urotheliales Neoplasma mit niedrig malignem Potential (PUNLMP)
papilläres Urothelkarzinom mit niedrigem Malignitätsgrad (low-grade)
papilläres Urothelkarzinom mit hohem Malignitätsgrad (high-grade)

Im Vergleich der WHO-Klassifikationen von 2004 mit der von 1973 lässt sich sagen:

Die Klassifikation von 1973 unterschied in ihrem Schema das Papillom von dem Urothelkarzinom Grad 1-3. Vorteile dieser Einteilung sind die weltweite Verwendung sowie Akzeptanz und der durch klinische Studien validierte Einsatz. Die Nachteile lassen sich an den folgenden drei Punkten nachvollziehen:

1. Die Kriterien für die Einteilung in Grad 1-3 sind nicht eindeutig definiert: Grad-1-Tumoren haben den geringsten Grad an Anaplasie, die mit der Diagnose Karzinom vereinbar ist; Grad 3 trifft auf Tumoren zu mit dem schwersten Grad zellulärer Anaplasie und Grad-2-Tumoren liegen dazwischen.
2. Die Definition, dass alle papillären Tumoren einem Karzinom gleichzusetzen sind, widerspricht der internationalen Erfahrung in Bezug auf Progressionsraten und Mortalität der Low-grade-Urothelkarzinome. Dies ist der Grund, warum in der WHO-Klassifikation von 2004 (= WHO/ISUP-Klassifikation 1998) die Kategorie PUNLMP eingeführt wurde.
3. Die Klassifikation von 1973 ist schwer reproduzierbar aufgrund der schlecht definierten Kriterien, daher ist die große Gruppe der Grad-2-Tumoren unzureichend charakterisiert.

Zudem werden die PUNLMP mit ihrem gutartigen Verlauf mit geringsten Progressionsraten nicht mehr als Karzinom, sondern lediglich als Neoplasie klassifiziert.

Kennzeichnend für die WHO-Klassifikation von 2004 ist - im Gegensatz zur Klassifikation von 1973 - die Tatsache, dass die pT1-Tumoren nunmehr ausdrücklich als invasive Urothelkarzinome bezeichnet werden sollen. Eine Einteilung in oberflächliche und muskelinvasive Urothelkarzinome, die einer klinischen Bezeichnung entspricht, ist daher obsolet. Vielmehr sollten die Termini nicht-invasiv und invasiv verwendet werden (Seitz et al., 2005).

In den aktuellen Guidelines der European Association of Urology (EAU) vom März 2008 wird empfohlen, beide Klassifikationen noch nebeneinander zu verwenden, bis die neue WHO-Klassifikation von 2004 validiert ist.

Da die Daten für diese Dissertation aus den Jahren vor 2004 stammen, und auch die Mehrzahl der bisher veröffentlichten Studien die WHO-Klassifikation von 1973 verwendet, wird letztgenannte für die hier vorliegende Dissertation angewandt.

Dabei entspricht das Stadium pT1G3 nach der WHO-Klassifikation von 1973 dem invasiven Urothelkarzinom mit Invasion der Lamina propria (high-grade); eine eindeutige Zuordnung des Stadiums pT1G2 zu low-grade oder high-grade nach der WHO-Klassifikation von 2004 ist hingegen nicht möglich (Montironi et al., 2005).

1.1.4 Molekulargenetik

Die jetzige WHO-Klassifikation von 2004 wurde von molekulargenetischen Daten beeinflusst, welche schon bei anderen Organen geholfen haben, die jeweilige Klassifikation zu präzisieren. Beim Urothelkarzinom der Harnblase besteht insbesondere die Herausforderung, eine objektive Vorhersage zu treffen, welcher Patient mit einem nicht-muskelinvasiven Karzinom (PUNLMP, Low- und High-grade-Urothelkarzinom, CIS) den Progress in ein muskelinvasives Urothelkarzinom durchmacht (Seitz et al., 2005).

Das Vorkommen des Urothelkarzinoms in verschiedenen morphologischen und histopathologischen Formen unterstützt die Hypothese, dass viele verschiedene molekulare und genetische Alterationen beteiligt sind. Fearon und Vogelstein haben 1990 beim kolorektalen Karzinom einen mehrstufigen Prozess beschrieben, bei dem es zu einer Akkumulation zahlreicher genetischer Alterationen kommt (Bender et Jones, 1998).

Analog dazu wurde versucht, den langwierigen, mehrstufigen Prozess bei der Entstehung des Harnblasenkarzinoms in ähnlicher Form darzustellen:

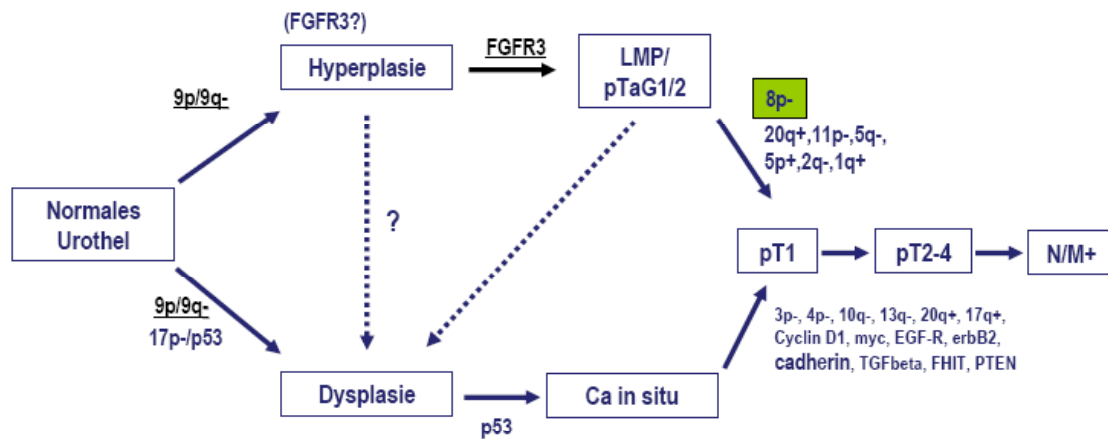


Abb. 4: Molekulare Veränderungen in der Mehrstufenkarzinogenese des Harnblasenkarzinoms (modifiziert nach Stöhr et al., 2004)

Es ist unwahrscheinlich, dass ein einziger molekularer Marker zwischen „gut“ und „böse“ unterscheiden kann - vor dem Hintergrund der Komplexität der Interaktionen, die auf molekularer Ebene derzeit aufgedeckt werden. Auch die Mitglieder des Consens Panel der WHO-Klassifikation von 2004 dokumentierten im „blue book“ über die wohl am besten untersuchte Alteration im TP53-Gen: „p53 alterations do not sufficiently well discriminate good and poor prognosis groups in properly staged bladder cancers to have clinical utility“ (Sauter et al., 2004). Dennoch sind sich die gleichen Autoren darüber einig, dass es zwei Subgruppen von urothelialen Neoplasien mit einem eindeutig unterschiedlichen klinischen Verlauf gibt: auf der einen Seite die genetisch stabilen Tumoren, zu denen die PUNLMP und die nichtinvasiven Low-grade-Urothelkarzinome gehören; auf der anderen Seite die genetisch instabilen Tumoren mit den nicht-invasiven (auch CIS) und invasiven High-grade-Karzinomen. Abb. 5 können vermutete Genalterationen bei der Karzinogenese und Progression der Harnblasentumoren entnommen werden.

Gene, die ein entsprechendes Potential für eine molekulare Klassifikation haben könnten, sind alterierte Onkogene, Tumorsuppressor-Gene, Wachstumsfaktoren, Wachstumsfaktorrezeptoren und Gene, die den Zellzyklus beeinflussen. Spezifische Moleküle mit verändertem Expressionsmuster in Blasen Tumoren sind in der Literatur mehrfach beschrieben worden. Dazu gehören u. a. *Her2/neu*, EGFR, H-ras, MDM2, p53, p63, Ki-67, FGFR3, CD44, Cytokeratin 20, PTEN, RB1, Cyclin D1, p15, p16, p21 oder p27 (Sauter et al., 2004) (Parker et al., 2003).

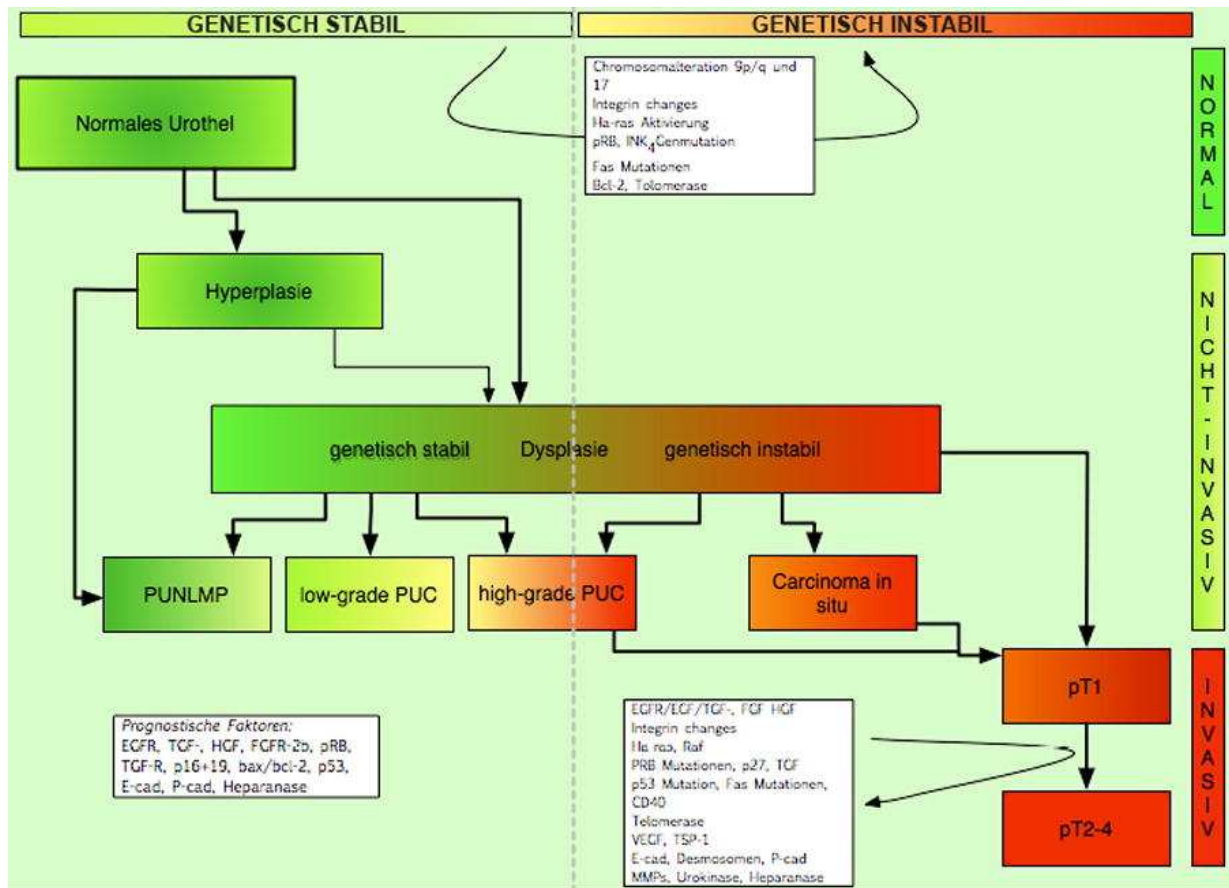


Abb. 5: Beteiligte Genalterationen bei der Karzinogenese und Progression der Harnblasentumoren (aus Seitz et al., 2005)

Bisher wurden dabei vor allem zu folgenden molekulargenetischen Veränderungen Arbeiten durchgeführt:

1.1.4.1 Chromosomale Aberrationen

Hierbei lassen sich numerische Chromosomenveränderungen, wie Monosomien und Trisomien, von strukturellen Chromosomenaberrationen (Deletionen) unterscheiden. Mit dem Harnblasenkarzinom sind eine Vielzahl von chromosomalen Deletionen assoziiert und deuten darauf hin, dass wichtige Tumorsuppressorgene in diesem Bereich angesiedelt sind (Bender et Jones, 1998).

Hier eine Zusammenfassung einiger bisher untersuchten Alterationen:

Alteration	Kommentar
Chromosom:	
Verlust von 9 und Y	alle Stadien und Grades
Zugewinn von 1p, 8pq, 20q	häufigste genetische Alterationen beim Urothel-Ca
Verlust von 8p, 9pq, 11p	
Verlust von 9q u. Zugewinn von 11q13	papillärer Typ Ta-Tumoren
Verlust von 9pq, 2q, 11pq, 10q, 17p	häufiger bei T1-Tumoren
Zugewinn von 1q, 3pq, 5p, 6p, 8q, 10q	
Deletion von 5q, 6q, 15q	häufiger bei \geq T2-Tumoren
Zugewinn von 3q, 5p, 7p, 10p, 18p, 20q	
1q+, 2q-, 10q-, 11p-	häufiger bei T1-Grade 2 als bei Ta-Grade 2-Tumoren
	häufiger bei Ta-Grade 3 als bei Ta-Grade 2 Tumoren
10p+, 6p+, 5q-, 6q-, 18q-	
8p22	häufiger bei T1-Tumoren
8q24	häufiger bei $>$ T2-Tumoren
Amplifikation:	
1q22-24, 3p22-24, 5p15, 6p22, 8q22.3, 10p12-14, 11q13, 12q15-21, 13q31-33, 17q12, 17q22, 18p11, 19q13, 20q13, xp21, xp11-13	

Tab. 1: Allgemeine genetische Alterationen, die durch CGH (Comparative Genomic Hybridization) detektiert wurden (nach Mhaweck-Fauceglia et al., 2006)

1.1.4.2 Klonalität multifokaler Harnblasenkarzinome

Stöhr (2002) wies in seiner Dissertation eine Pseudomonoklonalität nach. Dabei zeigte sich in den überwiegenden Fällen eine monoklonale Erkrankung mit einem dominanten Tumorklon, der sich vermutlich via intraepithelialer Migration ausbreitet. Diese kontinuierliche Ausbreitung des Tumors führt zu einer Multifokalität bis hin zu einer panurethralen Tumorerkrankung. Oligoklonalität tritt bei frühen Tumoren oder Tumorstufen auf. Im Verlauf der Tumorprogression kommt es zur klonalen Expansion des dominanten Tumorklons und zur Ausbildung eines monoklonalen Krankheitsbildes.

Die Untersuchungen zu chromosomalen Alterationen in prä-malignen Urothelläsionen ergaben, dass auf molekularer Ebene eine eindeutige Trennung beider Entstehungswege des Urothelkarzinoms (papillär versus flach) nicht möglich ist.

1.1.4.3 Tumorsuppressorgene

Tumor-suppressorgene	Locus	Genalteration	Häufigkeit der Mutationen und Deletionen (%) ^a / Verlust der Proteinexpression mittels IHC (%)	Assoziation mit dem Tumorverhalten	Funktion	vermuteter prognostischer Wert
FHIT	3p11	Deletion/ Promoter- Methylierung	Deletion 25; Methylierung, 16/50-70		Apoptose- regulation	ungünstiges Patienten- überleben
sFRP1	8p12	Promoter- Methylierung	Methylierung 29 ^b /66		Antagonist am Wnt- Pathway	Gesamtüberleben
TSC1	9q34	Mutation	6-12	niedriges Stadium und Grade	Regulierung der Zellpro- liferation	Rezidive bei den oberflächlichen Tumoren
KISS1	1q32	Deletion	—/62 (ISH)	spätes Stadium	Metastasen- suppressor	Vorhersage von ungünstigem Outcome?
RAF1	3p25	Deletion	2-15		Signaltrans- duktion, Proliferation	Progression der T1-Tumoren?
KAI/CD82	11p11	Deletion	—/38	spätes Stadium		Ta/T1-Rezidiv- vorhersage?
ARHGDI B	12p12	Deletion/ Mutation	—/14		Metastasen- suppressor	Sterblichkeits- bezug?
CD9	12p13	Deletion	—/62-49		Regulation der Zell- motilität	Progressionsvor- hersage von Ta/T1-Tumoren
p33ING1	13q34	Deletion			Zellpro- liferation	Gesamt- überleben?
RAD51	15q15	Deletion			DNS- Reparatur	unbekannt
E-cadherin	16q22.1	Hyper- methylierung	Methylierung 35/60-80	spätes Stadium	Zelladhäsion	schlechtes Patien- tenüberleben
nm23-H1	17q21	Deletion/ Mutation	—/40-15	spätes Stadium	Metastasen- suppressor	widersprüchliche Ergebnisse

Tab. 2: Tumorsuppressorgene beim Urothelkarzinom der Harnblase (modifiziert nach Mhawech-Fauceglia et al., 2006);

Legende: FHIT: fragiles Histidin-Triad-Gen; sFRP1: secreted frizzled-related Protein 1; TSC1: tuberöser Sklerose-Komplex (tuberous sclerosis complex) 1; KISS1: Metastasensuppressor 1; RAF1: Maus-Leukämie-Virus-Onkogen homolog, (murine leukemia viral oncogene homologue) 1; KAI/CD82: Prostatakarzinom-Antimetastasengen (prostate carcinoma antimetastasis gene) Kangai 1; ARHGDI B: P-GDP Dissoziation-Inhibitor β; CD9: Leukozytenantigen MIC3/CD9; p33ING1: Wachstumsinhibitor 1 (inhibitor of growth 1); RAD51: cerevisiae homolog; nm23-H1: Nichtmetastasenzelle (nonmetastasis cell) 1.

^a Amplifikation mittels FISH

^b durchgeführt mittels quantitativer PCR-Analyse

Tumorsuppressorgene wirken hemmend auf die Zellteilung durch Regulation des Zellzyklus ein. Es wird angenommen, dass die Inaktivierung und damit der Funktionsverlust von Tumorsuppressorgenen eine wesentliche Rolle in der Initiation und Progression des Harnblasenkarzinoms spielt. Man geht bei der Inaktivierung von dem Modell nach Knudson, der sogenannten Two-hit-Hypothese, aus: Dabei weist ein Allel bereits eine Keimbahnmutation auf („first hit“), während das zweite Allel durch somatische Deletion verloren geht („second hit“). Möglich ist aber auch die Inaktivierung beider Allele durch Kombination verschiedener somatischer Alterationen, wie z. B. Punktmutation oder Promotormethylierung des einen Allels, gefolgt von der Deletion (LOH) des zweiten Allels (Knudson, 1971). Ein Verlust von Tumorsuppressorgenen geht oft mit einer Instabilität oder Mikrosatelliteninstabilität einher (Cahill et al., 1998). Die drei bekanntesten Tumorsuppressorgene sind p16, TP53 und RB1 (Bender und Jones, 1998). Auf TP53 wird im Rahmen der Immunhistochemie im Kapitel 1.1.4.6 eingegangen, auf p16 im Kapitel 1.1.4.8.

1.1.4.4 Onkogene

Onkogene stimulieren den Zellzyklus und fördern die Zellproliferation. Sie zeigen dabei ein dominantes Verhalten, d. h. ein betroffenes Allel reicht bereits für den Effekt auf den Zellzyklus aus. Als Beispiel möge das H-ras-Onkogen dienen, das für ein membran-assoziiertes Signaltransduktionsmolekül kodiert. Eine erhöhte ras-Expression wurde in hochgradigen Blasen Tumoren, bei Dysplasien sowie beim Carcinoma in situ der Harnblase festgestellt (Viola et al., 1985). Obwohl durch immunhistochemische Analysen die Überexpression von verschiedenen Onkogenen in Harnblasentumoren nachgewiesen wurde, scheinen nur wenige (wie z. B. FGFR3) eine Rolle bei der Karzinogenese des Urothelkarzinoms zu spielen.

(Proto-) Onkogen	Locus	Genalteration	Häufigkeit der Mutationen und Deletionen (%)^a / Verlust der Proteinexpression mittels IHC (%)	Assoziation mit dem Tumorverhalten	Funktion	vermuteter prognostischer Wert
TP73L, Ap63	3q27	Promotermethylierung	63 ^b /16-68		Zellreifung/differenzierung	ungünstige Prognose
EGFR-1	7p12	Amplifikation/Überexpression	4.60/23-100		Rezeptorproteintyrosinkinase	ungünstige Prognose/Ziel für medikamentöse Therapie?
ERBB2	17q21	Amplifikation/Überexpression	2-7/37-57	invasive Tumoren	Rezeptorproteintyrosinkinase	Überleben, anti-Her2/neu-Therapie?

(Proto-) Onkogen	Locus	Genalteration	Häufigkeit der Mutationen und Deletionen (%) ^a / Verlust der Proteinexpression mittels IHC (%)	Assoziation mit dem Tumorverhalten	Funktion	vermuteter prognostischer Wert
STK15	20q13	Amplifikation/Überexpression	35/20	invasive Tumoren	Zentrosomen-Duplikation	Gesamtüberleben, metastasenfreies Intervall
TRIO	5p15	Amplifikation/Überexpression	1.5-17.0		Zellzyklus, Proliferation, Zell-Zell-Interaktionen	keinen?
E2F-3	6p22	Amplifikation/Überexpression	7-11.3/33-70	invasive Tumoren	Zellzyklus, DNA-Replikation	unbekannt
MET	7q31	Amplifikation/Überexpression	4.9-22.5c/5-100		Rezeptorproteintyrosinkinase	ungünstiges Langzeitüberleben
MYC	8q24	Amplifikation/Überexpression ^d	3.4-13.0/15-60	invasive Tumoren	Zellproliferation	keinen?
FGFR1	8p13	Amplifikation/Überexpression ^d	6-25		Rezeptorproteintyrosinkinase	unbekannt
FGFR3	4p16.3	Mutation	41-59/51	niedriges Stadium und Grade	Tyrosinkinase-rezeptor	günstiges klinisches Outcome, niedrige pTa-Rezidivrate
CCND1	11q13	Amplifikation/Überexpression	13-33/13-25	niedriges Stadium und Grade	Zellzyklus: G ₁ -S-Progression	keinen?
MDM2	12q13	Amplifikation/Überexpression	1-5/9-29	niedriges Stadium und Grade	Zellzyklus, p53-Kontrolle	keinen?
TOP2A	17q21		1.5-3.4/73	invasive Tumoren	DNA-Replikation	ungünstige Prognose, Ansprechen auf Chemotherapie
CDC91L1	20q11	Amplifikation/Überexpression	33-36 ^c		Urokinaserezeptor-regulation, STAT3-Aktivierung?	krankheitsbezogener Tod
H-ras	11p15.5	Überexpression		hohes Grade	Zellzyklus	Progressions-, Rezidivindikator?

Tab. 3: Onkogene beim Urothelkarzinom der Harnblase (modifiziert nach Mhawech-Fauceglia et al., 2006);

Legende: IHC: Immunhistochemie; TP73L, Δp63: Tumorprotein p63-ähnlich (like); EGFR-1: epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor (epidermal growth factor receptor) 1; ERBB2: Her2/neu; STK15: Serin-/Threonin-Proteinkinase 15; TRIO: Triple-Funktionsdomäne; E2F-3: E2F-Transkriptionsfaktor 3; MET: Hepatozytenwachstumsfaktor-Rezeptor (hepatocyte growth factor receptor); MYC: v-myc Myelomastozytose-Onkogen homolog; FGFR1 bzw. 3: Fibroblastenwachstumsfaktor-Rezeptor (fibroblast growth factor receptor) 1 bzw. 3; CCND1: Cyclin D1; MDM2: Maus-doppelt-Minute (mouse-double minute) 2 homolog; TOP2A: DNA-Topoisomerase II; CDC91LI: Zellzyklus-Division (cell cycle division) 91, homolog-ähnlich (like); STAT3: Signaltransformer und -transkriptionsaktivator (signal transducer and activator of transcription) 3.

^a Amplifikation mittels FISH

^b durchgeführt mittels quantitativer PCR-Analyse

^c Amplifikation mittels Northern-blot-Analyse und reverser Transkriptase-PCR-Analyse.

^d Es existierte keine Assoziation zwischen Amplifikation und Überexpression.

1.1.4.5 FGFR3-Mutationen bei Harnblasentumoren

Fibroblastenwachstumsfaktoren (fibroblast growth factors) gehören zu einer Familie multifunktionaler Wachstumsfaktoren und sind an einer Vielzahl von zellulären Vorgängen wie Proliferation, Differenzierung (v.a. in Fettzellen und Neuronen), Angiogenese oder Wundheilung beteiligt (Keegan et al., 1991). Sie werden von spezifischen Rezeptoren (FGFR) als Ligand gebunden, um das Signal von den FGF-Rezeptoren ins Zellinnere zu übertragen.

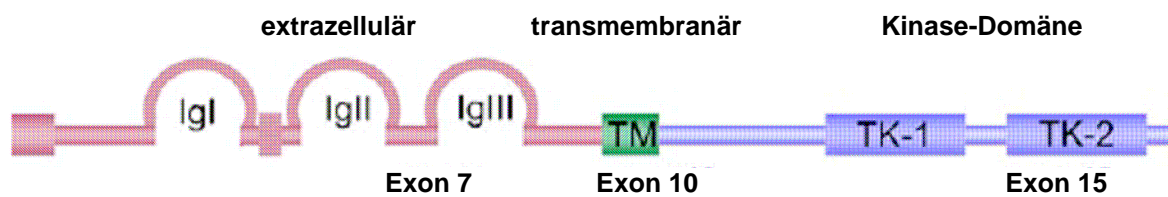


Abb. 6: Positionen der FGFR3-Mutationen bei Blasenkarzinomen (nach Knowles, 2007);

Legende: IgI, IgII, IgIII: Immunglobulin ähnliche Domänen; TK-1, TK-2: geteilte Tyrosinkinase-Domänen

FGF-Rezeptoren gehören zur Tyrosin-Kinase-Rezeptor-Familie, aufgebaut aus einer extrazellulären Domäne mit zwei oder drei „immunglobulin-like“ Domänen, einer Transmembrandomäne und einer zytosmatischen Tyrosin-Kinase-Domäne.

Das FGFR3-Gen besitzt 19 Exons, die 16,5 kb genomische Sequenz umspannen. Die Lokalisation wurde auf Chromosom 4p16.3 bestimmt. Spezifische Mutationen in FGFR3, die die Tyrosin-Kinase-Domäne betreffen, führen zu einer konstitutiven Aktivierung des Rezeptors, unabhängig von der Ligandenbindung. Diese aktivierenden Mutationen wurden bei Patienten mit Achondroplasie und thanatophorem Zwergwuchs beobachtet. Die konstitutive Aktivierung des Rezeptors führt zu einem verfrühten Schließen der Wachstumsfugen und damit zu einem verminderten Längenwachstum der Röhrenknochen (Extremitäten) bis hin zu letalen Skelettveränderungen (Rousseau et al., 1995).

Cappellen et al. (1999) beschrieben diese spezifischen FGFR3-Mutationen (Exon 7: Codon 248: CGC => TGC; Codon 249: TCC => TGC; Exon 10, Codon 372: GGC => TGC und Exon 15, Codon 652: AAG => GAG) zum ersten Mal in einem hohen Prozentsatz in Harnblasentumoren (35%) und Zervixkarzinomen (25%). Alle beschriebenen Mutationen sind somatische Veränderungen (Spontanmutationen), Keimbahnveränderungen bei Tumorpatienten wurden bisher nicht festgestellt. Weitere Studien zeigten eine Korrelation von FGFR3-Mutationen mit einem verminderten Rezidivrisiko beim Harnblasenkarzinom (van Rhijn et al., 2001). Billerey et al. (2001) fanden FGFR3-Mutationen in einem signifikant hohen Zusam-

menhang mit dem oberflächlichen pTa-Stadium von Urotheltumoren, jedoch nicht mit fortgeschrittenen invasiven Tumoren (pT1-4) oder flachen Neoplasien. Weitere Arbeiten zeigen, dass FGFR3-Alterationen sehr spezifisch und fast ausschließlich in Urotheltumoren zu finden sind und nur zu einem sehr geringen Teil in anderen Tumortypen (Karoui et al., 2001; Sibley et al., 2001b). Weiterhin konnte kein Zusammenhang zwischen Chromosom-4p-Deletionen und FGFR3-Mutationen festgestellt werden (Sibley et al., 2001a).

Die aktivierenden somatischen Mutationen von FGFR3 scheinen damit ein potentielles, initiales Schlüsselereignis in der Entwicklung des oberflächlichen papillären Harnblasenkarzinoms ohne schnellen Progress darzustellen, das mit einer guten Prognose für den Patienten verbunden ist. Statistisch gesehen ist FGFR3 das am häufigsten mutierte, bekannte Onkogen beim nicht-invasiven pTa-Tumor der Harnblase. FGFR3 könnte somit ein sehr viel versprechendes Target für die Routine-Nachsorge von Tumorpatienten bei bekannter FGFR3-Mutation im Primärtumor darstellen (Stöhr, 2002).

1.1.4.6 Immunhistochemische Marker (CK20, p53, MIB-1, andere)

Cytokeratin 20 (CK20)

CK20 ist ein sensitiver immunhistochemischer Marker für die urotheliale Differenzierung. Im Normalurothel wird er nur in den „umbrella cells“, den oberflächlichen, zum Lumen hin stehenden Zellen, exprimiert, nicht in den Basalzellen. Eine Veränderung dieses spezifischen Expressionsmusters weist auf urotheliale Differenzierung hin. Dabei kommt es zur diffusen Expression von CK20 in fortgeschrittenen Tumoren und z. T. zum Verlust des Proteins. CK20 gehört zu einer Gruppe von zytoskelett-assoziierten Intermediärfilamenten (Moll et al., 1992). Es wird im Gastrointestinaltrakt, im Urothel und in Merkelzellen exprimiert (Miettinen, 1995). Van Oers et al. zeigten im Jahr 2007 in ihrer Arbeit, dass eine normale CK20-Färbung zusammen mit einer FGFR3-Mutation nicht-invasive low-grade Urothelkarzinome der Blase definiert.

p53

Das TP53-Tumorsuppressorgen ist auf dem Chromosom 17p13.1 lokalisiert und besteht aus 11 Exons. Diese erstrecken sich auf 20 kb DNA und kodieren ein aus 393 Aminosäuren bestehendes 53 kD großes Nukleärprotein (Isobe et al., 1986). Die Schreibweise „TP53“ steht dabei für das Gen, „p53“ für das dadurch kodierte Protein. Dieses erfüllt verschiedenste

biologische Funktionen und ist bei folgenden Prozessen beteiligt: Zellzyklusregulation, programmierter Zelltod, Seneszenz, Differenzierung und Entwicklung, Transkription, DNA-Replikation und -Reparatur sowie Aufrechterhaltung der genomischen Stabilität (Hainaut et Hollstein, 2000). Missense-Mutationen können Veränderungen in der Tertiärstruktur des Proteins bewirken, indem sie mit der p53-Fähigkeit, an Erkennungssequenzen zu binden (Kern et al., 1991) und/oder die Transkription zu aktivieren (Fields et Jang, 1990) (Raycroft et al., 1990), interferieren. Die Mutationen sind an den verschiedensten Positionen lokalisiert und von unterschiedlichster Natur. Obschon Mutationen außerhalb der durch die Evolution konservierten Regionen gefunden werden, kann die Mehrzahl der Mutationen innerhalb dieser auf den Exons 5 bis 8 lokalisiert werden (Greenblatt et al., 1994) (Hainaut et Hollstein, 2000).

Eine Zunahme der p53-Expression im immunhistochemischen Nachweis soll im Allgemeinen mit einem invasiveren Wachstum und einer schlechteren Prognose für den Patienten einhergehen (Knowles, 1998). Ein Nachweis der Expression wird dadurch ermöglicht, dass bei einer Mutation des TP53-Gens das p53-Protein in veränderter Struktur auftritt und nicht abgebaut werden kann (Vet et al., 1995). Ein weiterer Grund für den Nachweis kann aber auch die Überexpression des Wildtypproteins als Reaktion auf genotoxische Einflüsse sein. Das mutierte p53-Protein ist stabiler und besitzt eine verlängerte Halbwertszeit. Es wird in der immunhistochemischen Färbung stärker markiert als das Wildtypprotein (Finlay et al., 1988). Es besteht eine Assoziation zwischen immunhistochemischer Anfärbung von p53 und dem Vorhandensein einer Mutation im TP53-Gen (Esrig et al., 1993). Eine Akkumulation des p53-Proteins zeigt eine Veränderung der Zelle an und ist ein unspezifischer Marker für Malignität (Hall et al., 1991). In Urothelkarzinomen ist die Expression von p53 in der immunhistochemischen Färbung in bis zu 40-60% positiv (Wright et al., 1991). Viele Untersuchungen zeigen eine positive Korrelation zwischen der Expression von p53 und pathologischen Indikatoren für die Progression (high-grade und -stage) in Harnblasentumoren (Popov et al., 1997) (Uchida et al., 1995) (Cina et al., 2001).

MIB-1

Im Jahre 1983 wurde der monoklonale Antikörper Ki-67 eingeführt, der die Proliferationsfraktion in Tumoren widerspiegelt (Ki steht für Kiel und weist auf das Institut für Pathologie der Kieler Universitätsklinik hin). Dieser Antikörper markiert ein nukleäres Nonhistonprotein von 395 und 345 kD. Dieses Protein wird in proliferierenden Zellen in allen Zellzyklusphasen (G₁, S, G₂, M) exprimiert, außer in ruhenden Zellen der G₀-Phase (Gerdes et al., 1983, 1984

und 1991). Der monoklonale Antikörper Ki-67 kann nur in frisch tiefgefrorenem Material verwendet werden. Durch Verwendung eines rekombinanten monoklonalen Antikörpers, MIB-1, können inzwischen auch formalinfixierte, in Paraffin eingebettete Gewebe angefärbt werden. Dabei steht MIB für „made in Borstel“, ebenfalls in Schleswig-Holstein. MIB-1 markiert dasselbe nukleäre Antigen wie Ki-67 und ist ein Marker für proliferierende Zellen (Cattoretti et al., 1992).

Auch im Harnblasenkarzinom ist die Expression von MIB-1 ein Marker für Proliferation. Die Expression von MIB-1 in pTa- und pT1-Tumoren soll ein prognostischer Faktor in Bezug auf das rezidivfreie Überleben sein (Oosterhuis et al., 2000).

weitere immunhistochemische Marker

Zahlreiche andere immunhistochemische Marker wurden bereits mit unterschiedlichen Resultaten untersucht. Einige Beispiele seien hier genannt:

MSH2, MSH6, MLH1 sind als Mismatch-Repair-Proteine für die Reparatur von genetischen Fehlern zuständig. Bei Mutationen kommt es gehäuft zu Tumoren. Als bekanntestes Beispiel gilt das HNPCC-Syndrom, bei dem bereits in jungen Jahren gehäuft Kolonkarzinome auftreten. Dabei kommt es neben dem Verlust der Expression von Mismatch-Repair-Proteinen zum Auftreten von Mikrosatelliteninstabilitäten.

Der Verlust bzw. die Reduktion der Expression von **p27kip1** und die Überexpression von **Cyclin D1** und **Cyclin D3** wurden ebenfalls als relevante Prädiktoren eingestuft (Lopez-Beltran et al., 2004).

Stavropoulos et al. (2001) vermuten, dass der Verlust der **CD44**-Expression ein nützlicher Marker in der Kurzzeitprognose von pTa/pT1-Tumoren sein kann. Toma V. et al. zeigten dagegen 1999 noch, dass dies allein für pTa-Tumoren zutrifft, jedoch nicht bei minimal-invasiven pT1-Karzinomen.

Auch **nm23-H1**, ein fragliches Metastasen-Suppressor-Gen, könnte eine wichtige Rolle als Invasionssuppressor der Karzinogenese spielen, was aber noch weitere prospektive Studien erfordert (Chow et al., 2000). Watters et al. (2001) konnten keinen Beweis für eine Assoziation zwischen dem Verlust von **NAT2**, der N-Acetyltransferase 2, einem polymorphen Enzym, welches aromatische Amine metabolisiert, und dem Risiko der Progression feststellen. NAT2 ist auf dem Chromosomenort 8p22 lokalisiert. Dessen LOH ist mit einem erhöhten Risiko für Harnblasenkrebs assoziiert. Daher üben vermutlich andere Gene auf diesem Chromosom einen signifikanten Einfluss auf das Fortschreiten der Erkrankung aus.

Auch soll nicht unerwähnt bleiben, dass in älteren Arbeiten Körperenzyme einen unabhängigen prognostischen Faktor für die Vorhersage des Progressionsrisikos aufwiesen. Deshpande et al. zeigten dies 1991 für die Aktivität der Laktatdehydrogenase, der Phosphofruktokinase und der Phosphohexose-Isomerase. Diese Richtung wurde bisher kaum weiterverfolgt; dagegen werden ständig neue andere Marker untersucht, allerdings mit unterschiedlichen Resultaten. Einige davon sind in den vorhergehenden Tabellen und in den Kästen der Abb. 5 in Kapitel 1.1.4 zu finden.

1.1.4.7 Bedeutung von LOH und MSI in der Karzinogenese

Das menschliche Genom enthält eine große Zahl an repetitiven DNA-Sequenzen, die sich aus unterschiedlich langen Wiederholungseinheiten zusammensetzen. Dabei werden Wiederholungseinheiten mit einer Länge von 8-50 bp als Minisatelliten (oder VNTPs: variable number tandem repeats), mit einer Länge von 2-6 bp als Mikrosatelliten (oder STRs: short tandem repeats) bezeichnet (Mao, 2000). Diese Repeats befinden sich meist innerhalb nicht kodierender DNA-Abschnitte oder in Introns, seltener in Exons.

Mikrosatelliten sind hoch polymorph, die Heterozygotie-Rate liegt bei ca. 70%. Darüber hinaus gibt es eine sehr große Anzahl dieser Repeats, die gleichmäßig über das komplette menschliche Genom verteilt sind. Durch die Wahl geeigneter, flankierender Primer lassen sich Mikrosatelliten mittels PCR amplifizieren und durch Gelelektrophorese darstellen. Dabei zeigen sich für jeden Marker zwei spezifische Allel-Banden, die individuell spezifisch sind. Beim Vergleich der Mikrosatelliten-Marker zwischen dem Normalgewebe und einem Tumor lassen sich Unterschiede, wie z. B. der Verlust einer Allel-Bande im Tumor (Deletion, Loss of Heterozygosity, **LOH**) oder das Auftreten zusätzlicher Banden bzw. die Verschiebung von Allel-Banden (band shift, Mikrosatelliteninstabilität, **MSI**) feststellen. Damit kann man charakteristische Veränderungen des Tumors oder der präkanzerösen Läsion bestimmen. Die Analyse mehrerer Mikrosatelliten-Marker erlaubt es, komplette Chromosomen hinsichtlich Alterationen zu untersuchen. Durch die Einschränkung der chromosomalen Deletionen auf eine „minimal deleted region“ lassen sich Bereiche mit potentiell wichtigen Tumorsuppressorgenen lokalisieren.

1.1.4.8 Bedeutung der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung

Diagnostisch wird die Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung weltweit eingesetzt, um definierte Chromosomen und Chromosomenabschnitte darzustellen. Sie hat sich als äußerst aussagekräftige Methode etabliert, die bei der quantitativen Analyse genetischer Alterationen in unterschiedlichsten Zellen (Sauter et al., 1994) entscheidende Vorteile bietet: Im Gegensatz zu anderen zytogenetischen Untersuchungsverfahren ist die FISH nicht an bestimmte Phasen des Zellzyklus gebunden und kann nicht nur an kondensierten Metaphasenchromosomen, sondern auch an Chromosomen der Interphase erfolgen. Dabei ist es möglich, die entsprechenden Chromosomenabschnitte „in situ“, d.h. unter Berücksichtigung der Morphologie der Zellkerne, zu beurteilen (Cremer et al., 1995). Ferner gestattet die FISH die Analyse eines breiten Spektrums verschiedenster Untersuchungsmaterialien: Neben Präparaten der Zellkultur können auch Biopsien frischen Gewebes direkt oder nach längerer Tiefkühlagerung ohne Schwierigkeiten untersucht werden (Demetrick et al., 1996). Ferner stehen inzwischen verschiedenste standardisierte Proben-DNA-Sequenzen und Fluorochrome zur Verfügung, so dass die FISH ein leicht durchführbares, zuverlässiges Verfahren mit hoher Sensitivität darstellt, weshalb sie sich im Rahmen dieser Arbeit als gute Ergänzung anbot.

1.1.5 pT1-Tumoren als Grenzfall

Die Invasion der Lamina propria (pT1) ist dadurch charakterisiert, dass urotheliale Zellen in dieser bindegewebigen Schicht nachweisbar sind. Es bleibt dem Pathologen überlassen, ob er eine Subklassifizierung dieser Tumoren in Bezug auf die Eindringtiefe des Karzinoms in Relation zur Muscularis mucosae festhalten möchte (pT1a: oberhalb der Muscularis mucosae, pT1b: in die Muscularis mucosae, pT1c: über die Muscularis mucosae hinaus bzw. pT1mic:ext). Häufig ist dies aufgrund der schlechten Qualität der Gewebsbiopsate nach einer TUR-B nicht möglich. Dennoch werden Pathologen dazu ausdrücklich ermuntert, so gut als möglich die Invasivität der Lamina propria zu beschreiben (fokal oder extensiv), da man um die prognostische Signifikanz dieser Einteilung weiß (Mhaweck-Fauceglia et al., 2007) (van der Aa et al., 2005) (Orsola et al., 2005) (Helpap, 2002). Allerdings halten Paner et al. (2007) aufgrund der Inkonsistenz einer eindeutigen Muscularis mucosae-Schicht und wegen Variationen im Gefäßplexus der Lamina propria ein Substaging für problematisch. Die Arbeit von Orsola et al. (2005) zeigte aber auch, dass die Anzahl der Fälle, bei denen dieses Substaging

möglich ist, mit der Zeit durch die vermehrte Zusammenarbeit von Urologen und Pathologen zu steigen vermag.

Festzuhalten ist, dass eine Subklassifikation in der TNM-Klassifikation nach WHO 2004 nicht vorgesehen ist. Zusätzlich wird empfohlen, dass zu jeder TUR im histologischen Befund das Vorhandensein bzw. Fehlen der Muscularis propria dokumentiert wird, um dem Urologen Rückkopplung über die Tiefe seiner Biopsie und damit über die Qualität der Entnahme zu geben (Seitz et al., 2005). Dabei gilt, dass invasive Urothelkarzinome analog zu den nicht-invasiven PUC in Low-grade- und High-grade-Formen unterteilt werden.

1.1.5.1 Besonderheit der pT1-Urothelkarzinome der Harnblase

Welche Problematik es bezüglich der Einschätzung von pT1-Tumoren gibt, zeigt schon die neue WHO-Klassifikation von 2004, die das Label „oberflächlicher Tumor“ von dieser Subgruppe nimmt und ihr eindeutig histopathologische, klinische und biologische Kennzeichen invasiver Tumoren zuschreibt. Studien zeigen, dass etwa 30% der Patienten eine verzögerte Zystektomie benötigen. Diese Patienten benötigen eine engmaschige, sorgfältige Nachsorge, wobei der organerhaltende Ansatz bei ungefähr der Hälfte der Patienten mit ursprünglichem pT1G3 akzeptabel sein soll (Thalmann et al., 2004).

Bei der Entstehung des Harnblasenkarzinoms werden zwei unterschiedliche Pfade diskutiert. Die Progression von einigen „oberflächlichen“ Tumoren (hauptsächlich pTa und vor allem pT1) zu (muskel-)invasiven High-grade-Karzinomen liefert Hinweise für Überschneidungen dieser zwei Pfade (Luis et al., 2007). Das wirft die Frage des richtigen Managements der pT1-Tumoren auf.

1.1.5.2 Bisherige Empfehlungen zum Behandlungsvorgehen

Um das kurz- und langfristige Risiko sowohl für Rezidive als auch für die Progression vorherzusagen, entwickelte die EORTC (European Organisation for Research and Treatment of Cancer) ein Punktesystem und Risikotabellen. Basis für diese Tabellen ist die EORTC-Datenbank, die individuelle Patientendaten von 2.596 Patienten mit TaT1-Tumoren enthält, die in sieben EORTC-Untersuchungen randomisiert wurden. Das Punktesystem basiert auf den

sechs meist signifikanten klinischen und pathologischen Faktoren (elektronischer Rechner online im Internet: URL: <http://www.eortc.be/tools/bladdercalculator/> - Stand 01.11.2008):

- die Anzahl der Tumoren
- die TumorgroÙe
- frühere Rezidivrate
- die T-Kategorie in der TNM-Klassifikation
- die Koinzidenz mit einem CIS
- das Tumor-Grade

Aus der gewonnenen Punktezahl können Risikogruppen für das Rezidiv bzw. die Progression abgelesen werden (je Low risk, Intermediate risk und High risk). Dabei reichen die Therapiemöglichkeiten von postoperativer Instillation oder Chemotherapie, adjuvanter intravesikaler Chemotherapie oder adjuvanter intravesikaler BCG-Instillation bis hin zur Zystektomie. Die absoluten Rezidiv- bzw. Progressionsrisiken geben dabei nicht immer das Risiko an, bei dem eine bestimmte Therapie die optimale ist. Die Therapiewahl kann unterschiedlich ausfallen, je nachdem, was für den einzelnen Patienten und Urologen akzeptabel ist.

Kulkarni et al. zeigten anhand von geschätzter Lebenserwartung und qualitätsbezogener geschätzter Lebenserwartung in ihrer Arbeit (2007) einen Vorteil durch unverzügliche Zystektomie bei pT1G3-Patienten mit einem Alter unter 70 Jahren. Deshalb vermuten die Autoren einen Benefit bei initial konservativem Vorgehen bei älteren Patienten sowie bei denen, die einen hohen Wert auf Sexual- und Verdauungsfunktion oder Blasenerhalt legen.

Rammeh-Rommani et al. veröffentlichten 2005, dass neben einem Alter über 65 Jahren eine TumorgroÙe von mehr als 3 cm und Multifokalität prädiktive Faktoren für ein Rezidiv sind. Solsona et al. (2000) kommen zu dem Ergebnis, die Entscheidung von der Evaluation im Drei-Monatsabstand nach intravesikaler Therapie abhängig zu machen. Dabei halten sie pT1G3, CIS oder Befall von Prostata-Mucosa oder Prostata-Gang als Ergebnis der Drei-Monats-evaluation für Indikationen für eine Zystektomie.

Thalmann et al. konnten keine Überlegenheit der initialen Zystektomie bei pT1G3-Patienten hinsichtlich des Überlebens finden (2004). Auch in den Empfehlungen von 2005 in „Der Urologe“ (Miller et Hautmann) heißt es: „Zusammenfassend lässt sich aus den aktuell zur Verfügung stehenden Literaturdaten kein Vorteil für eine primäre Zystektomie beim T1G3-Harnblasenkarzinom ablesen. Die Therapie mit TUR-B plus BCG bietet den Vorteil des Organerhalts, umfasst jedoch die Erhaltungstherapie, eine lebenslange Nachsorge und die schnelle sekundäre Zystektomie bei BCG-Versagern. [...] Da prospektive randomisierte Studien zu Therapie und Outcome bei pT1G3-Harnblasenkarzinomen fehlen, ist ein Thera-

pieentscheid nur anhand retrospektiver Studien oder mit Hilfe der individuellen Erfahrung des einzelnen Urologen möglich.“

Denzinger et al. kommen 2008 in einer solchen großen retrospektiven Arbeit zu dem Schluss, dass bei high-risk pT1G3-Tumoren mit zwei oder mehr Risikofaktoren (nämlich Multifokalität und/oder eine Größe $\geq 3\text{cm}$ und/oder ein gleichzeitiges CIS) eine frühzeitige Zystektomie erwogen werden sollte. Bei kleineren und unifokalen initialen pT1G3-Blasenkarzinomen ohne CIS hingegen scheint ein Organ erhaltender Ansatz gerechtfertigt zu sein. Bei CIS sollte eine rechtzeitige radikale chirurgische Therapie erwogen werden, da es zu vermindertem karzinspezifischem Überleben führt. Thalmann (2008) unterstützt dies in seinem Comment, weist jedoch auf Auswahl-Bias bei den Patienten hin.

1.2 Fragestellung und Zielsetzung der Dissertation

Wie bereits im vorherigen Kapitel erwähnt, gibt es zwar von der EORTC Tabellen zur Abschätzung von Rezidiv- und Progressionsrate von Harnblasentumoren, diese indizieren jedoch nicht, bei welchem Risiko welche Therapie die optimale ist. Die bisher analysierten prognostischen Faktoren auf dem Gebiet der Zytogenetik und der Molekularbiologie lieferten oft widersprüchliche Ergebnisse. Zudem wurden oft pTa- und pT1-Tumoren in den Studien als gemeinsame Gruppe, nämlich „oberflächliche“ Harnblasentumoren, betrachtet, ein Sammelbegriff für PUNLMP, nicht-invasive Urothelkarzinome, CIS und invasive Urothelkarzinome mit Invasion der Lamina propria, der mit der neuen WHO-Klassifikation von 2004 obsolet ist (Seitz et al., 2005). So weisen gegenwärtig nur wenige Studien den Progressionsmarkern speziell für den Grenzfall pT1G2/3 einen klinisch relevanten molekularen prädiktiven Wert als Ergänzung zu den histopathologisch-klinischen Daten zu.

Ziel dieser Inauguraldissertation soll es nun sein, einen Beitrag zur Frage zu leisten, ob neue genetische Analysen eine Hilfe bei der Entscheidung zur richtigen Indikationsstellung und zum besseren Management von pT1-Tumoren sein können.

Aufgrund von Vorarbeiten stellten sich insbesondere die LOH- und die MSI-Analysen auf dem Chromosom 8 sowie die Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung als geeignete Methoden dar. Die Ergebnisse aus diesen Untersuchungen wurden im Anschluss mit den Follow-up der Tumorpatienten korreliert. Außerdem wurden bereits erprobte, validierte Marker in den

Vergleich miteinbezogen: nämlich die TP53-Sequenzierung der Exons 5 bis 8, die immunhistochemischen Marker CK20, p53 und MIB-1 sowie die FGFR3-Mutationsanalyse.

1.2.1 Untersuchung von pT1G2/3-Tumoren mit Hilfe von LOH- und MSI-Analysen

Loss of Heterozygosity (LOH) auf dem Chromosom 8p ist ein häufiges Ereignis bei menschlichen Harnblasenkarzinomen und ist oft mit einer aggressiveren Erkrankung assoziiert (Knowles et al., 1993a) (Takle et al., 1996) (Wagner et al., 1997). Diese Ergebnisse waren der Grund, LOH- und MSI-Analysen auf Chromosom 8 bei dieser Tumorentität zu untersuchen. Als viel versprechende Ziele wurden bereits bei Stöhr et al. (2004) folgende sieben Zielsequenzen/Primer herausgearbeitet: D8S1145, D8S587, D8S1817, D8S591, D8S1706, D8S1469 und D8S526.

1.2.2 Untersuchung von pT1G2/3-Tumoren mit Hilfe der FISH-Technik

Für die Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierungs-Technik, welche in der Zytologiediagnostik bereits gut etabliert ist, wurden inzwischen auch Kriterien für die Auswertung an formalinfixierten Tumorgeweben erarbeitet (Schwarz et al., 2004), was als wertvolle Ergänzung in die Arbeit mit einbezogen wurde.

1.2.3 Vergleich mit weiteren Markern

Aufgrund der komplexen Zusammenhänge auf molekularer Ebene, die zur Entstehung und Progression von Urothelkarzinomen beitragen, ist es notwendig, neue Markerkandidaten im Vergleich zu bereits erprobten/etablierten Techniken zu betrachten. Es wurden die folgenden drei Methoden ausgewählt und die Analysen in den Laboratorien in Rotterdam/Niederlanden (FGFR3-Mutationsanalysen) und Regensburg (restliche Untersuchungen) durchgeführt:

- TP53-Sequenzierung der Exons 5 bis 8
- immunhistochemische Färbungen (CK20, MIB-1, p53)
- FGFR3-Mutationsanalyse

1.2.4 Korrelation der Ergebnisse mit dem Krankheitsverlauf der Tumorpatienten

Aussagen zum klinischen Verhalten von Urothelkarzinomen im Stadium pT1G2/3 lassen sich nur treffen, wenn man die Erkenntnisse aus den molekulargenetischen Untersuchungen mit dem Follow-up der betreffenden Patienten in Beziehung setzt. Dabei standen das tumorspezifische Überleben und das rezidivfreie Überleben aus Vorarbeiten zur Verfügung.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Gewebeproben und klinisch-pathologische Daten

Im PAS-System des Instituts für Pathologie am Klinikum der Universität Regensburg werden alle histologischen Gutachten seit 1989 per elektronischer Datenverarbeitung (EDV) archiviert. Mittels dieser Software wurden Patienten mit malignen Erkrankungen der Harnblase bis Sommer 2004 ermittelt, deren Gewebeproben am Institut für Pathologie histologisch begutachtet worden waren. Dabei waren für die vorliegende Untersuchung nur Präparate mit einem Urothelkarzinom der Harnblase in den TNM-Stadien pT1G2 oder pT1G3 von Interesse.

Die verschiedenen Änderungen der neuen WHO-Klassifikation von 2004 hatten keinen Einfluss auf die Auswahl, da das späteste Datum der Erstdiagnose im Jahr 2000 und damit vor diesen Änderungen lag.

Mit Hilfe des Suchbegriffs „HBL/B/MAL?“ wurden pathologische Arztbriefe (inklusive eventueller Nachbefunde) durchgelesen, auf diese Stadien hin durchgefiltert und - falls die Bedingungen erfüllt waren - die entsprechenden Fälle notiert. Da bei Harnblasentumoren Veränderungen meist multipel auftreten, mussten alle Läsionen Berücksichtigung finden. Dabei war jeweils das höchste TNM-Stadium der durch TUR-B gewonnenen Gewebstücke von Bedeutung. Dieses durfte maximal pT1 (Infiltration des subepithelialen Bindegewebes) sein, d. h. keines der Gewebstücke pT2 oder höher sein. Falls beispielsweise vier Proben aus einer TUR eingesendet worden waren (2 x pTa, pT2G3 und pT1G3), so wurden diese nicht in die Studie mit einbezogen. Falls mehrere Arztbriefe bei einem Patienten mit diesen Suchkriterien gefunden wurden, ist der zuerst diagnostizierte pT1-Tumor in die Auswertung mit aufgenommen worden. Die gefundenen pT1G2- oder pT1G3-Harnblasentumoren waren alle urothelialen Ursprungs bis auf ein Adenokarzinom der Harnblase, das aus dieser Arbeit ausgeschlossen wurde. Ergänzt wurden diese Angaben durch Patientendaten, die in peripheren Pathologien generiert worden waren, und deren Daten, Schnitte und/oder DNA im Pathologischen Institut der Universität Regensburg gespeichert sind.

Insgesamt kam nach dieser Sichtung eine Zahl von 86 Patienten für die Untersuchung in Frage. Nach den Untersuchung mit den Primern sowie mithilfe der FISH konnten 10 davon nicht berücksichtigt werden, da bei ihnen keines der in dieser Dissertation selbst durch-

geführten Methoden zu auswertbaren Ergebnissen führte. Mögliche Gründe hierfür sind in den Kapiteln 4.1.1 bis 4.1.5 näher erläutert.

Die gefundenen Schnitte stammten aus den Jahren 1990 bis 2000. Der Aufbau des Patientenkollektivs (Alter, Verteilung männlich/weiblich) entsprach etwa den aus der Einleitung bekannten Daten für das Urothelkarzinom der Harnblase.

Das Follow-up und ein Teil der immunhistochemischen Färbungen stammten dabei z. T. aus Vorarbeiten, in denen ein Teil der gefundenen Patienten ebenfalls enthalten waren (nur zum Teil bereits veröffentlicht). Das Follow-up setzte sich dabei wie folgt zusammen:

- tumorspezifisches Überleben (cancer-specific survival, CSS): Dieses wurde in Monaten nach Erstdiagnose eines pT1G2 oder pT1G3 angegeben. Der Durchschnitt lag bei 60,74 Monaten (1-186 Monate).
- Status des Gesamtüberlebens: Hier wurden Todesfälle notiert, jeweils mit der Unterscheidung, ob der Tod tumorspezifisch oder nicht bzw. unbekannt war.
- rezidivfreies Überleben (recurrence-free survival, RFS): Nach der TUR-B mit einem primären pT1 wurden regelmäßige Nachkontrollen empfohlen. Der Zeitraum bis zum Auftreten eines Rezidivs wurde in Monaten nach Erstdiagnose gemessen und lag zwischen 0 und 140 Monaten bei einem Mittelwert von 47,61 Monaten. Rezidiv wurde definiert als zystoskopisch sichtbarer Tumor mit einer histologischen Verifikation.
- Status des rezidivfreien Überlebens: In dieser Spalte wurde notiert, ob im Beobachtungszeitraum nach der TUR-B ein Rezidiv vorlag.
- Alter bei Erstdiagnose: Aus dem Diagnosedatum des primären pT1-Tumors und dem Geburtsdatum des Patienten konnte das Alter des Patienten bei Erstdiagnose errechnet werden. Bei den Patienten war dies im Durchschnitt 70,37 Jahre (35 bis 90 Jahre). Der Diagnosemonat war Ausgangspunkt für die Errechnung von Gesamtüberleben und rezidivfreiem Überleben. Da alle Patienten zwar primäre pT1-Tumoren aufwiesen, es aber oft nicht die Erstdiagnose eines Blasen Tumors war (früher oft pTa), lag das Alter bei Erstdiagnose des pT1 erwartungsgemäß höher als die in der Literatur genannten Angaben, die sich auf die Erstdiagnosen eines Harnblasentumors beziehen.
- Alter (dichotom): Für statistische Analysen wurde das Patientenkollektiv in zwei Altersgruppen eingeteilt, nämlich ≥ 70 Jahre und < 70 Jahre.
- Geschlecht: Hier wurde zwischen männlich und weiblich unterschieden - mit der sich für Urothelkarzinome der Harnblase typischen Geschlechtsverteilung zuungunsten der Männer.

- Grading: Da diese Arbeit auf G2- und G3-Stadien beschränkt war, wurde hier nur zwischen diesen beiden Stadien unterschieden.
- Carcinoma in situ (CIS): Das Vorliegen eines gleichzeitigen CIS bei Erstdiagnose wurde vermerkt, da man um die Bedeutung dieser Entität weiß (siehe Kapitel 1.1.5.2).
- Wachstumsmuster: Hierbei wurde zwischen solidem und papillärem Wachstumsmuster unterschieden, wobei bereits bei einem Anteil von mehr als 20% mit papillärem Wachstum nach Konvention das Wachstumsmuster als „papillär“ einzustufen ist.
- Multifokalität: Man unterscheidet unifokale von multifokalen Tumoren. Dabei erfordert die Bezeichnung „multifokal“ zwei räumlich getrennte Entitäten; eine maligne Läsion (CIS, pTa) im Randbereich des exzidierten Tumors fällt hier noch nicht darunter.

Die Informationen hierzu lieferten die histopathologischen Berichte im PAS-System der Universität Regensburg, die Patientenakte und -dateien des Caritas-Krankenhauses St. Josef in Regensburg sowie der peripheren Kliniken und Pathologien.

Zum Zustandekommen der dichotomen Werte für die immunhistochemischen Färbungen (CK20, p53, MIB-1) in der SPSS-Datei sei auf das Kapitel 2.2.9.2 verwiesen.

Der aus den bisher genannten Werten bestehende Datensatz, der für diese Arbeit aus bereits generierten Datensätzen zusammengesetzt wurde, wurde nach Durchführung der Experimente mit den neu gewonnen Befunden ergänzt, die sich wie folgt aufschlüsseln:

- aus den Silbergefärbungen: zwei Spalten, in denen jeweils das Auftreten von LOHs oder MSIs notiert wurde. Von den sieben getesteten Primern waren vier auswertbar, so dass deren Ergebnisse in diese Spalte einfließen. Außerdem wurde für jeden Primer notiert, ob er bei dem entsprechenden Tumor informativ, nicht informativ oder nicht auswertbar war, oder ob er einen LOH bzw. eine MSI aufwies.
- aus der FISH-Analyse: Hier war die Frage nach Polysomie und p16-Deletion von Interesse, die in zwei Spalten der Tabelle notiert wurden.
- aus der TP53-Sequenzierung der Exons 5 bis 8: Eine gefundene Mutation wurde tabelliert, falls sie sich in einer Wiederholungsreaktion verifizieren ließ.
- aus den FGFR3-Mutationsanalysen: Diese wurden im Institut für Pathologie an der Universität Rotterdam (Niederlande) durchgeführt, sind inzwischen aber auch am Institut für Pathologie der Universität Regensburg etabliert. Dabei wurde notiert, ob eine Mutation vorlag und gegebenenfalls welche.

- aus den immunhistochemischen Färbungen: Bei denjenigen Patienten, bei denen diese Untersuchungen aus Vorarbeiten noch nicht vorlagen, wurden fehlenden Färbungen nachgeholt. Dann wurde jeweils entsprechend definierter Grenzen die Auswertung notiert (siehe Kapitel 2.2.9.2).

2.1.2 Grundchemikalien

Sämtliche verwendeten Chemikalien wiesen Analysequalität auf. Um die jeweiligen Subgruppen komplett darzustellen, sind Mehrfachnennungen in den nächsten Unterkapiteln möglich.

Acrylamid/Bisacrylamid 19:1 (40%) (Biorad, München)

Agarose Typ 1-A low EEO (Serva, Heidelberg)

Ammoniumpersulfat, APS (Biorad, München)

Borsäure (Biorad, München)

Bromphenolblau (Sigma, München)

Desoxyribonukleotid-Triphosphat (Boehringer, Mannheim)

Desoxynukleotid-Triphosphat (Roche, Basel, Schweiz)

Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat (Merck, Darmstadt)

DMSO (Dimethylsulfoxid) (Merck, Darmstadt)

DNA-Ladder / DNA-Molekulargewichtsstandard 1 kb (Gibco BRL, Eggenstein)

Eisessig (Merck, Darmstadt)

Eosin (Merck, Darmstadt)

Ethylendiamintetraacetat, EDTA (Serva, Heidelberg)

Entellan (Merck, Darmstadt)

Ethanol Rotipuran 99,8% p. a. (Roth, Karlsruhe)

Ethidiumbromid (Merck, Darmstadt)

Ficoll Typ 400 (Pharmacia, Freiburg)

Formaldehyd 37% (Merck, Darmstadt)

Formamid (Sigma, München)

Glycerol (Fluka, Buchs SG, Schweiz)

Hämatoxylin (Merck, Darmstadt)

Harnstoff, Urea (Biorad, München)

HiDi-Formamid (Roth, Karlsruhe)

High Pure PCR Template Preparation Kit (Boehringer, Mannheim)

Hind-III-Fragmente / DNA-Molekulargewichtsstandard λ -DNA

(Life Technologies, Eggenstein-Leopoldshafen)

Isopropanol p. a. (Merck, Darmstadt)

Kaliumdihydrogenphosphat (Merck, Darmstadt)

Magnesiumchlorid (Gibco BRL, Eggenstein)

Nanopure (Milli-Q_{plus}^{UF}, Millipore, Eschborn)

Natriumacetat (Merck, Darmstadt)

Natriumcarbonat, Na₂CO₃ (Merck, Darmstadt)

Natriumchlorid ACS, ISO (Merck, Darmstadt)

Natriumzitraddihydrat, kristallin (J. T. Baker, Deventer, Holland)

Nonidet P40 (ICN Biomedical, Ohio, USA)

PCR-Reaktionspuffer 10x (Gibco BRL, Eggenstein)

Polyacrylamid, PAA (Roth, Karlsruhe)

Polyethylenglykol (PEG) 8000 (Aldrich, Steinheim)

Salpetersäure (Merck, Darmstadt)

Sigmacote (Sigma, München)

Silbernitrat (Roth, Karlsruhe)

TEMED (Serva, Heidelberg)

Tris-Puffer (Biorad, München)

Xylen Cyanol FF (Sigma, München)

Wasserstoffchlorid, HCl (Merck, Darmstadt)

Wasserstoffperoxid, H₂O₂ (Merck, Darmstadt)

Zitronensäure (Merck, Darmstadt)

2.1.3 Reagenzien und Lösungen

2.1.3.1 Allgemeine Lösungen

EDTA, 0,5 M (pH 8,0):

Ethylendiamintetraacetat	73,1 g
Wasser	800 mL

→ rühren, mit NaOH pH 8,0 einstellen, mit Aqua dest. auf 1.000 mL auffüllen

Ethanol, 96%ig bzw. 70%ig:

Ethanol abs.	960 mL bzw. 700 mL
Aqua dest.	40 mL bzw. 300 mL

→ zusammenmischen auf 1.000 mL

2.1.3.2 Lösungen für die HE-Färbung von Paraffinschnitten

Hämatoxylin (0,5%):

Monohydratpulver	0,5 g
Ethanol	10,0 mL

→ Lösen

Wasser	90,0 mL
--------	---------

→ verdünnen, Reifezeit 5 Wochen

Eosin (0,5%): gebrauchsfertig (Merck, Darmstadt)

2.1.3.3 Lösungen für die DNA-Isolation aus Paraffinmaterial

70% Ethanol:

Ethanol abs.	700,0 mL
Wasser	300,0 mL

Puffer AW: 190 mL Ethanol abs. in Stammlösung (Qiagen, Hilden)

Puffer AL: gebrauchsfertig (Qiagen, Hilden)

Digestionspuffer:

Tris (pH 8,5)	250,0 µL
EDTA (pH 8,0)	250,0 µL
Tween 20 (0,5%)	100,0 µL
Wasser	ad 50 mL

→ aliquotieren, autoklavieren, Lagerung bei Raumtemperatur

Proteinase K: gebrauchsfertig (Merck, Darmstadt)

2.1.3.4 Material für die LOH- und MSI-Analysen

2.1.3.4.1 Material für die Amplifikation genomischer DNA durch PCR

Taq-Polymerase GoTaq[®]: gebrauchsfertig (Promega, Madison, WI, USA)

dNTP-Mischung (10 mM): je 10 mL dATP, dTTP, dGTP, dCTP zu 60 µL Wasser geben

Primer (15 µM):

Forward-Primer	30 µL
Reverse-Primer	30 µL
Wasser	140 µL

→ steril auf Eis pipettieren, aliquotieren, Lagerung bei -20°C

PEP-Primer (15 n): gebrauchsfertig (MWG Biotech, Ebersberg)

Mikrosatellitenmarker-Primer:

Marker	Lokalisation	Primersequenz (5' → 3')	Annealing- tempe- ratur	PCR- Produkt- größe
D8S1145	8p22	F: TGCTAACTGGCACGGTCAC R: CAATCCCAGTAATCTATAACTTCA	56°C	ca. 261 - 289 bp
D8S587	8q11.1-11.21	F: CTGGATTTTGATCTCCCCTT R: TTGGGTGGAGACACAGATCT	58,6°C	ca. 142 bp
D8S1817	8p12-11.22	F: GCACGTTCAATATGACTGTTGATTC R: ACTGAGGGCCAAGTCCCTA	58,6°C	ca. 176 bp
D8S591	8q11.21- 11.23	F: CTTTGAATGGTATTTCAATGTCC R: GGCAGTCATCTCCTGGTCTA	58,6°C	ca. 154 bp
D8S1706	8p23.1	F: AGACAGCGACATGCAG R: GGAAAAATCACAATAGAAATTACT	55,2°C	ca. 257- 281 bp
D8S1469	8p23.1	F: GCTTTAGAAGGCGGAGGTAG R: GAGGGGGTTAAAGGTGTCAT	64°C	ca. 221 bp
D8S526	8q21.11	F: CCCATAATCTCACCAGTTTACA R: CAGCCCAGGCTTATTAAATT	59,2°C	ca. 136 bp

Tab. 4: Charakteristika der Mikrosatellitenmarker auf dem Chromosom 8

Legende: F = forward (vorwärts), R = reverse (rückwärts).

Nukleotidlänge und Annealingtemperatur stellen wichtige Faktoren da, um optimale Amplifikationsbedingungen zu gewährleisten. In vorangegangenen Arbeiten wurden die für die einzelnen Mikrosatellitenmarker spezifischen Annealingtemperaturen bereits mittels Gradienten-Cycler und unterschiedlicher Magnesiumchloridkonzentrationen getestet und festgelegt.

2.1.3.4.2 Lösungen für die PAA-Gelelektrophorese

TBE (10x):

Tris	108,0 g
Borsäure	55,0 g
0,5 M EDTA (pH 8,0)	40,0 mL
Wasser	ad 1.000 mL

→ filtrieren, Lagerung bei Raumtemperatur

PAA-Harnstofflösung (6,7%):

Urea	453,6 g
TBE 10x	108 mL
PAA	180 mL
Wasser	432 mL

→ unterm Abzug mischen, filtrieren, Lagerung bei 4°C

Ammoniumpersulfat (10%):

APS	10 g
Wasser	100 mL

→ aliquotieren, Lagerung bei -20°C

Loading-Puffer:

Formamid	10,0 mL
Xylen Cyanol FF	10,0 mg
Bromphenolblau	10,0 mg
0,5 M EDTA (pH 8,0)	200,0 µL

→ aliquotieren, Lagerung bei -20°C

Marker:

1 kb DNA-Ladder (1 µg/mL)	4 µL
Loading-Puffer	16 µL

2.1.3.4.3 Lösungen für die Silberfärbung**Ethanol (10%):**

Ethanol abs.	100,0 mL
Wasser	900,0 mL

Salpetersäure (1%):

Salpetersäure (65%)	15,0 mL
Wasser	985,0 mL

Silbernitratlösung (0,012 M):

Silbernitrat	2,0 g
Wasser	ad 1.000 mL

→ Lagerung in lichtgeschützten Behältern

Natriumcarbonat (0,28 M) / Formalin (0,019%):

Natriumcarbonat	29,7 g
Formaldehyd (37%)	520 µL
Wasser	ad 1000 mL

Essigsäure (10%):

Eisessig	100,0 mL
Wasser	900,0 mL

2.1.3.5 Material für die Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung

Multicolor-FISH-Sonden-Set (Abbott Laboratories, Abbott Park, IL, USA)

Natriumzitratlösung: 0,01 M (ins 95°C Wasserbad)

$C_6H_5Na_3O_7 \times 2 H_2O$ 0,490 g/500 mL,

→ pH 6,0 mit HCl einstellen

Pepsin:

0,1% (1 mg/1 mL 0,01 M HCl),

für 50 mL (50 mg/50 mL) abwiegen im Falcon

Wasserstoffchlorid (HCl):

0,01 M HCl, Lösung 2 M, 0,01 M = 250 µL + 50 mL Nanopure;

HCl-Lösung ins Wasserbad (37°C)

20 x SSC (Standard Saline Citrate), Grundrezept für 1.000 mL:

Natriumchlorid z. A.	175,3 g
Natriumzitratlösung, kristallin	88,24 g
Nanopure	ad 1.000 mL

→ pH 5,3 mit konzentrierter HCl einstellen

2 x SCC (Standard Saline Citrate), Grundrezept für 1000mL:

20 x SCC (Zusammensetzung s. o.), pH 5,3	100 mL
Nanopure	900 mL

→ pH 7,0 bis 7,5 mit 1 M NaOH (= ca. 2 mL) einstellen; bei jeder Färbung prüfen

4 x SSC (Standard Saline Citrate), (0,1% NP40), Grundrezept für 500 mL:

20 x SSC (Zusammensetzung s. o.), pH 5,3	100 mL
Nanopure	400 mL
Nonidet P40	500 µL

→ pH 7,0 bis 7,5 mit 1 N NaOH einstellen; bei jeder Färbung prüfen

1 x SCC (Standard Saline Citrate), Grundrezept für 500 mL:

20 x SSC (Zusammensetzung s. o.), pH 5,3	25 mL
Nanopure	475 mL

→ pH 7,0 bis 7,5 mit 1 N NaOH einstellen; bei jeder Färbung prüfen

Ethanol, 100 mL (70% bzw. 85%):

Ethanol abs.	70 mL bzw. 85 mL
Nanopure	30 mL bzw. 15 mL

2.1.3.6 Material für die TP53-Sequenzierung auf den Exons 5 bis 8

2.1.3.6.1 Lösungen für die Fällung und Reinigung von DNA zur Sequenzierung

PEG-Mix:

PEG 8000	26,2 g
Natriumacetat (3 M, pH 5,2)	20 mL
Magnesiumchlorid (1 M)	660 mL
Wasser	ad 1.000 mL

Ethanol (70%):

Ethanol abs.	70 mL
Wasser	30 mL

→ immer frisch herstellen

2.1.3.6.2 Lösungen für die Agarose-Gelelektrophorese

TAE (50x):

Tris	242,0 g
Eisessig	57,1 mL
0,5 M EDTA (pH 8,0)	100,0 mL
Wasser	ad 1.000 mL

→ aliquotieren, autoklavieren, Lagerung bei Raumtemperatur

Hind-III:

Marker	20 μ L
Stopp-Puffer	16,7 μ L
Wasser	63,3 μ L

Agarosegel (2,5%):

Agarose	2,5 g
TAE (1x)	ad 100 mL

Stopp-Puffer:

0,5 M EDTA (pH 8,0)	60 μ L
Bromphenolblau	0,0125 g
Ficoll (Typ 400)	0,75 g

→ in 5 mL Wasser lösen

Ethidiumbromid-Lösung (0,04%):

Ethidiumbromid	125 μ L
Wasser	ad 500 mL

2.1.3.6.3 Ansätze für die Sequenzreaktion

ABI PRISM Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA):

A-Dye Terminator mit Dichloro [R6G]
C-Dye Terminator mit Dichloro [ROX]
G-Dye Terminator mit Dichloro [R110]
T-Dye Terminator mit Dichloro [TAMRA]
Desoxynukleosid-Triphosphate (dATP, dCTP, dITP, dUTP)
AmpliTaQ DNA-Polymerase mit thermostabiler Pyrophosphatase
Magnesiumchlorid
Tris-HCl-Puffer pH 9,0

Primer für die TP53-Sequenzierung der Exons 5 bis 8:

Exon	Name	AT	Primersequenz (5' → 3')	bp	Amplifikat (bp)
5	p53 5so	54°C	CAGGAGGTGCTTACACATG	19	270
	p53 5ao	54°C	TGAGGAATCAGAGGCCTG	18	
	p53 5s	58°C	TCACTTGTGCCCTGACTTTC	20	
	p53 5a	58°C	GGAAACCAGCCCTGTCGTC	19	
	p53 5qs	48°C	CCTGACTTTCAACTCTG	17	
	p53 5qa	48°C	AGCCCTGTCGTCTCTC	16	
6	p53 6so	56°C	AGACGACAGGGCTGGTTTC	19	260
	p53 6ao	56°C	CACATCTCATGGGGTTATAG	20	
	p53 6s	54°C	TCCCCAGGCCTCTGATTC	18	
	p53 6a	54°C	TAGGGAGTTCAAATAAGCAG	20	
	p53 6qs	50°C	CCTCTGATTCCTCACTG	17	
	p53 6qa	50°C	CACTGACAACCACCCTT	17	
7	p53 7so	56°C	AAAGGCCTCCCCTGCTTG	18	245
	p53 7ao	56°C	AGTATGGAAGAAATCGGTAA	21	
	p53 7s	60°C	GCCTCCCCTGCTTGCCAC	18	
	p53 7a	60°C	GTCAGAGGCAAGCAGAGGC	19	
	p53 7qs	48°C	TGCTTGCCACAGGTCT	16	
	p53 7qa	48°C	CAGCAGGCCAGTGTGC	16	
8	p53 8so	54°C	AAATGGACAGGTAGACCTG	19	200
	p53 8ao	54°C	GAATCTGAGGCATAACTGC	19	
	p53 8s	58°C	TAGACCTGATTTCCTTACTGC	21	
	p53 8a	58°C	GCATAACTGCACCCTTGGTC	20	
	p53 8qs	50°C	TCCTTACTGCCTCTTGC	17	
	p53 8qa	50°C	CCCTTGGTCTCCTCCA	16	

Tab. 5: Primer für die TP53-Sequenzierung der Exons 5 bis 8;

Legende: AT = Annealing-Temperatur, bp = Basenpaare; so = outer Primer, sense; ao = outer Primer, antisense; s = inner Primer, sense; a = inner Primer, antisense; qs = Sequenz-Primer, sense; qa = Sequenz-Primer, antisense.

Oligonukleotid-Mischung:

Outer und Inner Primer	15 μM
Sequenzprimer (f und r getrennt)	3,2 μM

2.1.3.7 Material für die FGFR3-Mutationsanalyse

Primer	Primersequenz	Strang	Primerextension		c (pmol/ μL)
			Wildtyp	Mutant	
R248C	5'-T ₄₆ CGTCATCTGCCCCACAGAG-3'	sense	C	T	2,0
S249C	5'-T ₃₆ TCTGCCCCACAGAGCGCT-3'	sense	C	G	1,2
S249C	5'-T ₂₈ TCTGCCCCACAGAGCGCT-3'	sense	C	G	1,2
G372C	5'-T ₂₉ GGTGGAGGCTGACGAGGCG-3'	sense	G	T	0,4
Y375C	5'-T ₄₃ ACGAGGCGGGCAGTGTGT-3'	sense	A	G	0,6
A393E	5'-T ₃₄ CCTGTTTCATCCTGGTGGTGG-3'	sense	C	A	2,4
K652E/Q	5'-T ₅₀ GCACAACCTCGACTACTACAAG-3'	sense	A	G/C	1,2
K652M/T	5'-T ₂₀ CACAACCTCGACTACTACAAGA-3'	sense	A	T/C	0,8

Tab. 6: SNaPshot-Primer zur Detektion der FGFR3-Mutationen. Legende: c = Konzentration

für Exon 7:	5'-AGTGGCGGTGGTGGTGGAGGGAG-3' und 5'-GCACCGCCGTCTGGTTGG-3'
für Exon 10:	5'-CAACGCCCATGTCTTTGCAG-3' und 5'-AGGCGGCAGAGCGTCACAG-3'
für Exon 15:	5'-GACCGAGGACAACGTGATG-3' und 5'-GTGTGGGAAGGCGGTGTTG-3'

Tab. 7: Primer für die Multiplex-PCR; diese drei Exons beinhalten alle bisher entdeckten FGFR3-Mutationen.**Mehrfach-PCR-Reagenzien (Volumen 15 μL):**

PCR-Puffer	1 x
Magnesiumchlorid	1,5 mmol/L
Taq-Polymerase	0,5 Einheiten
Desoxynukleotid-Triphosphat	0,17 mmol/L
Exon 7, 10, 15 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)	10; 7,5 und 10 pmol
Glycerol	5%
Genomische DNA	1 bis 250 ng

Mehrfach-SNaPshot-Reaktion (Volumen 10 µL):

PCR-Produkte (aus Mehrfach-PCR: s. o.)	2 µL
Ready Reaction Mix	2,5 µL
Sequenzierungspuffer	1 x
SNaPshot-Primer	Konzentration nach obiger Tabelle: 0,4 bis 2,4 pmol/L

Exonuklease I (ExoI, Amersham Biosciences, Uppsala, Schweden)

Krabben-alkalische Phosphatase (Amersham Biosciences, Amersham, Großbritannien)

ABI PRISM SNaPshot Multiplex Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)

ABI PRISM 3100 Avant Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)

GeneScan Analysis Software Version 3.7 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)

2.1.3.8 Material für die immunhistochemischen Färbungen**Zitratpuffer-Lösung:****Lösung A: Zitronensäure 0,1 M**

$C_6H_8O_7, H_2O$	21,01 g ad 1 L H_2O
-------------------	-----------------------

Lösung B: Natriumzitat 0,1 M

$C_6H_5O_7Na_3, H_2O$	29,41 g ad 1 L H_2O
-----------------------	-----------------------

→ 1 mL Lösung A + 49 mL Lösung B mischen

- mit Aqua dest. auf 500 mL auffüllen, pH 7,3
- im Kühlschrank aufbewahren

Antibody Diluent: dient zur Antikörperverdünnung, im Kühlschrank aufbewahren

Waschpuffer APK Wash Solution (Ventana Medical Systems, Tucson, AZ, USA)

- mit VE-Wasser bis zur ersten Linie auffüllen
- mit 10x Puffer bis zur zweiten Linie auffüllen (eine ganze Flasche)

Coverslip-Öl (Ventana Medical Systems, Tucson, AZ, USA)

Antikörper (Verdünnung mit Antibody-Diluent): s. o.

- p53-Antikörper, monoklonales Maus-IgG_{2a}, Klon Bp53-12 (sc-263)
(Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA), Verdünnung 1:1000
- anti-Keratin 20 (CK20), monoklonales IgG_{2a}, Klon IT-Ks20.8 (61 026)
(Progen Biotechnik, Heidelberg), Verdünnung 1:10
- Ki-67-Antigen (monoklonales IgG1, kappa, Klon MIB-1 (M7240)
(Dako, Glostrup, Dänemark), Verdünnung 1:10 bis 1:50

1 x PBS:

Dinatriumphosphat-Dihydrat	14,8 g
Kaliumdihydrogenphosphat	4,3 g
Natriumchlorid	72 g
H ₂ O	ad 10 L

→ Lagerung bei Raumtemperatur

DAB-Färbelösung: DAB-Tablette enthalten in DAB-CHROMOGEN Kit (Code S 3000),
(DAKO Diagnostika, Glostrup, Dänemark)

DAB-Tablette	1 Stück
PBS	10 mL

→ vollständig lösen, aliquotieren (2 mL), in Alufolie eingewickelt; Lagerung bei -20 °C

2%iges H₂O₂/MeOH-Gemisch:

H ₂ O ₂ (30%)	6,6 mL
MeOH	ad 100 mL

20%iges BSA/PBS-Gemisch:

BSA	20 g
PBS	ad 100 mL

→ auflösen, aliquotieren; Lagerung bei -20 °C

VECTASTAIN[®] Elite ABC Peroxidase Universal Kit

(Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) mit folgendem Inhalt:

Sekundärantikörper:

PBS	1,25 mL
Normalserum (gelb)	25 µL
Antikörper (blau)	25 µL

ABC-Peroxidase-Komplex:

PBS	1,25 mL
Reagenz A & Reagenz B	je 25 µL

→ ca. 30 min vor Gebrauch ansetzen

2.1.4 Laborgeräte/Hilfsmittel

ABI PRISM[®] 3100-Avant Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)

Axiovert S40-Mikroskop (Zeiss, Jena) auf einem schwingungsdämpfenden Steintisch;

63-fach-Ölimmersionsobjektiv; Fluoreszenzillumination HBO 50 Watt

Anregungs- und Emissionsfilter:

	Anregung	Emission
DAPI	360nm ± 20nm	460nm ± 25 nm
FITC (grün)	480nm ± 15 nm	535 nm ± 20 nm
TexasRed	560nm ± 20nm	630 nm ± 30 nm
Aqua	436 nm ± 5 nm	480 nm ± 10 nm
Gold	538 nm ± 10nm	575 nm ± 15 nm

Anfärbung			Filter
Red	Cep 3	Zentromer	C-00431
Green	Cep 7	Zentromer	C-00431
Aqua	Cep 17	Zentromer	C-00430
Gold	LSI 9p21	Gen (TP53)	C-00429
DAPI			A-513678

DNA-Isolierung QIAamp Tissue Kit (Qiagen, Hilden)
Einmalhandschuhe (Kimberly-Clark, Dallas, TX, USA)
Fixogum (Marabu, Ludwigsburg)
Gel-Elektrophoreseapparatur SEQUI - GEN GT Sequencing Cell (Biorad, München)
Gel-Elektrophoreseapparatur WIDE MINI - SUB[®] CELL GT (Biorad, München)
Geltrockner Modell 583 (Biorad, München)
Handstanze (Zytomed Systems, Berlin)
Lichtmikroskop HM-Lux 3 (Leitz, Wetzlar)
Magnetrührer mit Heizplatte MR 2002 (Heidolph, Nürnberg)
Mikrowelle Whirlpool Jet 900 W M600 (Philips, Amsterdam, Niederlande)
Pipetten Pipetman (Gilson, Villiers-le-Bel, Frankreich)
Pipettenspitzen mit Sterilfilter (Biozym, Oldenburg)
Pipettenspitzen Typ B, D, E (Sarstedt, Nümbrecht)
Reaktionsgefäße Genetic Analyzer 0,5 mL (PE Applied Biosystem, Foster City, CA, USA)
Reaktionsgefäße Safe Lock 0,5 mL (Eppendorf, Hamburg)
Reaktionsgefäße Safe Lock 1,5 mL (Eppendorf, Hamburg)
Schlittenmikrotom (Mikrom, Heidelberg)
Schüttler VF 2 (IKA-Labortechnik, Staufen i. Br.)
Spannungsgerät Microcomputer Electrophoresis Consort E 455 (Biorad, München)
Spannungsgerät Power Pac 3000 Power Supply (Biorad, München)
Speed Vac[®] SC 100 (Savant Instruments, Farmingdale, NY, USA)
Sterile Nadeln Microlance 3 (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NY, USA)
Thermocycler Mastercycler Gradient (Eppendorf, Hamburg)
Thermocycler Peltier Thermal Cycler PTC-100 MJ Research (Watertown, MS, USA)
Thermocycler Peltier Thermal Cycler PTC-200 MJ Research (Watertown, MS, USA)
UV-Leuchttisch (Bachofer, Reutlingen)
Waage Analytic A 200 S (Sartorius, Göttingen)
Waage Laboratory L 310 (Sartorius, Göttingen)
Wasserfilteranlage MILLIPORE (Millipore, Eschborn)
Zentrifuge Biofuge A Sepatech (Heraeus, Osterode)
Zentrifuge Biofuge Pico (Heraeus, Osterode)

2.1.5 Photodokumentation

AxioCam MRm (Carl Zeiss MicroImaging, Göttingen)

Digitalkamera Finecam L4 (4 Megapixel) (Kyocera, Kyoto, Japan)

2.1.6 Datendokumentation und Auswertung am Computer

Tabellenkalkulationsprogramm Excel 11.0 und 12.0 (Microsoft[®] Corporation, Redmond, WA, USA)

statistische Analysprogramm SPSS 12.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA)

GeneScan Analysis Software Version 3.7 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)

2.2 Methoden

2.2.1 Herstellung von Paraffinschnitten

Die DNA als Träger der menschlichen Erbinformation liegt im Zellkern als doppelsträngiges Molekül vor und bildet zusammen mit den basischen Histonproteinen das Chromatin. Dabei unterscheidet man das Nukleosom als kleinste Grundeinheit der DNA, welches aus einem Oktamer von Histonproteinen und dem Nukleotidstrang, der sich 2,5-mal um das Oktamer windet, besteht, von der Linker-DNA, die die Nukleosomen verbindet und ebenfalls mit Proteinen assoziiert ist. Um nun molekulargenetische Untersuchungen an der genomischen DNA durchführen zu können, muss diese zunächst aus den umgebenden Zellstrukturen herausgelöst und von assoziierten Proteinen gereinigt werden.

Als Substrat zur Gewinnung von DNA wurde in dieser Arbeit formalinfixiertes und paraffin-eingebettetes Gewebe verwendet. Diese Möglichkeit wurde erstmals von Goelz et al. (1985) erwähnt. Die Eignung der somit erhaltenen DNA für eine weitere Amplifikation durch die PCR-Technik wurde von Greer et al. (1991) beschrieben.

Am pathologischen Institut der Universitätsklinik Regensburg werden eingesandte Präparate nach dem Zuschnitt für einige Stunden in 4%iger Formalinlösung fixiert und anschließend in Paraffinblöcke gegossen und archiviert. Fixationszeiten über 24 Stunden senken die Erfolgsrate für nachfolgende PCR-Reaktionen erheblich (Greer et al., 1994). Durch die Isolierung von DNA aus archivierten Paraffinblöcken konnte somit relativ schnell eine große Anzahl von Patienten auch aus weiter zurückliegenden Jahren untersucht werden, ohne dass man auf eintreffendes Frischmaterial angewiesen war. Geeignete Patienten konnten über das PAS-System (vgl. Kapitel 2.2.1) ausgewählt werden, die Planung der Arbeit wurde dadurch vereinfacht. Weitere Vorteile der Methode waren die relativ einfache Durchführbarkeit und die hohe Verlässlichkeit. Durch Kombination mit der PCR-Reaktion reichten auch noch sehr kleine Mengen an DNA aus, welche bei Bedarf noch zusätzlich mittels PEP-PCR amplifiziert werden konnten.

Von den Paraffingewebsblöcken wurden je nach Geweese menge 6 bis 18 Schnitte mit einer Schichtdicke von 10 µm und je ein Schnitt mit 2 µm Dicke hergestellt. Die Schnitte wurden in ein 35°C warmes Wasserbad gebracht und auf zuvor mit Alkohol gereinigte Objektträger aufgezogen. Die Objektträger wurden zur Vermeidung von Verwechslungen mit der Nummer des Paraffinblocks beschriftet. Anschließend erfolgte die Trocknung bei 42-45°C im Brutschrank.

2.2.2 Entparaffinieren der Gewebeschnitte

Als Vorarbeit wurden die HE-Schnitte aus dem Schnitt-Archiv herausgesucht und mikroskopisch inspiziert. Bei fehlenden Schnitten wurde versucht, diese ausfindig zu machen oder - falls vorhanden - erneut aus den Wachsblöcken aus dem Block-Archiv herzustellen. Die Schnitte wurden nach ihrer Auswertbarkeit für das Mikrodissenzen von einem Pathologen (A. H.) begutachtet und anschließend aus denjenigen, aus denen die Gewinnung von genug DNA möglich schien, Schnitte hergestellt. Dazu mussten - falls nicht bereits geschehen - die Wachsblöcke herausgesucht werden.

Für die folgende HE-Färbung und Mikrodissektion musste das Material vom Paraffin gereinigt werden. Dazu wurden die trockenen Schnitte auf einem Ständer für 30 min bei 72°C inkubiert, wodurch das geschmolzene Paraffin abließ. Zur kompletten Entparaffinierung standen die Schnitte 2-5 min in Xylol und durchliefen anschließend eine absteigende Alkoholreihe (jeweils 1-2 min). Nun konnten die Schnitte für die Mikrodissektion verwendet werden. Eine Lagerung in 70% Alkohol war bis zu einer Woche ebenfalls möglich.

2.2.3 HE-Färbung der Schnitte

Vorgehensweise:

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

Die 2 µm dicken Schnitte wurden mit Hämatoxylin-Eosin (HE) gefärbt. In dieser Färbung konnten die histologischen Strukturen gut beurteilt werden. Die HE-Schnitte dienen als Referenz bei der Mikrodissektion.

2.2.4. LOH- und MSI-Analysen

Für diese Analysen musste Tumor-DNA gewonnen und amplifiziert werden. Die Darstellung und Interpretation der Veränderungen erfolgte mithilfe von Silbergefärbungen. Im Folgenden seien die einzelnen Schritte dargestellt:

2.2.4.1 Mikrodissektion der Tumorareale

Mit Hilfe der Mikrodissektionstechnik ist es möglich, auf einem histologischen Schnitt unter dem Mikroskop selektiv bestimmte Gewebebezirke zu isolieren (Shibata et al., 1994). Zuerst wurde auf dem HE-Schnitt bei schwacher Vergrößerung das gewünschte Tumorareal bzw. tumorfreies Normalgewebe von einem Pathologen (A. H.) ausfindig gemacht und die Lage mit einem Folienstift markiert. Anschließend wurden die 10 µm dicken Schnitte in Methylblau angefärbt und im Mikroskop das entsprechende Areal aufgesucht. Mit Hilfe einer sterilen Nadel konnten nun die angrenzenden Bereiche separiert und das gewünschte Gewebe abgekratzt werden (Abb. 7). Dabei betrug die Mindestmenge ca. 500 Zellen. Das mikrodissezierte Material wurde in ein 0,5 mL bzw. 1,5 mL Eppendorf-Cup aufgenommen, welches mit der Probennummer beschriftet war und 180 µL Digestionspuffer enthielt.

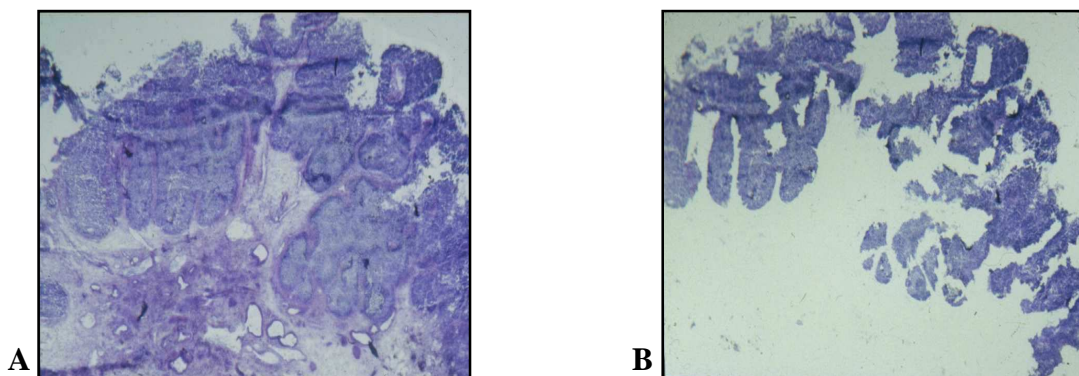


Abb. 7: papilläres Urothelkarzinom vor (A) und nach der Mikrodissektion (B);
Ziel war eine weitgehende Entfernung des Stromaanteils.

2.2.4.2 Proteinase-K-Verdau und DNA-Isolierung

Der Verdau der Proteinanteile und die Extraktion der DNA wurden nach einem modifizierten Protokoll von Boehringer mit dem High Pure PCR Template Preparation Kit durchgeführt. Dieser Kit gewährleistet den vollständigen Verdau von Proteinen und damit von DNA degradierender DNAsen. Ferner wurden Salze und die Proteindegradationsprodukte im Zell-Lysat, die die nachfolgende PCR hemmen könnten, vollständig ausgewaschen.

Dazu wurden zunächst zum Digestionspuffer mit den enthaltenen Gewebestückchen 40 µL gebrauchsfertige Proteinase K gegeben. Anschließend wurde die Suspension gut durchmischt, abzentrifugiert und bei 55°C unter leichtem Schütteln über Nacht im Thermoblock inkubiert. Der Erfolg des Proteinase-K-Verdau zeigt sich in einer homogenen, durchsichtigen Lösung ohne sichtbare Partikel.

Zur Extraktion der DNA wurden folgende Schritte durchlaufen:

- Zugabe von 200 µL Bindungspuffer, gründlich vortexen und für 10 min bei 72°C inkubieren
- Zugabe von 100 µL Isopropanol, gründlich vortexen
- Filtersäule (High Pure Filter Tubes) auf Auffanggefäß (2 mL) setzen und die Mixtur in die Filtersäule füllen, Deckel schließen
- Zentrifugieren mit 8.000 rpm eine Minute lang
- Filtersäule auf neues Auffanggefäß (2 mL) setzen, die abzentrifugierte Flüssigkeit im alten Gefäß kann verworfen werden
- Zugabe von 500 µL Wasch-Puffer in die Filtersäule
- Zentrifugieren mit 8.000 rpm eine Minute lang
- Umsetzen der Filtersäule auf ein neues Auffanggefäß (2 mL), Verwerfen des Filtrats
- Zugabe von 500 µL Wasch-Puffer in die Filtersäule
- Zentrifugieren mit 8.000 rpm eine Minute lang
- Aufsetzen der Filtersäule auf ein beschriftetes 1,5 mL-Cup, Verwerfen des Filtrats
- Zugabe von 200 µL 70°C warmen destilliertem Wasser, Inkubation für 5 min bei 70°C
- Zentrifugieren mit 8.000 rpm eine Minute lang
- Verwerfen der Filtersäule, die DNA hat sich aus der Filtersäule gelöst

Nun wurde die DNA auf mehrere beschriftete 0,5 mL Eppendorf-Cups aliquotiert. Auf eine Bestimmung der DNA-Konzentration wurde aus folgenden Gründen verzichtet:

- Die Messung erfasst lediglich die gesamte DNA-Menge in der Lösung, nicht jedoch das Verhältnis zwischen Tumor-DNA und DNA aus kontaminierendem Normalgewebe; gerade dies wäre aber für die LOH-Analyse von Interesse gewesen.
- Die aus Paraffinmaterial gewonnene DNA unterliegt abhängig von der Fixationsdauer (Greer et al., 1994) einer Degradation, wodurch die gemessene DNA-Menge nicht unbedingt der intakten, amplifizierbaren DNA-Menge entspricht.
- Das Einsetzen der aufgrund der unbekanntenen DNA-Konzentration mittels empirischer Erfahrung ermittelten optimalen DNA-Volumina in die PCR-Reaktion erwies sich als äußerst praktikabel und erfolgreich.
- Der Verzicht auf die Messung brachte eine erhebliche Ersparnis an Aufwand und Zeit.

Die Lagerung der DNA erfolgte bei -20°C im Gefrierschrank, bei Arbeiten in kurzen Abständen bei 4°C im Kühlschrank.

2.2.4.3 Amplifikation von DNA mittels PCR-Technik

Die PCR ist ein Verfahren zur Vervielfältigung einer spezifischen DNA-Sequenz in vitro. Benötigt werden ein Paar an Primern, welches die gewünschte Zielsequenz jeweils auf der 3'-Seite des Matrixstranges flankiert, ferner eine Polymerase und die vier verschiedenen Desoxyribonukleosid-Triphosphate in ausreichender Menge.

Ein Zyklus einer PCR besteht aus drei Einzelschritten:

1. Strangtrennung (Denaturierung) der Ausgangs-DNA durch kurzes Erhitzen (1 min) auf eine Temperatur von 94°C
2. Hybridisierung der Primer (Annealing) bei der sogenannten Annealing-Temperatur, welche je nach Primer $50-70^{\circ}\text{C}$ beträgt
3. Verlängerung der Primer (Elongation) bei 72°C durch Anheften der komplementären Nukleotide an das freie 3'-OH-Ende und damit in Richtung der Zielsequenz

Als Polymerase wird heute ein Enzym aus dem thermophilen Bakterium *Thermus aquaticus* verwendet, die sogenannte Taq-Polymerase. Der Vorteil dieses Enzyms liegt in seiner Hitze-stabilität, so dass es den Denaturierungsschritt übersteht und daher nicht nach jedem Zyklus neu hinzugefügt werden muss. Seine optimale Aktivität entfaltet das Enzym bei 72°C.

Ein Wiederanlagern von zwei komplementären Strängen der Ausgangs-DNA während der Hybridisierung wird durch die hohe Konzentration an Primern verhindert. Die gewünschte DNA-Sequenz wird durch die PCR exponentiell vermehrt, im Idealfall nach n Runden auf das 2^n -fache, in der Praxis beträgt die Vermehrung nach 20-30 Runden 10^6 bzw. 10^7 (Stryer, 1996).

Die Vorteile der PCR:

1. Aufgrund der hohen Sensitivität kann theoretisch ein einziges DNA-Molekül amplifiziert werden.
2. Die Zielsequenz braucht nicht bekannt zu sein, Voraussetzung ist lediglich die Kenntnis der flankierenden Sequenzen.
3. Die Zielsequenz kann sehr lang sein (bereits bis zu 10 kb möglich).
4. Durch die exakte Bindung der Primer an den komplementären DNA-Abschnitt ist eine hohe Spezifität gewährleistet.

Die Spezifität der Primer kann durch ihre Konstruktion wesentlich beeinflusst werden. Je kürzer ein Oligonukleotid ist, desto größer wird die Wahrscheinlichkeit, dass es auch an andere Stellen des DNA-Stranges hybridisiert und dadurch zu unspezifischen Reaktionsprodukten führt. Andererseits können zu lange Primer durch sterische Behinderung die Hybridisierung erschweren. Ideal sind Oligonukleotide von 18-25 bp Länge. Neben der Oligonukleotidsequenz beeinflusst auch die Annealing-Temperatur die Spezifität. Zu niedrige Temperaturen begünstigen die Bindung der Primer an nicht völlig komplementäre Abschnitte, was wiederum unspezifische Produkte hervorruft. Wird die Temperatur allerdings zu hoch gewählt, gelingt keine Hybridisierung mehr, so dass keine DNA mehr amplifiziert werden kann.

Mit zunehmender Länge des Amplifikats sinkt die Effizienz der PCR stark ab (Greer et al., 1994), da es bei DNA aus fixiertem Paraffinmaterial durch die Formalineinwirkung zu Doppelstrangbrüchen kommt.

2.2.4.4 Anwendung der PCR für die LOH- und MSI-Analyse

Die oben beschriebene PCR wurde im Rahmen dieser Arbeit unter anderem dazu verwendet, Mikrosatelliten-DNA zu amplifizieren und im Folgenden auf einen Verlust eines der beiden Allele (LOH, Loss of Heterozygosity) oder aber den Zugewinn einer Bande (MSI, Mikrosatelliteninstabilität) zu untersuchen. Hierzu wurden Primer auf dem Chromosomen 8 ausgewählt, welche für Abschnitte kodieren, die oft Regionen mit Deletionen zeigen. Die Primer flankierten dabei Mikrosatelliten-DNA. Es handelt sich hierbei um nicht-kodierende DNA-Sequenzen, welche bestimmte Mono-, Di-, Tri- oder Tetranukleotid-Motive in vielfacher Wiederholung enthalten. Der Vorteil der Mikrosatelliten-DNA liegt darin, dass sie interindividuell ausgesprochen polymorph ist, so dass viele unterschiedlich lange Allele in einer Population existieren und die Wahrscheinlichkeit, dass eine Person zwei verschiedene Allele für diesen Chromosomenlocus besitzt (heterozygot ist), hoch ist. Dies aber ist wiederum Voraussetzung für die LOH-Analyse, da nur heterozygote Patienten auf den Verlust eines Allels hin beurteilt werden können. Es soll aber nochmals betont werden, dass das Mikrosatelliten-Amplifikat selbst nicht kodierend ist, so dass ein Verlust eines Allels (Deletion) primär keine Auswirkungen hat. Durch Wahl der Mikrosatelliten-Loci in Regionen, die eventuell Deletionen zeigen, ist allerdings die Wahrscheinlichkeit hoch, dass bei einer vorgefundenen Deletion auch das benachbarte Tumorsuppressorgen verloren gegangen ist. Zudem konnten durch die kombinierte Anwendung von mehreren Primern für unterschiedliche Loci Rückschlüsse gezogen werden auf das Ausmaß der Verluste auf Chromosom 8.

PCR-Zutaten	Konzentration	Endkonzentration	Menge
H ₂ O steril			22,3 µL
DMSO	100%	5%	1,5 µL
Reaktionspuffer	10 x	1 x	3,0 µL
MgCl ₂	50 µM	1,5 µM	0,9 µL
dNTP	10 mM	0,2 mM	0,6 µL
Primer	15 µM	0,3 µM	0,6 µL
Taq-Polymerase	5 U/µL	0,54 U/µL	0,1 µL
Template-DNA			1,0 µL
Gesamt			30 µL

Tab. 8: Master-Mix für Standard-PCR-Reaktion (Endkonzentration im Master-Mix)

Die verwendeten Primer sowie die jeweils erforderlichen Annealing-Temperaturen können der Tab. 4 im Kapitel 2.1.3.4.1 entnommen werden. Sämtliche Reagenzien für die PCR wurden auf Eis pipettiert, um die Haltbarkeit der Substanzen zu erhöhen und unspezifische Reaktionen zu minimieren. Die Zusammensetzung des Standard-PCR-Ansatzes ist obiger Tab. 8 zu entnehmen.

Nachdem sämtliche Zutaten für den Master-Mix pipettiert waren, wurden sie auf dem Schüttler gut durchmischt und je 29 μL in die Reaktionsgefäße pipettiert. Anschließend wurde die aus der DNA-Isolierung erhaltene Template-DNA (1 μL) zum Master-Mix pipettiert. Bei schwachen Banden wurde bei Wiederholungen auch mehr DNA verwendet, um das Ergebnis zu verbessern. Dabei wurde dann dementsprechend weniger H_2O eingesetzt. Nachdem das Gemisch noch einmal kurz geschüttelt und abzentrifugiert worden war, kamen die Proben in den auf 94°C vorgeheizten Thermocycler (mit geheiztem Deckel), um eine unspezifische Reaktion während des Aufheizens zu verhindern, und das entsprechende PCR-Programm wurde gestartet:

Schritt	Operation
1	94°C , 2 min
2	1°C/s auf 94°C
3	94°C , 1 min
4	1°C/s auf AT
5	AT, 1 min
6	1°C/s auf 72°C
7	72°C , 1 min
8	gehe zu 2, 34 x
9	72°C , 8 min
10	4°C für immer

Tab. 9: Standard-PCR-Programm; Legende: AT = Annealing-Temperatur des Primers

Schritt 9 führt zu einer wesentlich höheren Ausbeute durch die terminale Elongation. Die automatische Kühlung ermöglichte auch PCR-Reaktionen über Nacht. Im Anschluss an die PCR-Reaktion wurden die Proben im Kühlschrank aufbewahrt, für längere Zeit jedoch eingefroren.

2.2.4.5 Auftrennen der PCR-Produkte mittels Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Aufgrund ihrer Mobilität können DNA-Moleküle unterschiedlicher Länge in Gelen getrennt werden. Dabei macht man sich die negative Gesamtladung der DNA-Doppelhelix zunutze, die durch die unter physiologischen Bedingungen deprotoniert vorliegenden Phosphatgruppen entsteht. Mit Polyacrylamidgelen lassen sich PCR-Amplifikate bis maximal 1.000 bp Länge sehr hochauflösend, das heißt bis zu einer Base Unterschied, auftrennen (Sambrook et Russel, 2001). Bei porösen Agarosegelen dagegen ist zwar eine Auftrennung von DNA-Molekülen bis zu 20 kb möglich, jedoch mit niedrigerer Auflösung.

In Anwesenheit von Tetramethylethyldiamin (TEMED) und Ammoniumpersulfat (APS) polymerisiert das Monomer Acrylamid zu langen Ketten, welche durch das vorhandene Methylbisacrylamid quervernetzt wird. Die Porengröße kann dabei über die Acrylamidkonzentration variiert werden.

Nach Anlegen einer Spannung wandern die DNA-Fragmente im elektrischen Feld durch die Poren des Gels, wobei die elektrophoretische Mobilität umgekehrt proportional zum Logarithmus der Anzahl ihrer Basen ist: Je größer das DNA-Molekül, desto kleiner ist also die Strecke, die es im Gel zurücklegt.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden die PCR-Amplifikationsprodukte in einem 30 x 38 cm großen 6,7%igen denaturierenden PAA-Gel aufgetrennt.

Hierfür wurden zunächst sämtliche Bestandteile der Gelkammer gereinigt und mit 70%igem Ethanol entfettet. Um das Lösen des Gels nach Abschluss der Elektrophorese von der Kammer zu erleichtern, wurde diese unter dem Abzug mit 1,5 mL Sigmacote, einer silikonähnlichen, wasserabweisenden Substanz, beschichtet und die Gelapparatur nach Herstellerangaben zusammengesetzt.

Unter dem Abzug wurden die Reagenzien des Gelmixes zusammengemischt. Bei diesem Arbeitsschritt ist schnelles Arbeiten notwendig, da die Mischung rasch auspolymerisiert. Die Gellösung wurde mit einer großen Spritze aufgezogen und gleichmäßig in den Spalt zwischen Gelkammer und Glasplatte gespritzt, wobei darauf geachtet wurde, dass keine Luftblasen in das Gel gelangten, was besonders im Bereich der Laufstrecke der DNA ein Hindernis dargestellt hätte. Zum Abschluss wurde in das noch flüssige Gel zwischen Glasplatte und Gelkammer ein Kamm mit 40 Zinken eingebracht, welche die späteren Geltaschen, die sogenannten Slots, bildeten.

Nach ca. 60 min war das Gel auspolymerisiert, so dass nun die Gelkammer mit 1,1 L Laufpuffer (bestehend aus 110 mL 10x TBE und 990 mL Aqua dest) gefüllt und der Kamm vorsichtig herausgezogen werden konnte. Die entstandenen Slots wurden mit einer Spritze kräftig ausgespült und das Gel auf ca. 50°C mit 1.500 bis 2.000 V für ca. 10 min vorgeheizt. Hierbei sollte die Umgebungstemperatur sowie direkte Sonnenbestrahlung berücksichtigt werden. In der Zwischenzeit wurden die aufzutrennenden PCR-Amplifikate für die Gelelektrophorese wie folgt aufbereitet:

1. Zusammenpipettieren von 3 μ L PCR-Produkt und 3 μ L Loading-Puffer
2. Denaturieren der DNA bei 94°C für 3-5 min,
wonach die DNA nun einzelsträngig vorliegt
3. Proben unverzüglich auf Eis stellen,
was ein erneutes Hybridisieren der DNA-Stränge verhindert

Vor dem Auftragen der Proben wurden nochmals alle Slots gespült, dann wurden pro Slot von links nach rechts je 6 μ L der Proben mit einer Pipette in die Geltaschen eingebracht. Beim Pipettieren musste darauf geachtet werden, dass es nicht versehentlich durch unsauberes Arbeiten zu einem Vermischen der Proben durch Überschwappen in einen benachbarten Slot kam. Deshalb sollten nur intakte Slots verwendet werden und im Falle eines Probenübertritts die nächste Geltasche ausgespart werden. Eventuelle Auslassungen von Slots wurden ebenso wie die Probennummern notiert, um die spätere korrekte Zuordnung der Slots und die Beschriftung der getrockneten Silbergele zu erleichtern.

Zum Abschluss wurden links und rechts der Proben je 1,5 μ L Marker aufgetragen. Nach der Beladung des Gels erfolgte eine elektrophoretische Auftrennung bei ca. 1.800 V und 400 mA in einem Temperaturbereich von 50-55°C. Da im Regensburger Labor dieser Vorgang an großen Fenstern stattfand, empfiehlt es sich, bei direkter Sonneneinstrahlung die Rollläden herunterzulassen, da dadurch erhebliche Temperatursteigerungen und somit Störungen des Ablaufs vermieden werden können. Das Ende der Gelelektrophorese war nach etwa 60 bis 75 Minuten erreicht, sobald die Proben bzw. Xylene Cyanol ca. 25 cm weit gewandert waren. Anschließend wurde der Laufpuffer abgegossen und die Glasplatte mitsamt dem Gel behutsam von der Gelkammer getrennt.

Damit war die Auftrennung der DNA-Amplifikate abgeschlossen. Sie mussten allerdings noch sichtbar gemacht werden, was im nächsten Schritt erfolgte:

2.2.4.6 Silberfärbung von Polyacrylamid-Gelen

Bei der auf Budowle et al. (1991) zurückgehenden Silberfärbung werden lösliche Ag^+ -Ionen durch ein Reduktionsmittel (Formaldehyd/ Na_2CO_3) in elementares, metallisches Silber (Ag) überführt, welches einen sichtbaren schwarzen Niederschlag bildet. Das Redoxpotential der Reaktion ist so gewählt, dass das im PAA-Gel komplexierte Ag^+ nur in Gegenwart eines Biomoleküls, also der DNA, reduziert werden kann. Hinsichtlich der LOH-Analyse ist die Silberfärbung zwar weniger sensitiv als die Autoradiographie, dennoch wurde wegen der Einfachheit des Verfahrens und der größeren Arbeitssicherheit der Silberfärbung gegenüber radioaktiven Methoden der Vorzug gegeben.

Vor der eigentlichen Färbung wurde zunächst ein Plexiglasrahmen auf das Gel gelegt und mit Klammern eng festgespannt. Dies ermöglichte eine direkte Applikation der Färbelösungen auf das Gel, wobei der Plexiglasrahmen der Glasplatte eng anliegen sollte, damit wenig Flüssigkeit zwischen Rahmen und Glasplatte auslaufen konnte. Falls auf diese Weise ein längerer Kontakt zwischen den Reagenzien und dem Gel auf der Glasplatte gewährleistet war, durften nun die Lösungen nach folgendem Protokoll auf das Gel gegossen werden:

Schritt	Lösung	Zeit	Effekt
1	10% Ethanol	5 min	Fixierung
2	1% Salpetersäure	3 min	Oxidation
3	Aqua dest.	1 min	Waschen
4	0,012 M (0,2%) Silbernitrat	20 min	Färben
5	0,28 M Na_2CO_3 /0,019% Formalin	mehrmals kurz*	Entwickeln
6	10% Essigsäure	2 min	Abstoppen
7	Aqua dest.	2 min	Waschen

Tab. 10: Protokoll für die Silberfärbung (* bis zum Erscheinen der Banden)

Dabei gilt es Folgendes zu beachten:

- Die Inkubation des Gels mit Silbernitrat muss in abgedecktem Zustand erfolgen, um die Reduktion des Silbernitrats durch Staub und Licht so gering wie möglich zu halten.
- Das Waschen muss gründlich durch mehrmaliges Schwenken und wieder Abgießen des entionisierten Wassers erfolgen.
- Bei der Entwicklung der PAA-Banden in Schritt 4 fungiert die Natriumbikarbonat-Formalin-Mischung als Reduktionsmittel, das lösliche Silberionen in Gegenwart von DNA zu

elementarem Silber reduziert. Dabei fällt ein schwarzer Niederschlag aus, der die Banden sichtbar macht.

Nach Entfernen des Färberahmens wurde ein Stück Whatman-Chromatographiepapier passender Größe auf das Gel gelegt, leicht angedrückt und anschließend mit dem Gel von der Glasplatte entfernt. Das Gel wurde nun mit Frischhaltefolie bedeckt. Ein starker Silberniederschlag auf dem Gel konnte durch mehrmaliges Abziehen mit einer neuen Folie zum Teil entfernt werden. Die Trocknung des Gels erfolgte unter Vakuumbedingungen bei 80°C für ca. 60-120 min im Geltrockner. Zuletzt bekam das Gel eine Beschriftung: Name des Primers, jeweils Tumorblocknummer des Archivs, Probennummer, T für Tumor und N für Normalgewebe, Positiv- und Negativkontrolle sowie Datum und Name des Gel-Verantwortlichen. So wurden spätere Verwechslungen vermieden und eine Rückverfolgung war gewährleistet.

2.2.4.7 Interpretation des Bandenmusters von Polyacrylamid-Gelen

Durch die PCR-Reaktion wird eine primerspezifische Sequenz eines bestimmten Chromosomenabschnitts amplifiziert und erscheint im Silbergel als eine Bande. Da jeder Mensch jeweils zwei identische Chromosomen, ein väterliches und ein mütterliches, besitzt, werden beide Genloci amplifiziert. Tragen diese Genloci beide das gleiche Allel (gleiche Basenlänge), so liegen deren PCR-Amplifikate auf dem Gel übereinander, es erscheint nur eine Bande, der Patient ist homozygot bezüglich dieses Genlocus (Abb. 8). Handelt es sich aber um zwei verschiedene Allele (unterschiedliche Basenlänge), dann zeigen sich zwei distinkte Banden auf dem Gel, die das väterliche und mütterliche Allel repräsentieren, der Patient ist heterozygot (Abb. 9). Der Begriff der Heterozygotie beschränkt sich hier also allein auf die Länge der Allele, eine unterschiedliche Basensequenz kann dagegen im Silbergel nicht erfasst werden:

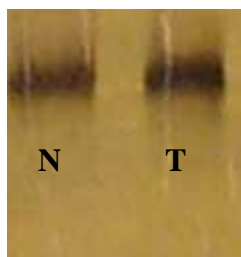


Abb. 8: Patient homozygot

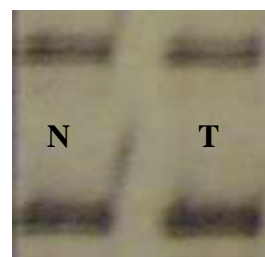


Abb. 9: Patient heterozygot

Beide Abbildungen zeigen jeweils links das Normalgewebe (N) und rechts den Tumor (T).

Als LOH (Loss of Heterozygosity) bezeichnet man im Modell von Knudson (1985) den Verlust des zweiten Allels bei vorliegender Keimbahnmutation des ersten Allels. LOH bedeutet jedoch eigentlich eine allelische Imbalance im weitesten Sinne, da das alterierte erste Allel durch das zweite Allel nicht mehr balanciert werden kann. Der Begriff LOH umfasst daher alle Mechanismen, die zu einem Funktionsverlust des zweiten Allels führen: Deletion, mitotische Rekombination, nichtdisjunktionaler Chromosomenverlust, Genkonversion, Punktmutation oder epigenetische Inaktivierung von Allelen (Tischfield, 1997). Eine Deletion des zweiten Allels bei bereits deletiertem erstem Allel bezeichnet man als homozygote Deletion. Wenn jedoch im Folgenden von LOH die Rede ist, dann schließt dieser Begriff lediglich Deletionen, den Verlust ganzer Chromosomen (Monosomie) und mitotische Rekombinationen ein, da nur diese Ereignisse durch die LOH-Analyse mit PCR und Silbergelen erfasst werden können.

Patienten mit homozygotem Allelstatus bekamen die Bezeichnung „nicht informativ“ (NI), eine LOH-Analyse war in diesen Fällen nicht möglich. Ein LOH wurde dann konstatiert, wenn der Patient beim Normalgewebe einen heterozygoten Status hatte und im Tumor ein Allel verloren gegangen war:

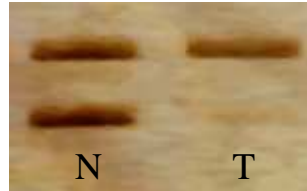


Abb. 10: Verlust des unteren Allels beim Tumor (T) rechts, das Normalgewebe (N) links ist heterozygot.

In den meisten Fällen war das Allel jedoch nicht komplett verschwunden, sondern lediglich von schwächerer Bandenintensität. Der Grund dafür ist die fast stets vorhandene, mehr oder weniger stark ausgeprägte Kontamination von Tumorarealen mit Entzündungszellen wie Lymphozyten und Makrophagen sowie mit benachbarten Stromazellen. Diese Zellen enthalten noch das im Tumor deletierte Allel, welches dann bei der PCR amplifiziert wird und auf dem Gel die beschriebene Bande ergibt. Ein weiteres Problem lag darin, dass auch beim Normalgewebe nicht immer beide Allele gleich stark amplifiziert wurden. Dies ist eventuell auf unterschiedlich starke Schädigung der Allele durch die Fixierung, auf einen Polymorphismus im Bereich der zum Primer komplementären Sequenz, auf spezifische Inhibitoren sowie auf eine generell zu beobachtende präferentielle Amplifikation des kürzeren Allels zurückzu-

führen. Durch diese inhomogene biallelische Amplifikation können sowohl falsch positive als auch falsch negative Resultate entstehen.

Sowohl die Mitamplifikation von kontaminierendem Normalgewebe als auch die inhomogene biallelische Amplifikation veranlassten dazu, das Verhältnis (Ratio) der beiden Banden des Normalgewebes als Referenz zu nehmen. Ein LOH wurde dann konstatiert, wenn sich die Ratio der Tumor-Banden deutlich ($> 50\%$) von der Ratio der Normal-Banden unterschied:

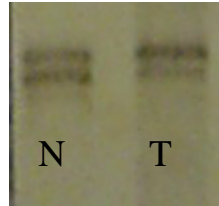


Abb. 11: Der Tumor (T, rechts) zeigt einen Verlust des unteren Allels, weil die Ratio von oberer zu unterer Bande im Vergleich zum Normalgewebe (N, links) deutlicher als 50% ist.

Da die Intensität der Banden auf dem Silbergel nicht quantifiziert werden kann, handelt es sich letztlich um eine subjektive Methode mit einem gewissen Interpretationsspielraum. Dennoch waren die LOHs in den allermeisten Fällen sehr eindeutig, im Zweifelsfall wurde das Ergebnis nicht als LOH gewertet.

Trotz exakter Durchführung der LOH-Analyse existieren verschiedene Fehlerquellen, die das Ergebnis ungünstig beeinflussen können (siehe Kapitel 4.1.2).

Als Nebenbefund der Mikrosatellitenanalyse wurden auch Fälle von Mikrosatelliteninstabilität (MSI) erfasst. Aufgrund des Fehlens von Mismatch-Repair-Proteinen können Replikationsfehler in hochrepetitiven DNA-Abschnitten nicht ausgebessert werden. Dadurch ändert sich die Länge der Mikrosatelliten-DNA (meist Verkürzung) in den betroffenen Zellen. Auf silbergefärbten PAA-Gelen zeigt sich dieses Phänomen im Auftreten einer neuen Bande im Tumor gegenüber dem Normalgewebe, dem sogenannten Allel-Shift (Dietmaier et al., 1997) (Rüschhoff et al., 1998):



Abb. 12: Der Tumor (T, rechts) zeigt den Hinzugewinn einer Bande unter den zwei oberen Banden im Vergleich zum Normalgewebe (N, links). Dies wurde als MSI gewertet.

2.2.5 Gewebs-Mikroarrays (Tissue-Micro-Arrays, TMA)

Die Untersuchung von Einzelpräparaten stellt vor allem bei großen Fallzahlen einen enormen finanziellen und arbeitsintensiven Aufwand dar. Deshalb ist es sinnvoll, aus den jeweils interessanten Regionen gezielt kleine Gewebeproben zu entnehmen und diese gemeinsam auf einen Objektträger in einem einzigen Schritt zu bearbeiten. Bei dieser Dissertation kamen diese Tissue-Micro-Arrays (Paraffinblöcke mit multiplen Gewebeproben) bei den FISH-Färbungen sowie bei der Immunhistochemie zum Einsatz.

Während der histopathologischen Beurteilung wurden dazu auf den für den jeweils vorliegenden Paraffinblock repräsentativen HE-Schnitten die für die Fragestellung der Arbeit entscheidenden Areale mit einem dünnen Markerstift gekennzeichnet. Als nächstes mussten die auf dem Objektträger markierten Stellen auf dem Paraffinblock gefunden werden. Zeigte sich eine zu große Diskrepanz zwischen HE-Schnitt und Paraffinblock, so wurde vor dem weiteren Vorgehen ein neuer HE-Schnitt angefertigt.

Nun konnten aus den so markierten Gewebeblöcken die relevanten Gewebebezirke zylinderförmig ausgestanzt werden. Der Durchmesser der Stanzen betrug ca. 1,2 mm. Zuvor wurden die korrekten Markierungen der Blöcke unmittelbar vor dem Entnehmen der Proben erneut validiert, indem der HE-Schnitt lichtmikroskopisch kontrolliert wurde. Zur Entnahme des Gewebes wurde die von der Firma Zytomed mitgelieferte Handstanze verwendet. Sie besitzt eine geschlossene Hohlzylinder mit einem Innendurchmesser von 1,2 mm, in der ein Stempel steckt. Mit der Stanze wird senkrecht auf dem relevanten Bezirk in die bei Raumtemperatur gelagerten Paraffinblöcke unter sanftem Druck bis zum Anschlag an die Kunststoffkassette eingestochen. Nach leichtem Hin- und Herdrehen der Stanze, was zum Ablösen des Gewebestanzzylinders in der Nadel vom Boden führt, wird die Nadel wieder senkrecht herausgezogen. Durch Drücken auf den Stempel in den Hohlzylinder kann das Gewebe aus der Stanze entfernt werden.

Bevor die Gewebestanze in die dafür vorgesehenen Transportröhrchen abgestreift wurde, war die Unterseite der Stanzen mit einem wasserfesten Stift gekennzeichnet worden. So konnte die Oberseite der Stanzen, die später zum Anschnitt kommen sollten, eindeutig erkannt werden. Da eine nachträgliche Zuordnung einer Stanze zu ihrem Ursprungsblock kaum möglich ist, war es wichtig, die einzelnen Stanzen sofort nach ihrer Gewinnung in je eines der nummerierten Transportgefäße zu geben und die Nummer mit dem entsprechenden Fall zu notieren.

Nach Abschluss des Stanzens wurden jeweils ca. 20 bis 40 gewonnene Gewebszylinder in einem neuen Paraffinblock eingebettet. Von dem fertigen Multiblock wurden 4 µm dicke Schnitte angefertigt. Der erste wurde mit Hämtoxylin-Eosin gefärbt, um die Qualität der Stenzen beurteilen zu können. So wurden sämtliche Stenzen von einem Pathologen (A. H.) begutachtet und die jeweilige Histologie dokumentiert. Vom letzten Schnitt der Serie wird ebenfalls eine HE-Färbung angefertigt und begutachtet, um gewährleisten zu können, dass bei allen dazwischen liegenden Schnitten ebenfalls die erwartete Entität vorzufinden ist.

2.2.6 Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung

Wie bereits im Kapitel 1.1.4.8 angesprochen, wird die Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung zur Darstellung definierter Chromosomen und Chromosomenabschnitte eingesetzt:

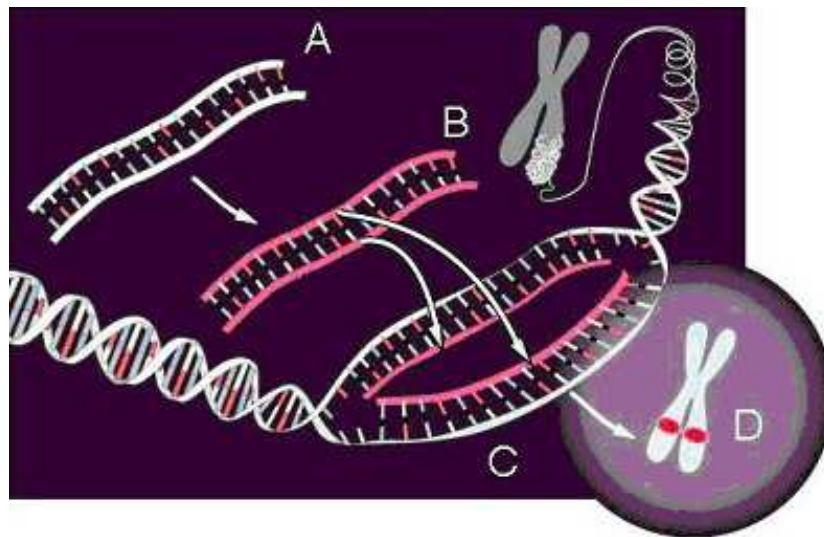


Abb. 13: Prinzip der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (online im Internet, modifiziert: URL: <http://www.genome.gov/Pages/Hyperion/DIR/VIP/Glossary/Illustration/fish.cfm> - Stand: 12.11.2007): Eine DNA-Sonde (A) wird mit molekularbiologischen oder chemischen Methoden behandelt und ist anschließend markiert (B). Sonden-DNA und Ziel-DNA werden zu Einzelsträngen aufgeschmolzen (nicht gezeigt), anschließend können sich passende Sequenzen aneinanderlagern (C). Dadurch entsteht an der entsprechenden Stelle des Präparats eine mikroskopisch nachweisbare Markierung (D).

Dabei basiert sie auf dem Prinzip der komplementären Basenpaarung: Eine Einzelstrang-DNA-Probe, die biotin- oder digoxigeninmarkiert mit Hilfe indirekter Immunfluoreszenz-techniken (d. h. durch fluoreszenzmarkierte Antikörper) dargestellt werden kann, kombiniert sich mit einem komplementären DNA-Strang in einem Chromosom der Zielzelle. Durch die

Basenpaarung der komplementären Proben- und Ziel-DNA-Stränge entsteht eine doppelsträngige Hybrid-DNA. Die Fluoreszenzsignale sind sowohl im Metaphasenspread als auch im intakten Zellkern sichtbar (Cremer et al., 1995).

Aufgrund vieler Vorzüge bot sich die FISH im Rahmen dieser Dissertation als gute Ergänzung an. Dabei wurde nach den Empfehlungen des Herstellers das Multicolor-FISH-Sonden-Set (Abbott Laboratories, Abbott Park, IL, USA) verwendet, das ermöglicht, Aberrationen auf den Chromosomen 3, 7 und 17 durch Zentromersonden sowie Deletionen von p16 auf dem Genlocus 9p21 zu detektieren.

Die darin verwendeten Modifikationen im Vergleich zu früheren Kits ermöglichten beste Ergebnisse: sehr gute Signalqualität, wenig störendes autofluoreszierendes Material bei noch ausreichend gut erhaltenen Zellkernen.

Die Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) wurde an Schnitten von oben erläuterten Multiblöcken (Tissue-Micro-Arrays) durchgeführt. Dafür werden zwei aufeinander folgende Tage benötigt: Am ersten Tag erfolgt die Entparaffinierung bis hin zur Hybridisierung, am Folgetag die Schritte DAPI-Färbung und Konservierung:

2.2.6.1 Experimentelle Durchführung der FISH

Tag I :

Als Vorbereitung müssen vor der eigentlichen Durchführung die Lösungen und Puffer hergestellt werden. Die Grundrezepte sind im Materialteil (Kapitel 2.1.3.5) nachzulesen.

- Natriumzitat in 95°C Wasserbad
- Pepsin abwiegen
- HCl-Lösung ins Wasserbad (37°C)

Entparaffinierung:

Dazu müssen die auf die Objektträger aufgezogenen Schnitte für 25 min in einen Brutschrank bei 72°C, bevor sie anschließend bei Raumtemperatur fünf Minuten abkühlen dürfen. Danach werden sie zweimal für zehn Minuten in je einer frischen Xylol-Lösung gewaschen.

Wasserentzug:

Der Wasserentzug erfolgt durch 70-100%iges Ethanol, wodurch das Xylol ausgewaschen wird. Als nächstes werden die Schnitte in Aqua dest. gewaschen.

1. Vorbehandlung:

Die Objektträger werden für 40 min im Wasserbad bei 95°C in 0,01 M Natriumzitat vorbehandelt.

2. Vorbehandlung:

Anschließend erfolgt die Vorbehandlung mit Pepsin 0,1% mit 0,01 M HCl für 10 min bei einer Temperatur von 37°C.

Denaturierung der Sonde:

Die Sonde wird dazu aus dem -20°C Gefrierfach genommen und mit einem Schwamm ins 73°C warme Wasserbad für 5-15 min unter lichtgeschützten, dunklen Bedingungen gegeben. Der Rest sollte unverzüglich wieder ins -20°C Gefrierfach, die Proben also nur kurz auftauen.

Waschen:

Darauf werden für je 1 min die Objektträger bei Raumtemperatur in einer ansteigenden Alkoholreihe gewaschen (70%, 85%, 100%), bevor sie kurz mit 2 x SCC gewaschen werden.

Denaturierung des Gewebes:

Dies muss ebenfalls im Dunklen erfolgen. Der Sondenmix (Menge je nach Anzahl der Stenzen: meist ca.10 µL) wird auf die Objektträger pipettiert und anschließend mit einem Deckglas bedeckt. Dieses wird luftdicht mit Fixogum abgeschlossen und der Objektträger für 5 min auf der Heizplatte zur DNA-Doppelstrangdenaturierung erwärmt.

Inkubation:

Die Objektträger werden in eine feuchte Kammer gelegt, die zur Inkubation über Nacht bei 37°C im Brutschrank verbleibt.

Tag II:

Als Vorbereitung für den zweiten Tag werden folgende Lösungen ins 37°C warme Wasserbad gestellt: 4 x SCC, 2 x SCC, 1 x SCC

Nach dem vorsichtigen Entfernen des Deckglases erfolgen dreimal Waschvorgänge von je 10 min im 50°C Wasserbad, wobei nacheinander 4 x SCC (mit NP40 0,3%), 2 x SCC und 1 x SCC verwendet werden.

Die Objektträger werden danach eine Minute bei Raumtemperatur in Millipor-Wasser gegeben und anschließend getrocknet, um eine bessere DAPI-Färbung zu erzielen. DAPI wird auf den Spot gegeben und mit festem Druck eingedeckelt. Das Deckglas wird mit Eukitt unter dem Abzug umrandet. Die Lagerung der Objektträger sollte im Dunklen im Kühlschrank bei +2 bis +8°C erfolgen. Dadurch wird eine längere Haltbarkeit erzielt.

2.2.6.2 Bewertungs- und Auswertungskriterien der FISH-Signale

Die Resultate der FISH ließen sich unter Berücksichtigung der bereits von anderen Autoren beschriebenen Bewertungskriterien evaluieren (Hopman et al., 1988, 1989 und 1991) (Sauter et al., 1994 und 1995) (Wheeless et al., 1994):

- Die auszählenden Zellkerne wurden in der Gegenfärbung mit DAPI selektiert, wobei die übereinstimmende Zellkernmorphologie ausschlaggebend war. Kleine, runde und lymphozytenähnliche Zellkerne sowie Zellverbände mit unbefriedigendem Zytoplasma-verdau und unscharfen Zellgrenzen wurden grundsätzlich nicht in die Auswertung integriert. Da durch vorherige gezielte Auswahl der Stenzen hauptsächlich Tumorgewebe dargestellt war, musste zwar an Verunreinigung durch vorhandene Entzündungszellen wie Lymphozyten und Makrophagen sowie eventuell benachbarte Stromazellen gedacht werden, doch meist war das Bild der Zellen, die ausgewertet wurden, sehr homogen und die Ergebnisse für die Auswertung selten in Grenzbereichen. Pro untersuchter Stanze wurde versucht, bis zu 50 Zellen auszuzählen.
- In vorangegangenen Arbeiten wurde ein Probe nur dann ausgewertet, wenn mindestens zwei Drittel der Zellkerne in den repräsentativen Regionen interpretierbar waren. Andernfalls, z. B. bei unscharfen Zellkernumrissen und unspezifischen oder zu diffusen FISH-Signalen, wurden die betroffenen Regionen dort von der Analyse ausgeschlossen. Dies musste in keinem der Fälle im Rahmen dieser Arbeit geschehen. Grund mögen die inzwischen verbesserten Sonden-Kits sein.
- Zwei genspezifische Signale, die räumlich weniger als 0,5 µm auseinander lagen, wurden im Sinne eines Signals gewertet, zumal davon auszugehen war, dass es sich in diesem Fall um Schwesterchromatiden in der S- oder G₂-Phase befindlicher Zellkerne handelte.

- Von einer zweiten Person wurden anfangs stichprobenartig einige FISH-Präparate nachgezählt, die Ergebnisse verglichen und gegebenenfalls der Grund für die unterschiedlichen Resultate gesucht. So wurde versucht, ein einheitlicheres, reproduzierbareres Bewertungssystem zu ermöglichen.

Zur Auswertung der FISH-Objektträger musste zuerst auf dem TMA eine Stanze herausgesucht werden, um anhand der Lokalisation die betroffene Nummer zu notieren. Darauf wurden ausgehend von links oben die Stanzenpräparate mäanderförmig durchgemustert und die Zellkerne ausgezählt. Pro Zellkern wurde die Anzahl der roten, grünen und blauen Zentromersignale ebenso wie die gelben Signale handschriftlich in Tabellenform notiert und später in das Computerprogramm Excel übertragen. Schwarz et al. erarbeiteten in ihrer Arbeit (2004) Auswertkriterien zur Interpretation der UroVysion-Tests der Firma Abbott (Wiesbaden) an histologischen Schnittpräparaten. Dieser Sondenkit war zu der Zeit nur an zytologischen Präparaten etabliert.

Jede Zelle wurde gleichzeitig auf die Zentromersignale der Chromosomen 3, 7 und 17 sowie auf den Genlocus p16 auf 9p21 hin analysiert (siehe Abb. 19 im Kapitel 3.1.2). Eine Zelle wurde als auffällig bewertet, wenn mehr als eines der drei Zentromersignale vermehrt war (>2 Signale pro Zelle) oder 9p21 deletiert war (kein Signal). Polyploide Zellen (vier Signale bei allen drei Sonden) wurden als normal (euploid) gewertet. Als relative Deletion von p16 wurden die Fälle gewertet, bei denen die Anzahl der 9p21-Signale mehr als eine Einheit unter dem Durchschnittswert der Zentromersignale lag. Als Cut-off-Punkt wählte man die dreifache Standardabweichung, basierend auf dem Vorkommen von Polysomie und 9p21-Deletion in nicht-tumorösem Urothelgewebe. Eine Stanze wurde als aberrant bezeichnet, wenn mehr als neun von 50 Zellen Polysomie zeigten ($>18\%$ der Zellen). Einer Probe wurde dann die Eigenschaft einer p16-Deletion zugeschrieben, wenn mehr als 7 von 50 Zellen ($>14\%$ der Zellen) eine relative Deletion von 9p21 zeigten. Da nicht überall genügend Zellen vorhanden waren, wurden schließlich mindestens 30 Zellen für die Auswertung gefordert. Falls aber mehr als 30 Zellen vorlagen, wurden 50 Zellen ausgezählt.

2.2.7 TP53-Sequenzierung auf den Exons 5 bis 8

Der nächste Teil der Arbeit bestand in der Sequenzierung des Tumorsuppressorgens TP53. Die Untersuchungen beschränkten sich auf die Exons 5 bis 8 des aus 11 Exons bestehenden Gens, weil ein Großteil aller Punktmutationen innerhalb dieser Exons lokalisiert sind (Holl-

stein et al., 1991) (Grennblatt et al., 1994) (Hainaut et Hollstein, 2000). Die in dieser Arbeit angewandte Methodik der Sequenzierung wurde von Hartmann et al. (2002) beschrieben.

2.2.7.1 Amplifikation der DNA durch nested-PCR

Zunächst mussten die Exons in ausreichender Menge für die folgende Sequenzreaktion amplifiziert werden. Als Technik hierfür wurde die nested-PCR gewählt. Das Prinzip dieser Methode besteht darin, einer normalen PCR eine zweite PCR folgen zu lassen, wobei in dieser als Template-DNA die PCR-Produkte der ersten Reaktion eingesetzt werden. Die Primer der zweiten Reaktion werden dabei so gewählt, dass sie innerhalb der Zielsequenz der ersten Reaktion binden. Auf diese Weise wird die Ausbeute an Amplifikat-DNA wesentlich erhöht, was insbesondere bei degradierter DNA am formalinfixierten Material eine Rolle spielt. Folgende Ansätze wurden für die Outer- und Inner-PCR verwendet:

PCR-Reagenzien	Konzentration	Endkonzentration im PCR-Mix	Volumen (µL)
H ₂ O steril			20,5
Rx-Puffer+ MgCl ₂	10 x	1 x	2,5
dNTP	10 mM	0,2 mM	0,5
Primer			0,3
Taq-Polymerase			0,2
Template-DNA			1,0
Gesamt			25,0

Tab. 11: Protokoll der nested-PCR; Legende: Rx-Puffer = Reaktions-Puffer

Alle anderen Schritte sind analog zu der oben für die LOH- und MSI-Analyse beschriebenen PCR (Kapitel 2.2.4.4). Die zweite Reaktion durfte nicht am gleichen Arbeitsplatz durchgeführt werden, um eine Kontamination anderer First-Round-PCRs zu vermeiden. Die erhaltenen PCR-Produkte konnten bis zur Durchführung der PEG-Fällung im Kühlschrank bei 4°C aufbewahrt werden, für eine längere Lagerung wurden sie bei -20°C eingefroren.

2.2.7.2 PEG-Fällung der PCR-Produkte

Um in der nachfolgenden Sequenzreaktion optimale Ergebnisse zu erhalten, müssen die PCR-Produkte zunächst von freien dNTPs und Primern gereinigt werden. Hierzu dient die Fällung mit Polyethylenglykol (PEG). Dabei wurde nach folgendem Protokoll verfahren:

1. 30 μ L PCR-Produkt mit 30 μ L PEG-Mix vermischen, gut schütteln
2. 20 min bei Raumtemperatur inkubieren
3. 30 min bei 13.000 rpm zentrifugieren
4. Überstand vorsichtig mit Pipette abziehen, dabei auf Pellet achten
5. 100 μ L Ethanol absolut zugeben, nicht mehr schütteln
6. 10 min bei 13.000 rpm zentrifugieren
7. Überstand erneut vorsichtig mit Pipette abziehen, dabei auf Pellet achten
8. Proben für ca. 5 min (Temperatur: Medium) in der Speed Vac[®] trocknen
9. Pellet in 20 μ L destilliertem Wasser lösen

Die Proben konnten bei -20°C im Gefrierschrank gelagert werden oder sofort auf das Agarosegel aufgetragen werden.

2.2.7.3 Agarose-Gelelektrophorese

Zur Herstellung des Agarosegels wurden 2,5 g Agarose in einem Glasfläschchen mit 1xTAE-Puffer auf 100 mL aufgefüllt, vorsichtig in der Mikrowelle erhitzt, der flüssige Mix in Gelform gegossen und zwei Kämme eingehängt. Während das Gel aushärtete (30 min), wurden 3 μ L des PCR-Produkts mit 3 μ L Stopp-Puffer in ein 0,5 mL-Eppendorf-Cup pipettiert, vermischt und abzentrifugiert. Das ausgehärtete Gel wurde in die Gelhalterung gelegt und die Halterung mit 1x TAE-Puffer aufgefüllt, so dass die Slots gerade mit Puffer bedeckt waren. In diese wurden dann 1,5 μ L Hind-III-Marker als Längenstandard aufgetragen sowie 6 μ L der Proben einschließlich der Negativkontrolle.

Die Laufzeit des Gels betrug 30 min bei 110 V. Es wurde anschließend mindestens 15 min in einem 0,05%igem Ethidiumbromid-Bad gefärbt. Die Banden wurden mit einer Kamera mit einer Belichtungszeit von etwa 1 bis 1,2 s photographiert und das Photo sofort ausgedruckt.

2.2.7.4 Sequenzreaktion nach Sanger

Das Prinzip der für die bei der Sequenzreaktion verwendete Didesoxymethode geht auf Frederick Sanger zurück. In der Reaktion hybridisiert der zu untersuchende DNA-Abschnitt an seinem 3'-Ende mit einem Primer, eine Polymerase baut wie bei einer Replikation Desoxyribonukleosid-Triphosphate (dNTPs) an und erzeugt so einen komplementären Strang. Es sind im verwendeten ABI PRISM™ Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit aber auch fluoreszenzmarkierte Didesoxyribonukleosid-Monophosphate (ddNTPs) enthalten, die bei dem Einbau in den Strang wegen einer an der 3'-Stelle der Ribose fehlenden OH-Gruppe zu einem Abbruch führen. So entstehen in zufälliger Reihenfolge verschieden lange DNA-Bruchstücke, die an ihrem 3'-Ende ein fluoreszenzmarkiertes Didesoxyribonukleosid-Monophosphat enthalten und im Sequenzgel des Sequenziergeräts der Länge nach aufgetrennt werden. Dabei ist jeder Bande ein bestimmtes fluoreszierendes Didesoxyribonukleosid-Monophosphat zugeordnet, das bei jedem Lauf von einem Argon-Laser abgetastet wird. Auf diese Weise kann die Abfolge der Basen ermittelt werden. Die Sequenzreaktion wurde nach folgendem Ansatz durchgeführt:

Reagens	Volumen
Terminator Ready Reaction Mix	4 µL
Primer (3,2 µM)	2 µL
Auqa dest.	10-13,5 µL
PEG-gefällte DNA	0,5-4 µL
Gesamt	20 µL

Tab. 12: Protokoll der Sequenzreaktion

Da PCR-Produkte als Template eingesetzt wurden, wurde wegen der Gefahr der Kontamination nicht am PCR-Platz pipettiert. Die Menge der Template-DNA wurde anhand der Bandenintensität im Agarose-Gel abgeschätzt und betrug zwischen 0,5 µL und 4 µL, die unterschiedlichen Volumina wurden durch destilliertes Wasser ausgeglichen. Die Sequenzreaktion wurde getrennt nach *sense* und *antisense* durchgeführt, was einen linearen Anstieg der Produkte im Gegensatz zum exponentiellen Anstieg in der PCR bedingt. Sonst wurden die üblichen PCR-Bedingungen erfüllt. Außerdem sollte man wegen der Empfindlichkeit der Fluoreszenzfarbstoffe die Lichtexposition so gering wie möglich halten. Nachfolgende Tab. 13 zeigt das Programm der Sequenzreaktion:

Schritt	Operation
1	96°C, 15 s
2	1°C/s auf die
3	Annealing-Temperatur, 15 sec
4	1°C/s auf 60°C
5	60°C, 4 min
6	gehe zu Schritt 1, 24x
7	4°C für immer

Tab. 13: Programm der Sequenzreaktion

2.2.7.5 Ethanol-fällung der Reaktionsprodukte

Die Produkte der Sequenzreaktion mussten nun abermals von freien Primern, dNTPs, ddNTPs, unvollständigen Sequenzprodukten und verschiedenen Salzen gereinigt werden. Diese Verunreinigungen würden die Erfassung der Fluoreszenzsignale am Sequenziergerät stören. Die Ethanol-fällung erfolgte nach diesem Protokoll in 1,5 mL-Eppendorf-Cups:

1. 80 µL dest. Wasser
2. 10 µL Natriumacetat 3 M, pH 4,6
3. 250 µL Ethanol 100%
4. 20 µL PCR-Produkt
5. gut mischen
6. 10 min bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubieren
7. 20 min bei 13.000 rpm zentrifugieren, Cups immer in gleicher Richtung einsetzen
8. Überstand abkippen, Rand auf Kleenex abdrücken
9. mit 250 µl Ethanol 70% (frisch ansetzen) versetzen, nicht mehr schütteln
10. 10 min bei 13.000 rpm zentrifugieren
11. Überstand mit doppelter Spitze abziehen, auf Pellet achten
12. 2-5 min im Speed Vac[®] zentrifugieren, bis es ganz trocken ist (Temperatur: Medium)
13. 12 µL HiDi lösen (vortexen und abzentrifugieren)

Falls keine Weiterverarbeitung erfolgt, konnten die Proben in Form des getrockneten Pellets bei -20°C eingefroren und im Gefrierschrank ca. 2 Wochen gelagert werden.

2.2.7.6 Detektion und Auswertung der Fluoreszenzsignale

In die Reaktionsplatten des ABI PRISM 3100 Avant wurde nach dem Belegungsplan der Reaktionsansatz pipettiert und das Gerät durch die Mitarbeiter des Zentrums für Molekulare Diagnostik der Universität Regensburg beladen.

Nach der Beendigung des Sequenzvorgangs erfolgte die Auswertung der Rohdaten auf einem Macintosh-Rechner mit der speziellen Software von ABI-PRISM (Version 3.7). Anschließend erfolgte der Ausdruck des farbigen Chromatogramms. Jedes Chromatogramm enthielt den Namen der Probe, die Basensequenz als Buchstabenfolge und als Folge von Fluoreszenzpeaks, die Nummerierung der DNA sowie weitere Daten zum Sequenzvorgang.

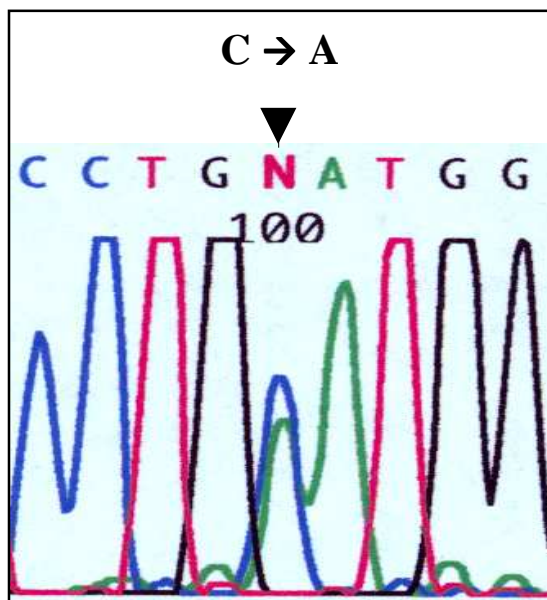


Abb. 14: heterozygote Mutation

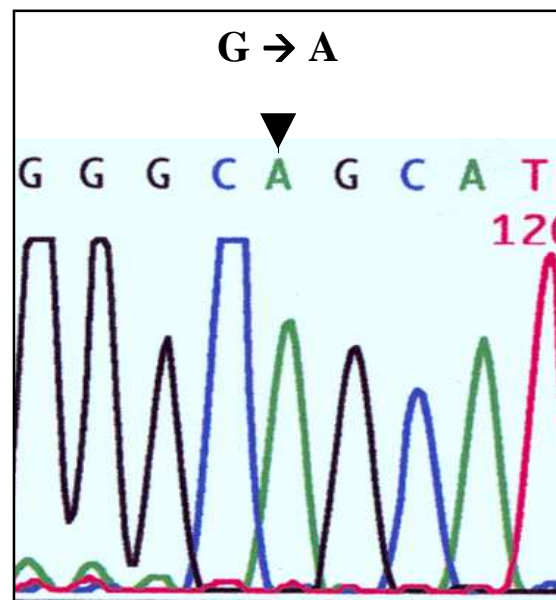


Abb. 15: hemizygote Mutation

Zur Auswertung wurden die Chromatogramme zunächst auf Fehler überprüft (Vergleich der Peaks mit den darüberstehenden Basen) und im Bedarfsfall korrigiert. Hilfreich war in zweifelhaften Fällen auch ein Vergleich mit der komplementären Sequenz. Anschließend wurde durch Lesen der Exonsequenz mit je 10 bp Splicesequenz am 5'- und 3'-Ende und Vergleich mit der Wildtyp-Sequenz nach Mutationen gesucht. Dabei sollte der Peak der mutierten Base in etwa gleich hoch wie derjenige der Wildtyp-Base sein (heterozygote Mutation, d. h. ein Allel ist mutiert, das andere normal; Abb.14). Im Falle einer hemizygoten Mutation (d. h. ein Allel ist mutiert, das andere deletiert) war nur der Peak der mutierten Base sichtbar (Abb. 15). Mit Hilfe einer Schablone, welche die Normalsequenz enthielt, wurde die Sequenz in Buchstabenform kontrolliert, danach die einzelnen Peaks. So konnten Punktmutationen, Deletionen und Insertionen entdeckt werden. Falls eine Mutation ebenfalls im Antisense des Gens gefun-

den wurde, wurde sie bestätigt. Oft waren Überstrahlungsphänomene (z. B. T shadows) sichtbar, die nicht im Antisense zu finden waren und deshalb auch nicht als Mutation gewertet wurden. Trat eine Mutation im Sense und Antisense auf, so wurde der gesamte Ablauf (einschließlich Inner- und Outer-PCR) für diese Probe wiederholt, um auszuschließen, dass die Mutation auf einen Taq-Polymerasefehler während der PCR zurückzuführen war. Die Fehlerrate der Taq-Polymerase liegt bei ca. $10^{-4}/\text{bp}$ (Dietmaier et al., 1999).

Mit der Gleichung $F = 1 - e^{-bfd}$ lässt sich die zu erwartende Fehlerquote berechnen. F ist die Mutationfraktion, b die Länge der Zielsequenz, f die Fehlerrate der Taq-Polymerase und d die Anzahl der PCR-Zyklen (Keohavong et al., 1989). Geht man nun davon aus, dass pro Tumor unter Einbeziehung aller Exons eine Zielsequenz von 700 bp amplifiziert wird, die Zyklenzahl ferner 80 beträgt (2 x 40 bei der nested-PCR), so erhält man durch Einsetzen in die Formel $F = 1 - e^{-700 * 0.0001 * 80} = 99,6\%$. Das heißt, dass praktisch in fast allen Proben ein Fehler zu erwarten gewesen wäre. Rechnet man dies auf die Fehlerrate pro Base um, so kommt man auf einen Fehler pro 703 Basen. Diese Berechnungen zeigen die Notwendigkeit von Wiederholungsreaktionen zur Bestätigung der erhaltenen Ergebnisse.

2.2.8 Technik der FGFR3-Mutationsanalyse

Zur FGFR3-Mutationanalyse wurde die SNaPshot-Methode angewandt, wie sie von van Oers et al. vom Erasmus Universitair Medisch Centrum in Rotterdam, Niederlande 2005 publiziert wurde. Diese inzwischen auch in Regensburg etablierte Technik ist in Abb. 16 dargestellt.

In einer Multiplex-PCR werden dabei gleichzeitig drei Regionen des FGF-Rezeptors 3 amplifiziert, die alle bis jetzt entdeckten FGFR3-Mutationen beinhalten. Nach Entfernen der Exzess-Primer und der dNTPs werden acht SNaPshot-Primer, die neun FGFR3-Mutationen detektieren, zu den PCR-Produkten angelagert und mit einem markierten Didesoxynukleotid erweitert. Anschließend werden diese erweiterten Primer auf einem automatischen Sequenzierer analysiert. Dabei zeigen die Markierungen auf dem eingebauten Nukleotid die An- oder Abwesenheit einer Mutation an.

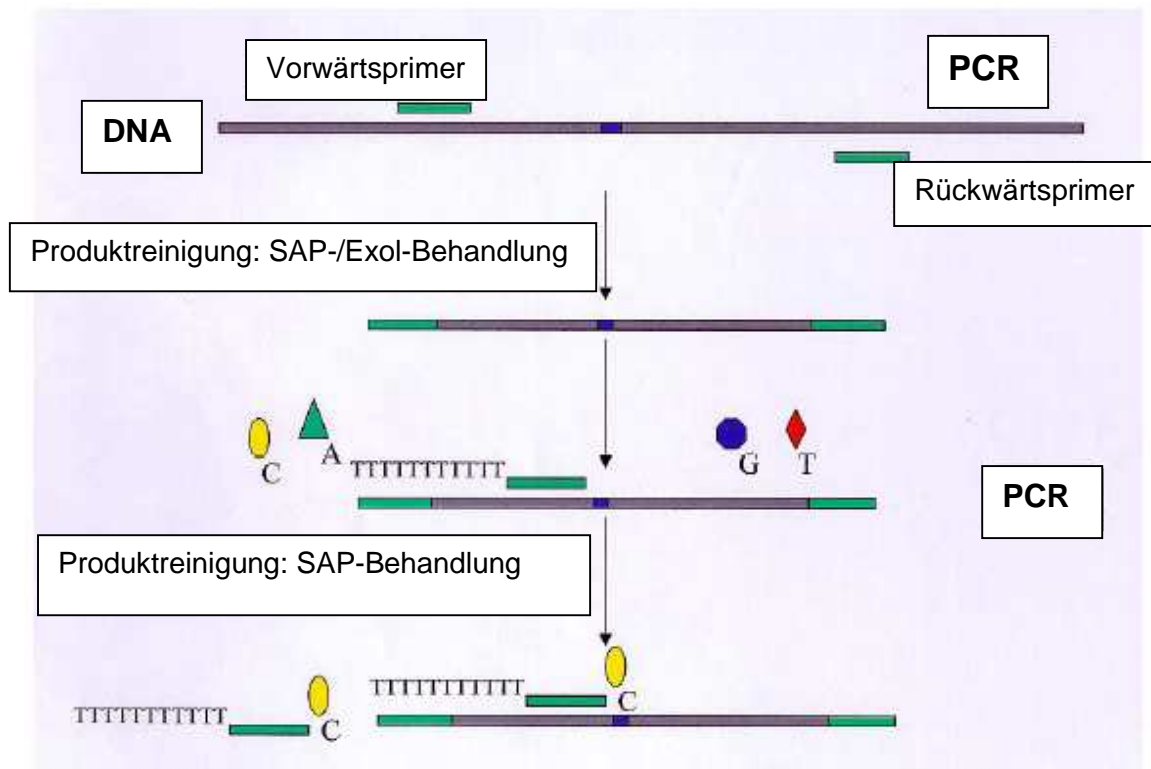


Abb. 16: Methode der SNaPshot-Sequenzierung (nach van Oers et al., 2005): Die drei Regionen des FGFR3-Gens, die Punktmutationen enthalten können, werden in der ersten PCR-Reaktion amplifiziert. Nach der Behandlung mit SAP und Exol werden die PCR-Produkte mit den SNaPshot-Primern inkubiert und ein ddNTP wird während der zweiten PCR an der potentiellen Punktmutation in den DNA-Strang eingebaut. Alle ddNTPs sind unterschiedlich gekennzeichnet, was durch einen Laserstrahl detektiert und in ein Signal transformiert werden kann.

Für alle drei Regionen wurde erfolgreich eine Mehrfach-Reaktion angesetzt. Die Mehrfach-PCR wurde in ein Volumen von 15 μ L gegeben, die Folgendes enthielt:

1 x PCR-Puffer, 1,5 mmol/L $MgCl_2$, 0,5 Einheiten Taq-Polymerase, 0,17 mmol/L Desoxynukleotid-Triphosphat, 10 pmol der Exon 7- und Exon 15-Primer, 7,5 pmol des Exon 10-Primers, 5% Glycerol und 1 bis 250 ng genomischer DNA. Die PCR-Bedingungen waren: 5 min bei 95°C, 35 Zyklen bei 95°C für 45 s, 60°C für 45 s und 72°C für 45 min, gefolgt von 10 min bei 72°C. Dabei wurden die Produkte mit Exonuklease I und Krabben-alkalischer Phosphatase behandelt, um die überschüssigen Primer und Desoxynukleotid-Triphosphate zu entfernen.

Als Nächstes konnte nun die eigentliche FGFR3-Mutationsanalyse erfolgen: Dazu wurde der ABI PRISM SNaPshot Multiplex Kit entsprechend den Anweisungen des Herstellers angewandt. Die SNaPshot-Methode basiert auf der Didesoxy-Einzelbasen-Erweiterung von unmarkierten Oligonukleotidprimern. Für jede einzelne der bekannten neun Mutationen wurde

ein Primer-Annealing entwickelt, die benachbart zu dem potentiell mutierten Nukleotid war. In den Mutationen K652E und K652Q ist das gleiche Nukleotid verändert, weshalb ein Primer ausreicht, um beide zu detektieren. Gleiches gilt für die Mutationen K652M und K652T. Insgesamt sind es also sieben Primer mit unterschiedlicher Länge der poly(dT)-Enden, die an das 5'-Ende angehängt sind, um ihre gleichzeitige Detektion zu ermöglichen. Alle Primer wurden so gestaltet, dass die Annealing-Temperaturen ähnlich waren. Außerdem wurden sie auf das Fehlen von Basen geprüft, die sich mit anderen SNaPshot-Primern paarweise aneinander legen. Die PCR-Bedingungen wurden optimiert, um eine Mehrfach-SNaPshot-Reaktion zu entwickeln. Ebenso wurden zwei neu entworfene Primer verwendet, die die Detektion der Mutationen von S249C und Y375 verbessern. Um die Detektion der häufigsten Mutation (S249C) zu erhöhen, wurden zwei unterschiedliche Längen von poly(dT)-Anhängen zugefügt. Die endgültigen SNaPshot-Primer sind in Tab. 7 im Kapitel 2.1.3.7 dargestellt. Die Mehrfach-SNaPshot-Reaktion wurde in ein Volumen von 10 µL gegeben, das sich wie folgt zusammensetzt: 2 µL der PCR-Produkte (s. o.), 2,5 µL Ready Reaction Mix, 1 x Sequenzierungspuffer und die SNaPshot-Primer in einer Konzentration, wie sie in Kapitel 2.1.3.7 angegeben ist. Die PCR-Bedingungen waren dabei 25 Zyklen mit schnellem Erhitzen auf 96°C, 96°C für 10 s, schnelles Abkühlen auf 58,5°C und darauf 40 s bei 58,5°C. Nach Behandlung mit Krabben-alkalischer Phosphatase, um die überschüssigen Didesoxynukleotid-Triphosphate zu entfernen, wurden die markierten Produkte in einem 25-minütigem Lauf auf einer 36 cm langen Kapillare in dem automatischen Sequenzierer ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) aufgetrennt. Für die Datenanalyse wurde die Software von GeneScan Analysis Version 3.7 (Applied Biosystems) benützt.

2.2.9 Immunhistochemische Färbungen

Die Immunhistochemie nutzt die Spezifität und Affinität immunologischer Reaktionen zur präzisen Lokalisation von Epitopen gesuchter Antigene, also die Eigenschaft, dass Antikörper spezifisch und mit hoher Affinität an ihr passendes Antigen binden. Man kann die nicht bindende Seite der Antikörper wiederum als Bindungsstelle für einen weiteren Antikörper nutzen, der mit Substanzen konjugiert ist, die man zur Detektion verwenden kann. Es gibt eine Reihe von Verfahren, die sich hinsichtlich der Detektionsreagenzien oder der Anzahl der Detektionsschritte (direkte und indirekte Methode) unterscheiden. In dieser Arbeit kam aus

der Gruppe der Immunperoxidase-Färbungen die Avidin-Biotin-Methode an in Paraffin eingebettetem Material zum Einsatz:

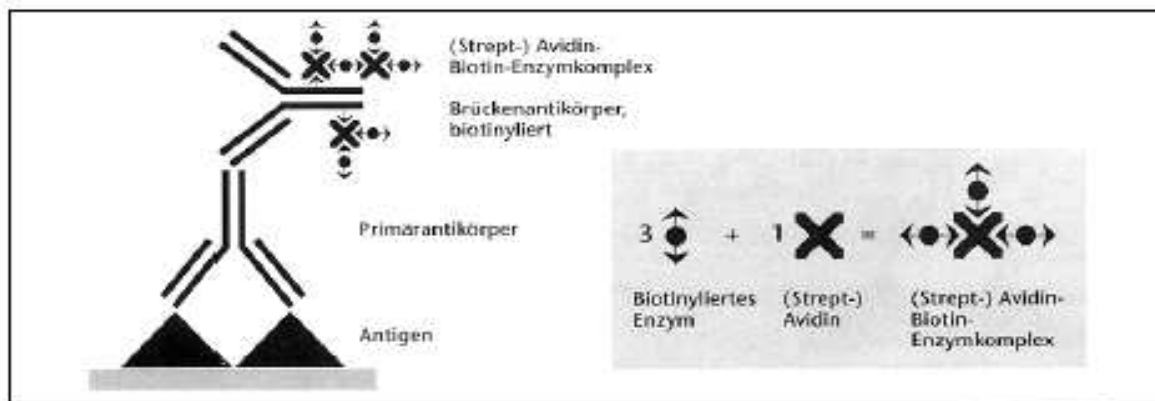


Abb. 17: Schema der ABC-Methode mit Darstellung von Primärantikörper, biotinyliertem Brückenantikörper und ABC-Komplex (aus: Noll et Schaub-Kuhnen, 2000)

Dabei ist jedoch zu erwähnen, dass oftmals die antigene Determinante, an die der Antikörper binden soll, blockiert ist. Dies geschieht durch den Einfluss des Formalins und Einflüsse der Entwässerung, Einparaffinierung und der Entparaffinierung. Bei Blockierung entstehen falsch negative Ergebnisse und das Protein mit der entsprechenden Determinante wird nicht angefärbt und nachgewiesen. Aus diesem Grunde ist bei allen formalinfixierten und paraffin-eingebetteten Materialien eine Demaskierung, das so genannte „Antigen-Retrieval“ der Primärantikörper-Bindungsstellen notwendig.

Als Ausgangsmaterial für die immunhistochemische Analyse in dieser Arbeit wurden ebenso wie für die FISH-Analysen die Tissue-Micro-Array-Paraffinblöcke genutzt (s. o.).

2.2.9.1 Protokoll der immunhistochemischen Färbungen



Abb. 18: NexES® Immunhistochemie-Färbesystem (Ventana Medical Systems, Tucson, AZ, USA) (online im Internet: URL: <http://ventanamed.com> - Stand 30.10.2008)

Dabei wurde nach dem Protokoll der Laborroutine vorgegangen:

1. möglichst dünne Schnitte herstellen und auf SuperFrost-Objektträger (OT) aufbringen und beschriften
2. Schnitte entparaffinieren (Methode: siehe Kapitel 1.1.1)
3. OT in Glasküvette stellen und den Alkohol mit VE-Wasser auswaschen
4. OT in grüne Küvetten stellen und mit Zitratpuffer bis zur Markierung auffüllen
5. Deckel nur leicht schließen und bei 250 Watt in der Mikrowelle kochen, Antigen-Retrieval/Demaskierung; die Zeit richtet sich je nach Antikörper: 32 min für p53 und MIB-1, 24 min für CK20
6. OT in Zitratpuffer über Nacht abkühlen lassen
7. OT in Glasküvette mit VE-Wasser spülen, um den Zitratpuffer auszuspülen

Danach wurden alle Antikörper in Aqua dest. gestellt und in eine Färbemaschine (Ventana NexES[®]) gelegt. Darauf wurden die Gewebsschnitte mit PBS beschichtet, und das Färbekarussell, das die Reagenzien auf die OT aufträgt, wurde aufgesetzt. Gewaschen wurde mit dem Waschpuffer APK Wash Solution. Das Reagens Coverslip ist ein reaktionsunfähiges, leichtes Beschichtungsgöl, das ein Austrocknen der Gewebsschnitte verhindert.

Die automatische Färbemaschine Ventana NexES[®] benützt dabei dieses Protokoll:

1. Waschpuffer APK Wash Solution auf 41°C aufwärmen
2. OT-Kammer auf 37°C aufwärmen
3. OT waschen, OT-Volumen anpassen, Coverslip auf OT auftragen
4. 1 Tropfen Inhibitor auftragen, 4 min inkubieren
5. OT waschen, OT-Volumen anpassen, Coverslip auf OT auftragen
6. 1 Tropfen des jeweiligen Antikörpers auftragen und für 32 min (p53, MIB-1) bzw. 24 min (CK20) inkubieren
7. OT waschen, OT-Volumen anpassen, Coverslip auf OT auftragen
8. 1 Tropfen biotinyliertes Ig auftragen und 8 min inkubieren
9. OT waschen, OT-Volumen anpassen, Coverslip auf OT auftragen
10. 1 Tropfen Avidin-HRPO auftragen und 8 min inkubieren
11. OT waschen, OT-Volumen anpassen, Coverslip auf OT auftragen
12. 1 Tropfen DAB und 1 Tropfen DAB H₂O₂ auftragen und 8 min inkubieren
13. OT waschen, OT-Volumen anpassen, Coverslip auf OT auftragen
14. 1 Tropfen Copper auftragen und 4 min inkubieren

15. OT waschen, OT-Volumen anpassen, Coverslip auf OT auftragen
16. 1 Tropfen Hämatoxylin für die Gegenfärbung auftragen und für 4 min inkubieren
17. OT waschen

Diese Maschine wird in der täglichen Routine in der Immunhistochemie eingesetzt. Sie wird über Computer und einen Barcode gesteuert, der auf die OT aufgeklebt wird. Die für die Färbungen nötigen Reagenzien (Antikörper, Lösungen, Puffer) werden automatisch auf die Gewebeschnitte aufgebracht. Die Dauer der Einwirkzeit kann dabei über den Computer festgelegt werden. Allerdings kann das Gerät auch geöffnet und der Antikörper manuell aufpipetiert werden.

Nach dem Lauf werden die OT wieder in mit Leitungswasser gefüllte Glasküvetten gestellt und gewaschen. Sie werden analog der HE-Färbung (s. Kapitel 2.2.3) durch die aufsteigende Alkoholreihe geführt und eingedeckelt.

2.2.9.2 Auswertungskriterien der immunhistochemischen Färbungen

Die gefärbten Gewebeproben wurden von Pathologen (A. H. und S. B.) mit einem Lichtmikroskop hinsichtlich Färbung und Expressionsmuster ausgewertet. Dabei wurde die Stärke der Anfärbung für jeden einzelnen Paraffinschnitt vermerkt. Die Ergebnisse wurden in Prozentangaben notiert. Falls ein normales Färbemuster vorlag, wurde NO notiert, NEG für 0% Färbung und „kein Mat.“ bei leeren Objektträgern, wenn beispielsweise Gewebe abgeschwemmt war. Anschließend wurden die Proben nach Umwandlung in dichotome Datensätze in die SPSS-Datei eingetragen:

Marker, Färbung	Kodierung: 0	Kodierung: 1
CK20: PR1	< 5%	≥ 5%
CK20: PR2	< 10%	≥ 10%
p53: D1	≤ 10%	> 10%
p53: D2	< 10%	≥ 10%
MIB-1: D10	≤ 10%	> 10%
MIB-1: D25	≤ 25%	> 25%

Tab. 14: Kodierung nach Cut-offs der immunhistochemischen Färbungen für SPSS

Als Cut-off-Point für die semiquantitative Auswertung wurde für p53 je > bzw. $\geq 10\%$ und für MIB-1 $>10\%$ und $>25\%$ definiert. 10% wird bei nicht-invasiven und 25% für invasive Karzinome verwendet. Da pT1-Tumoren zwar die Muskelschicht nicht infiltrieren, aber dennoch nach der neuen WHO-Klassifikation von 2004 ausdrücklich als invasiv bezeichnet werden, wurden hier beide Grenzen untersucht. Für Cytokeratin 20 (CK20) als sensitiven Marker für urotheliale Differenzierung wurde analog zu Harnden et al. (1999) die CK20-Färbung in normal (oberflächliches Färbemuster, keine Färbung in gesamter Urothelbreite) und abnormal (Färbung negativ, Färbung der gesamten Urothelbreite in $\geq 10\%$ des Tumors) unterteilt. Die Abbildungen 20, 21 und 22 im Kapitel 3.1.5 zeigen repräsentative CK20-, p53- und MIB-1-Färbungen.

2.2.10 Auswertung und Dokumentation der Daten

Für die EDV-technische Dokumentation und Auswertung der großen Datensätze wurde die Software Excel 2000 von Microsoft[®] verwendet. Mit diesem Programm wurden auch die Daten der Mikrosatellitenanalyse sowie die Roh-FISH-Daten zwischengespeichert, bevor sie endgültig nach Vervollständigung des Datensatzes mit dem Follow-up und der teilweise noch nötigen Umwandlung in dichotome Datensätze zusammen mit den anderen Markern für statistische Analysen in das leistungsfähigere Statistikprogramm SPSS 12.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) übertragen wurden.

2.2.11 Statistische Analysen

Diese wurden mit dem Statistical Package for the Social Sciences, Version 12.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) durchgeführt. Unterschiede wurden ab einem $p < 0,05$ als signifikant erachtet. Bei einfachen multiplen Testprozeduren wurden die p-Werte mit der Bonferroni-Holm-Methode (Ludbrook, 1998) berichtigt (Angleichung für multiple Vergleiche). Assoziationen zwischen gemessenen Parametern wurden mit dem χ^2 -Test und dem zweiseitigen Fisher-exakt-Test errechnet. Um die verschiedenen Variablen in Bezug auf das rezidivfreie Überleben und das tumorspezifische Überleben zu vergleichen, wurde die Kaplan-Meier-Produkt-Limit-Methode (Kaplan et Meier, 1958) angewandt. Die dazugehörigen Signifikanzen wurden durch eine zweiseitige Log-Rang-Statistik evaluiert. Für die Analyse des rezidivfreien Überlebens wurden als Bezugsgröße das Datum der Zystektomie oder der Termin der

letzten tumorfreien klinischen Untersuchung gewählt. Für die Überlebensanalysen wurde als Bezugsgröße der Termin der letzten klinischen Nachsorge-Untersuchung oder das Todesdatum (falls dieses nicht tumorbedingt war) gewählt.

Für die statistische Verarbeitung wurden die Daten wie folgt verschlüsselt:

Parameter	dichotome Umwandlung (Eigenschaft = dichotomer Wert)	
Grading	Grade 2 = 2	Grade 3 = 3
Geschlecht	männlich = 1	weiblich = 2
Alter bei Erstdiagnose	< 70 Jahre = 0	≥ 70 Jahre = 1
Begleit-CIS	kein CIS = 0	CIS = 1
Wachstumsmuster	papillär = 1	solide = 2
Multifokalität	unifokal = 0	multifokal = 1
CK20 PAT	normales Färbemuster = 0	abnormales Färbemuster = 1
CK20 PR1	< 5% = 0;	≥ 5% = 1
CK20 PR2:	<10% = 0	≥ 10% = 1
MIB-1, D10	negativ = 0	positiv = 1
MIB-1, D25	negativ = 0	positiv = 1
p53, D1	negativ = 0	positiv = 1
p53, D2	negativ = 0	positiv = 1
FGFR3-Mutation	Wildtyp = 0	Mutation = 1
TP53-Mutation	keine Mutation = 0	Mutation = 1
Polysomie	nicht polysom = 0	polysom = 1
p16-Deletion	keine Deletion von p16 = 0	relative Deletion von p16 = 1
LOH	kein LOH = 0	LOH = 1
MSI	keine MSI = 0	MSI = 1
Status des tumorspezifischen Gesamtüberlebens	Patient lebt oder unklarer/ nicht-tumorspezifischer Tod = 0,	tumorspezifischer Tod = 1
Status des rezidivfreien Überlebens	kein Rezidiv = 0	Rezidiv = 1

Tab. 15: Verschlüsselung der statistischen Daten zur weiteren Verarbeitung

2.2.12 Photodokumentation

Von den Silbergefärbungen wurden mit einer Digitalkamera der Firma Kyocera L4 (4 Megapixel) Bilder angefertigt, die Photodokumentation der FISH-Bilder wurde mithilfe des Kamerasystems AxioCam MRm (Carl Zeiss MicroImaging, Göttingen) ausgeführt.

3 Ergebnisse

3.1 Molekulare Marker und klassische/traditionelle Histopathologie

3.1.1 Ergebnisse der Mikrosatelliten-Analyse

Insgesamt wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit 76 Urothelkarzinome der Harnblase im Stadium pT1G2 oder G3 mittels Mikrosatellitenmarkern auf dem Chromosom 8(p) analysiert. Dabei wurden 7 Marker getestet, wovon vier davon interpretierbare Ergebnisse lieferten (D8S1817, D8S1145, D8S587, D8S591). Die Marker D8S1706, D8S1469 und D8S526 lieferten keine interpretierbaren Ergebnisse.

Variable	Kategorisierung	Patienten		Ausfälle	
		n	%	n/76	%
LOH-Status	positiv	14	19,7	5/76	6,6
	negativ	57	80,3		
MSI-Status	positiv	7	10,0		
	negativ	63	90,0		

Tab. 16: Verteilung der Ergebnisse der Mikrosatellitenmarkeranalyse

Insgesamt konnten bei 93,4% der Tumoren (71/76) Alleldeletionen untersucht werden. 14 der interpretierbaren 71 Tumoren (19,7%) zeigten dabei in mindestens einem der Marker Heterozygotie, 2 in genau zwei der vier Marker (2,8%). Ein allelischer Verlust auf dem Chromosom 8p konnte bei 12 Tumoren (16,9%) jeweils bei genau einem der Marker nachgewiesen werden, ein Zugewinn (MSI) bei genau einem Marker bei 6 Fällen (8,5%), wobei in 3 Fällen davon gleichzeitig der allelische Verlust in einem anderen Marker vorlag (4,2%).

Zwei der untersuchten Tumoren zeigte in zwei Markern einen LOH (Patienten Nr. 38 und 54), bei einem Patienten (Nr. 3) eine MSI bei zwei Markern (1,4%). Der Anteil bei den Markern mit Banden in der Silbergefärbung, die keine Information über den Allelstatus lieferten, also nicht informativ (NI) oder nicht amplifizierbar (NA) waren, ist in Tab. 17 darstellt:

Primer	Lokalisation	informativ	nicht informativ	nicht amplifizierbar
D8S591	8q11.21–11.23	44/71 (62,0%)	21/71 (29,6%)	6/71 (8,4%)
D8S1817	8p11.2	36/71 (50,7%)	18/71 (25,4%)	17/71 (23,9%)
D8S587	8q11.1-11.21	36/71 (50,7%)	20/71 (28,2%)	15/71 (21,1%)
D8S1145	8p22	42/71 (59,2%)	4/71 (5,6%)	25/71 (35,2%)

Tab. 17: Informativität der bei allen Proben verwendeten vier Oligonukleotidprimer

Bei allen interpretierbaren Markern war jeweils mehr als die Hälfte informativ, 5,6% bis ansonsten knapp ein Drittel waren nicht informativ und zwischen 8,4 und 35,2% nicht anwendbar. Am informativsten war der Marker D8S591, am wenigsten informativ D8S587. Am häufigsten musste beim Marker D8S1145 „nicht anwendbar“ notiert werden.

In einzelnen Fällen zeigte sich bei der ersten Durchführung der PCR ein Verlust einer Allelbande (LOH) oder der Zugewinn einer Allelbande (MSI), was sich bei der Verifizierung in einer unabhängigen PCR-Reaktion nicht bestätigen ließ. Gründe dafür sind in Kapitel 4.1 beschrieben.

Variable	Kategorisierung	LOH			MSI		
		ja	nein	p ^a	ja	nein	p ^a
Histolog. Grade	G2	4	17	1,000	1	20	0,666
	G3	10	40		6	43	
Begleit-CIS	ja	3	12	1,000	0	15	0,333
	nein	11	44		7	48	
Multifokalität	unifokal	6	18	0,542	2	22	1,000
	multifokal	8	36		4	39	
Wachstumsmuster	papillär	12	50	1,000	7	54	0,583
	solide	2	7		0	9	

^a Fisher exact Test (zweiseitig), fettgedruckte kursive Werte sind p-Werte <0,05

Tab. 18: Vergleich der Mikrosatellitenanalyse auf dem Chromosom 8(p) mit traditionellen pathologischen Parametern

Es fand sich kein statistisch signifikanter Zusammenhang. Auch für die getrennte Berechnung für MSI-high- und MSI-low-Tumoren bzw. Tumoren mit einem respektive zwei LOHs ergaben sich keine signifikanten Werte. Ebenso wenig waren LOHs oder MSIs eines einzelnen der vier interpretierbaren Marker bis auf eine Ausnahme mit der Histopathologie korreliert. Wenn

man jedoch die Angleichung für multiple Vergleiche anwendet (Ludbrook, 1998), wird auch das $p = 0,040$ für D8S587 und Multifokalität durch diese Berücksichtigung nicht mehr signifikant.

3.1.2 Ergebnisse der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung

Hierbei wurden insgesamt 76 Tumorstanzen mit Hilfe von Tissue-Micro-Arrays ausgewertet. Davon enthielten 26 keine oder weniger als die vorgeschriebene Zellkernzahl von mindestens 30, weshalb diese nicht ausgewertet wurden. Eine Stanze enthielt nur Normalgewebe, die restlichen 49 mit mehr als 50 Nuklei pro Stanze konnten somit ausgewertet werden.

Dabei waren 40 (81,6%) bezüglich Polysomie FISH-positiv, bezüglich p16-Deletion waren es 34 (69,4%).

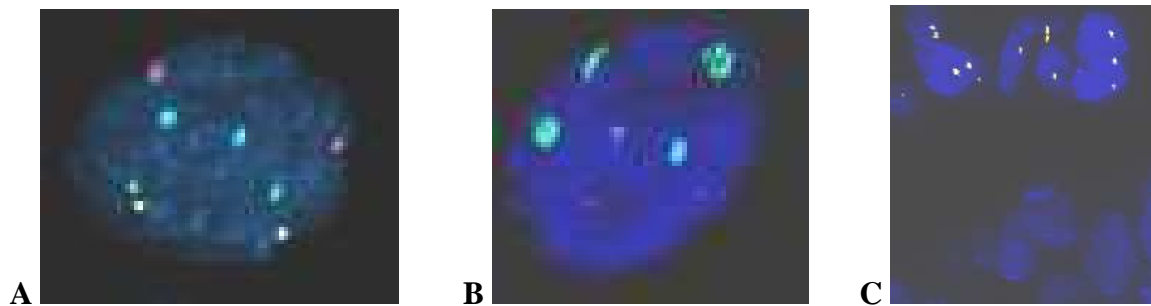


Abb. 19: Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) für die Beurteilung der Aberration der Chromosomen 3 (rot), 7 (grün) und 17 (aqua) sowie für die Detektion von p16 auf Locus 9p21 (gold) mittels des vier Zentromer-sonden enthaltenden UroVysion Kits (Abbott Laboratories).

Repräsentative Beispiele:

- (A) isolierter euploider Nukleus mit je genau 2 Signalen
- (B) aneuploider Nukleus mit Polysomie des Chromosom 7 (grün) und p16-Deletion
- (C) p16-Deletion der Tumornuklei der unteren Bildhälfte (in der oberen Hälfte war nach Vergleich mit dem HE-Schnitt Normalgewebe), Aufnahme hierfür mit dem Gold-Filter allein

Es korrelierte keiner der histopathologischen Marker mit den Ergebnissen aus der FISH-Analyse außer p16 mit dem Grading. Bei G2-Tumoren war p16 signifikant seltener deletiert als bei G3-Tumoren (8/17 vs. 26/32, $p = 0,022$):

Variable	Kategori- sierung	Polysomie			p16-Deletion		
		ja	nein	p ^a	ja	nein	p ^a
histolog. Grade	G2	13	4	0,700	8	9	0,022
	G3	27	5		26	6	
Begleit-CIS	ja	6	1	1,000	5	2	1,000
	nein	33	8		28	13	
Multifo- kalität	unifokal	17	2	0,270	11	8	0,104
	multifokal	20	7		22	5	
Wachstums- muster	papillär	38	9	1,000	32	15	1,000
	solide	2	0		2	0	

^a Fisher exact Test (zweiseitig), fettgedruckte kursive Werte sind p-Werte <0,05

Tab. 19: Vergleich der FISH-Ergebnisse mit traditionellen pathologischen Parametern

3.1.3 Ergebnisse der TP53-Sequenzierung auf den Exons 5 bis 8

Bei 71 der insgesamt 76 Patienten konnten die Exons 5 bis 8 des TP53-Gens erfolgreich sequenziert werden. Dabei lieferte in 5 Fällen die Sequenzierung eines Exons (1x in Exon 6, 2x jeweils in Exon 7 und 8) kein Ergebnis (nicht auswertbar, na), bei 11 der 71 auswertbaren Tumoren (14,1%) konnte eine TP53-Alteration festgestellt werden: 10 Tumoren mit Punktmutation(en) und einer mit Leserasterverschiebung. Insgesamt wurden bei 10 Tumoren 11 Punktmutationen gefunden. Keine dieser Mutationen war eine sogenannte stumme Mutation (d. h. das mutierte Codon kodierte für die gleiche Aminosäure wie die zugehörige Wildtypsequenz und bewirkte damit keine funktionell wirksamen Veränderungen). Um Polymerasefehler auszuschließen, wurden sämtliche Mutationen mit einer zweiten nested-PCR mit nachfolgender Sequenzreaktion verifiziert. 16 Mutationen konnten bei der Wiederholung nicht bestätigt werden: 11 auf Exon 5, vier auf Exon 7 und eine auf Exon 8. Die zugehörige p53-Immunhistochemie ($\geq 10\%$) war dabei in acht Fällen positiv, in vieren negativ und bei vieren lag keine Information über die immunhistochemische Färbung von p53 vor. Bei den verifizierten Punktmutationen wiesen erwartungsgemäß die drei, die zu einem Stopp-Codon führten, alle eine negative p53-Immunhistochemie auf. Bei den anderen sieben, bei denen Aminosäuren ausgetauscht waren, zeigten sechs eine p53-Akkumulation durch eine positive p53-IHC, bei einem Tumor war die p53-IHC nicht erfolgreich. Der Tumor mit Leserasterverschiebung war

bezüglich der p53-Immunhistochemie negativ. Beispiele für Mutationen sind in Kapitel 2.2.7.6 in den Chromatogrammen Abb. 14 und 15 dargestellt.

Bei 11 Tumoren waren 12-mal kleinere Abschnitte in einem Exon nicht kontrollierbar, in einem Fall also auf zwei Exons. In diesen zwischen 3 und 52 Basenpaaren langen Abschnitten könnten sich ebenfalls Mutationen verbergen.

Bei den bestätigten 12 TP53-Sequenzveränderungen handelt es sich um eine Leserasterverschiebung (Tumor Nr. 72: Deletion GGG AGC AC, Aminosäuren 302 bis 304 auf Exon 8) und folgende 11 Punktmutationen bei 10 Tumoren:

Tumor Nr.	Mutation (Art)	Triplet	Aminosäuren	Exon	Codon
2	C → T (TS)	CGG → TGG	Arg → Trp	7	248
10	C → A (TV)	TGC → TGA	Cys → Stop	5	141
18	G → A (TS)	GGA → GAA	Gly → Glu	8	266
25	C → T (TS)	GCC → GTC	Ala → Val	5	194
32	C → T (TS)	CTT → TTT	Leu → Phe	6	159
38	1. G → A (TS)	1. GCC → ACC	1. Ala → Thr	5	1. 161
	2. G → C (TV)	2. CGC → CCC	2. Arg → Pro	5	2. 181
44	C → G (TV)	TCC → TGC	Ser → Cys	7	241
54	C → G (TV)	TCA → TGA	Ser → Stop	5	183
63	G → A (TV)	CGC → CAC	Arg → His	5	175
73	C → T (TS)	CGA → TGA	Arg → Stop	6	213

Tab. 20: Tumoren mit bestätigten TP53-Mutationen; Legende: TV = Transversion; TS = Transition

Transversion und Transition waren ungefähr gleich häufig (5 bzw. 6 mal), wobei die Mutationen wie folgt verteilt waren: C → T (4x), G → A (3x), G → A (3x), C → G (1x). Am häufigsten wurden die Aminosäuren Arginin (4x), Alanin (2x) und Serin (2x) ausgetauscht. Die Mutationen befanden sich innerhalb der Codons 141 bis 266, wobei kein Codon gehäuft auftrat. Am häufigsten fanden sich Punktmutationen im Exon 5 (6/11; 55%) gefolgt von Exon 6 und 7 (je 2/11; 18%) und Exon 6 (1/11, 9%). Die einzige Leserasterverschiebung war auf Exon 8. Dabei wurden in 4 Fällen Aminosäuren durch solche mit ähnlichen chemischen Eigenschaften ausgetauscht, in 4 Tumoren solche mit unähnlichen. Erstere hatten hierbei wahrscheinlich weniger Auswirkungen auf die Proteinstruktur von TP53, während letztere eher die Faltung des Proteins beeinflussten. Falls sich ein Stopp-Codon ergab, führte das zu einem Abbruch der Proteinsynthese.

Variable	Kategori- sierung	TP53-Mutation			p53-Kombi (>10%)			p53-Kombi (≥10%)		
		ja	nein	p ^a	ja	nein	p ^a	ja	nein	p ^a
Histolog. Grade	G2	1	20	0,156	6	15	0,072	7	14	0,070
	G3	10	40		27	24		30	21	
Begleit-CIS	ja	2	13	1,000	10	5	0,090	11	4	0,084
	nein	9	46		23	33		26	30	
Multifo- kalität	unifokal	2	22	0,476	8	15	0,307	9	23	0,208
	multifokal	7	37		23	23		26	46	
Wachstums- muster	papillär	10	52	1,000	26	36	0,170	29	33	0,086
	solide	1	8		7	3		8	2	

^a Fisher exact Test (zweiseitig), fettgedruckte kursive Werte sind p-Werte <0,05

Tab. 21: Vergleich der TP53-Sequenzierung der Exons 5 bis 8 mit traditionellen pathologischen Parametern;
Legende: p53-Kombi: entweder p53-Mutation auf den Exons 5 bis 8 *oder* positive p53-Immunhistochemie (>10% bzw. ≥10%)

Beim Vergleich mit den klassischen histopathologischen Parametern fiel auf, dass die Kombination aus TP53-Sequenzierung und p53-Immunhistochemie der alleinigen Sequenzierung überlegen ist. Hierbei ist egal, ob >10% oder ≥10% als Grenze gewählt wird (≥10% liefert etwas bessere Ergebnisse). Dabei erreichte der Vergleich von Grading bzw. Begleit-CIS mit der Kombination (p53-IHC ≥10% oder Mutation) jeweils annähernd signifikante Werte ($p = 0,070$ bzw. $p = 0,086$): Während bei G2-Tumoren nur 33% einen pathologischen Wert bezüglich p53 aufwiesen, waren es bei den G3-Tumoren fast doppelt so viele (59%). 73% der Tumoren mit Begleit-CIS zeigten ein pathologisches p53, aber nur 46% der Tumoren ohne Begleit-CIS. p53-Veränderungen scheinen somit häufiger bei G3-Tumoren oder bei Tumoren mit Begleit-CIS aufzutreten. Dabei ist außerdem anzumerken, dass Grading und CIS stark miteinander assoziiert sind ($p = 0,002$): Alle 17 Tumoren mit Begleit-CIS waren G3, von denjenigen ohne Begleit-CIS waren 22 G2 und 36 G3.

Bei der Korrelation von Mutationen auf den einzelnen Exons mit der Histopathologie konnte ebenso wenig wie insgesamt mit den vier Exons ein statistisch signifikanter Wert erreicht werden, wobei hier die geringe Zahl für die Berechnung berücksichtigt werden muss.

3.1.4 Ergebnisse der FGFR3-SNaPshot-Sequenzierung

Mutation	absolute Anzahl an Mutationen	prozentuale Verteilung
S249C	17/28	60,7%
R248C	5/28	17,9%
G372C	4/28	14,3%
Y375C	2/28	7,1%
A393E	0/28	0%
K652Q/E	0/28	0%
K652M/T	0/28	0%

Tab. 22: prozentuale Verteilung der FGFR3-Mutationen

	R248C	S249C	G372C	Y375C	A393E	K652Q/E	K652M/T
Exon/ Codon	7/742	7/746	10/1114	10/1124	10/1178	15/1954	15/1955
Muta- tion	C→T	C→G	G→T	A→G	C→A	A→G	A→T bzw. A→C
Triplet	CGC→ TGC	TCC→ TGC	GGC→ TGC	TAT→ TGT		AAG→G AG	AAG→ ATG AAG→ ACG
Amino- säure	Arg→ Cys	Ser→ Cys	Gly→ Cys	Tyr→ Cys		Lys→ Glu	Lys→ Thr Lys→ Met
Typ	Transi- tion	Trans- version	Trans- version	Transi- tion		Transi- tion	Trans- version

Tab. 23: FGFR3-Mutationen

Bei 68 der 76 untersuchten Harnblasentumoren (89,5%) gelang die Sequenzierung. Dabei konnten in 3 Regionen des FGFR3-Gens folgende Mutationen detektiert werden:

R248C und S249C in der Region I (Exon 7, zwischen der zweiten und dritten immunglobulin-ähnlichen Domäne) sowie G372C und Y375C in der Region II (Exon 10, nahe der Transmembrandomäne). Die ebenfalls möglichen Mutationen A393E in der Region II sowie K652Q/E und K652M/T in der Region III (Exon 15, im zweiten Teil der Kinasedomäne) waren bei den 68 erfolgreich untersuchten Tumoren nicht vertreten.

Von den 68 Tumoren zeigten 27 (39,7%) eine FGFR3-Mutation, die restlichen 41 zeigten den Wildtyp. Einer der 27 mutierten Tumoren zeigte zwei Mutationen (S249C und G372C), was zu einer absoluten Anzahl von 28 Mutationen führt. Obige Tab. 22 stellt die Häufigkeitsverteilung der unterschiedlichen Mutationen dar.

Die Mutation S249C war dabei mit über 60% am häufigsten, mit deutlichem Abstand gefolgt von R248C und G372C (17,9% bzw. 14,3%) und dahinter Y375C (7,1%). Die restlichen drei Mutationen waren nicht vertreten.

Variable	Kategorisierung	FGFR3-Mutation		
		wt	mut	p ^a
histologisches Grading	G2	8	12	<i>0,033</i>
	G3	33	15	
Begleit-CIS	ja	12	2	<i>0,033</i>
	nein	28	25	
Multifokalität	unifokal	9	13	<i>0,034</i>
	multifokal	30	13	
Wachstumsmuster	papillär	33	17	<i>0,018</i>
	solide	8	0	

^aFisher exact Test (zweiseitig), fettgedruckte kursive Werte sind p-Werte <0,05

Tab. 24: Vergleich der FGFR3-Mutationsanalyse mit traditionellen pathologischen Parametern;

Legende: wt = wildtyp, mut = mutiert

Der FGFR3-Status korrelierte signifikant mit allen untersuchten histopathologischen Markern. Dabei waren FGFR3-Mutationen signifikant häufiger in G2-Tumoren (12/20 vs. 15/49 bei G3-Tumoren), bei Tumoren ohne Begleit-CIS (25/53 vs. 2/14 mit Begleit-CIS) und in unifokalen Tumoren (13/22 vs. 13/43 bei den multifokalen Tumoren). Ein solides Wachstumsmuster schloss eine FGFR3-Mutation gänzlich aus (0/8), während 17 der 50 papillären Tumoren eine FGFR3-Mutation aufwiesen.

Damit waren FGFR3-Mutationen insgesamt signifikant häufiger in Tumoren mit histopathologischen Eigenschaften vertreten, die mit einem niedrigeren Risiko assoziiert sind (G2, kein Begleit-CIS, unifokal, papilläres Wachstumsmuster).

3.1.5 Ergebnisse der Immunhistochemie (CK20, p53, MIB-1)

Von der Gesamtzahl von 76 Patienten, deren Harnblasenkarzinome immunhistochemisch auf die Expression der Marker CK20, p53 und MIB-1 untersucht wurden, konnte bei nur drei Tumoren keine Färbung ein auswertbares Ergebnis liefern.

Im normalen Urothel ergibt sich für die meisten immunhistochemischen Marker ein spezifisches Muster, das im transformierten und dysplastischen Urothel deutlich in Intensität und Verteilung abweicht.

Um die Auswertung der Immunhistochemie-Daten übersichtlicher zu gestalten, wurden die Ergebnisse in bestimmte Gruppen aufgeteilt.

Die Expression von CK20 wurde in zwei verschiedene Kategorien klassifiziert: In der einen Gruppe waren die Tumoren mit normalem Expressionsmuster (nur die „umbrella cells“ gefärbt = normal: NO), in der anderen waren die Tumoren mit abnormalem Muster oder mit fehlender Expression (= negativ: NEG bzw. dedifferenziert). Da nur zwei Tumoren (Nr. 68 und Nr. 76) ein normales Expressionsmuster aufwiesen, wurden neben NEG bei den Tumoren mit auffälligem Expressionsmuster zwei Grenzen festgelegt, nämlich $\geq 5\%$ bzw. $\geq 10\%$.

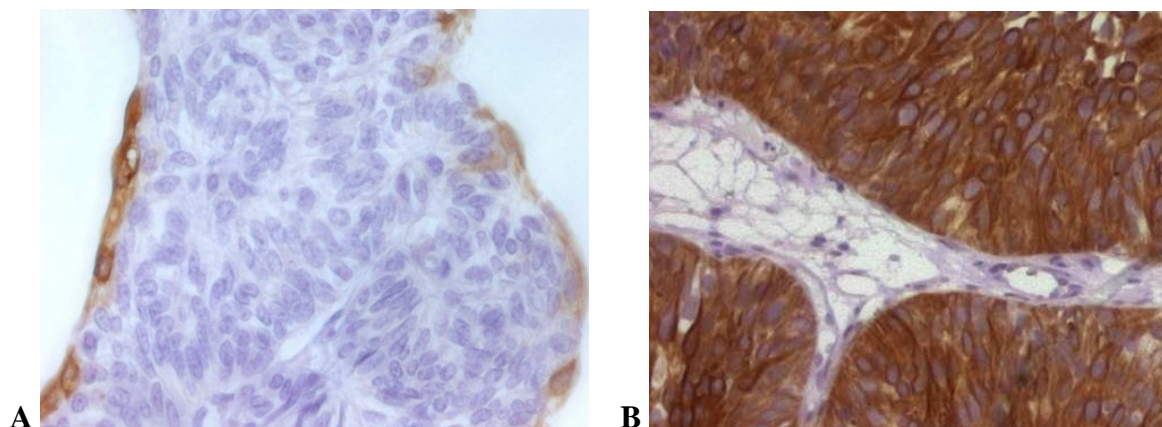


Abb. 20: Immunhistochemische Färbung von CK20:

- (A) normales CK20-Expressionsmuster, bei dem sich nur die oberflächlichen Urothelzellen positiv anfärben
- (B) abnormales CK20-Färbemuster, hier dargestellt durch eine CK20-Expression in allen Zellschichten

Die Expression mit p53 wurde je ab $>10\%$ bzw. $\geq 10\%$ als positiv bewertet, der Rest ($\leq 10\%$ bzw. $<10\%$) oder fehlende Expression als negativ (NEG).

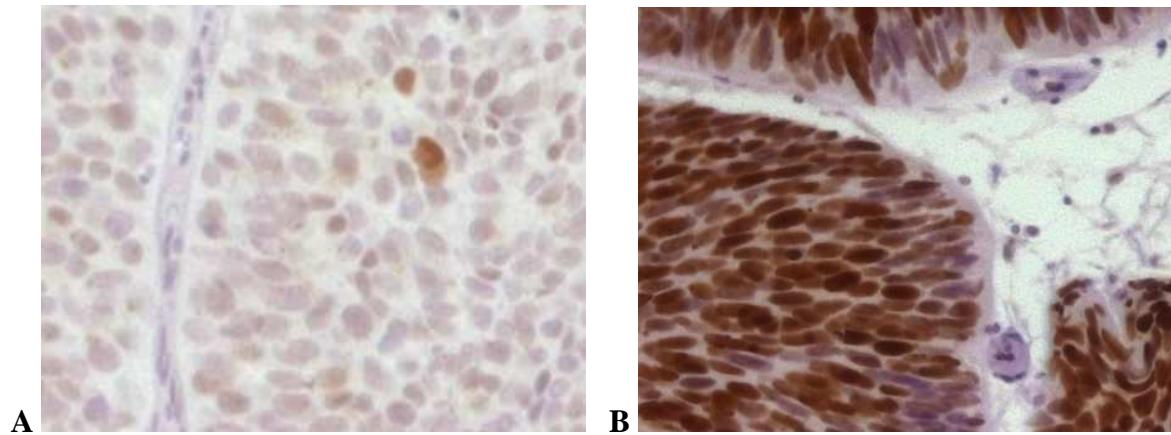


Abb. 21: Immunhistochemische Färbung von p53:

- (A) niedrige Expression von p53 ($<10\%$), nur vereinzelt sind Zellen positiv gefärbt
- (B) hohe Expression von p53 ($\geq 10\%$), disseminiert häufig positiv gefärbte Zellen

Der Marker MIB-1 wurde in jeweils zwei Gruppen aufgeteilt: $\geq 25\%$ bzw. $\geq 10\%$ wurde als pathologisch angesehen, $<25\%$ bzw. $<10\%$ als apathologisch. Dabei erwies sich die 25%-Grenze als aussagekräftiger in Bezug auf die Korrelationen und das klinische Outcome.

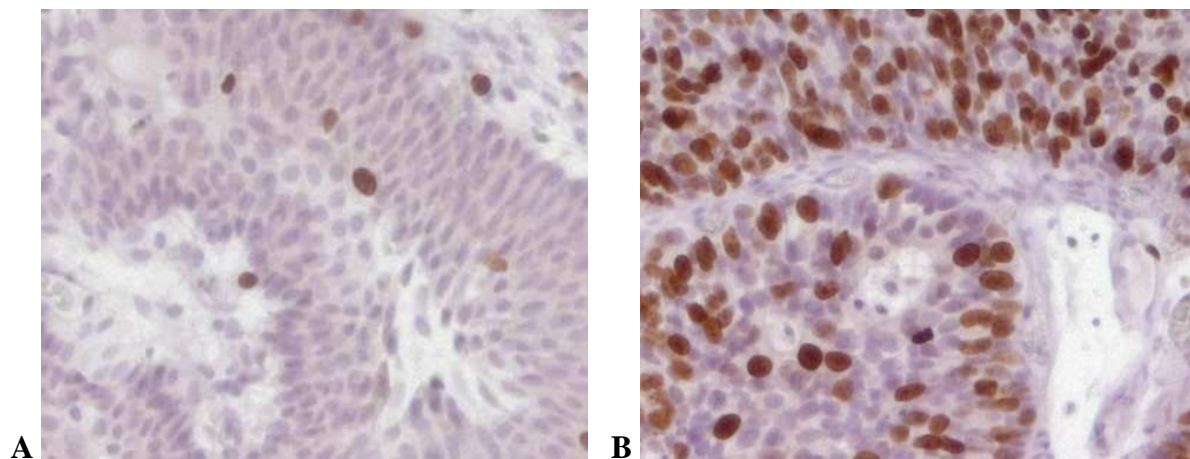


Abb. 22: Immunhistochemische Färbung von MIB-1:

- (A) niedrige Expression von MIB-1 ($\leq 25\%$), nur vereinzelt sind Zellen positiv gefärbt
- (B) hohe Expression von MIB-1 ($>25\%$), disseminiert häufig positiv gefärbte Zellen

Variable	Kategorisierung	Tumoren		Ausfälle	
		n	%	n/76	%
CK20 IHC	normal	2	3,1	11/76	14,5
	abnormal	63	96,9		
p53-IHC	≤ 10%	43	60,6	5/76	6,6
	> 10%	28	39,4		
	<10%	39	54,9		
	≥ 10%	32	45,1		
MIB-1 IHC	≤ 25%	40	58,0	7/76	9,2
	> 25%	29	42,0		
	≤ 10%	25	36,2		
	> 10%	44	63,8		

Tab. 25: Ergebnisse der immunhistochemischen Färbungen mit Ausfallquoten

Dabei lassen sich die unterschiedlichen Ausfallquoten vor allem durch zu wenig oder gar kein Material, aber auch mit altem und/oder in der Qualität schlechtem Gewebe erklären. Die CK20-Färbung schien bei unseren Färbungen am anfälligsten gewesen zu sein.

Die Auswertung der Ergebnisse zeigt, dass fast alle Urothelkarzinome (63/65 = 96,9%) im Stadium pT1 ein abnormales, also dedifferenziertes CK20-Färbemuster aufweisen. Dabei waren die beiden einzigen Tumoren mit normalem Färbemuster ein G2 und ein G3, jeweils papillär, unifokal, kein Begleit-CIS, kein LOH oder MSI. Molekulargenetisch wiesen beide eine FGFR3-Mutation, eine p16-Deletion und keine p53-Veränderung auf. Allerdings war nur der G2-Tumor polysom und wies im Gegensatz zum G3-Tumor keine MIB-1-Überexpression auf (10% vs. 30%).

Die Ergebnisse aus den Färbungen der Immunhistochemie sind in Tab. 26 dargestellt:

Tumor Nr.	CK20	p53	MIB-1	Tumor Nr.	CK20	p53	MIB-1
1	50	10	10	39	60	40	20
2	90	45	20	40	20	NEG	10
3	90	NEG	40	41	60	NEG	10
4	80	90	25	42	kein Mat.	NEG	10
5	80	90	50	43	90	10	10
6	NEG	NEG	15	44	70	90	40
7	10	10	10	45	90	80	kein Mat.

Tumor Nr.	CK20	p53	MIB-1	Tumor Nr.	CK20	p53	MIB-1
8	50	50	10	46	90	20	10
9	kein Mat.	kein Mat.	kein Mat.	47	NEG	60	60
10	25	NEG	50	48	kein Mat.	70	30
11	90	NEG	10	49	20	20	30
12	45	NEG	25	50	10	NEG	30
13	NEG	NEG	20	51	60	60	20
14	80	NEG	40	52	NEG	40	5
15	50	NEG	20	53	20	kein Mat.	kein Mat.
16	kein Mat.	kein Mat.	kein Mat.	54	50	NEG	70
17	80	80	40	55	kein Mat.	NEG	kein Mat.
18	30	20	40	56	kein Mat.	NEG	10
19	55	90	15	57	20	NEG	30
20	15	NEG	3	58	90	NEG	40
21	80	5	10	59	65	5	25
22	90	NEG	20	60	60	NEG	5
23	kein Mat.	kein Mat.	kein Mat.	61	kein Mat.	NEG	kein Mat.
24	20	NEG	30	62	NEG	NEG	10
25	90	65	30	63	90	NEG	40
26	10	50	40	64	90	NEG	10
27	80	NEG	40	65	NEG	NEG	5
28	50	20	10	66	NEG	NEG	20
29	90	70	40	67	kein Mat.	NEG	40
30	65	35	40	68	NO	NEG	30
31	75	NEG	10	69	NEG	70	30
32	50	50	10	70	20	NEG	10
33	70	NEG	3	71	kein Mat.	NEG	10
34	NEG	50	30	72	25	NEG	50
35	50	90	30	73	kein Mat.	kein Mat.	15
36	80	NEG	20	74	90	50	10
37	90	10	15	75	80	70	50
38	70	70	60	76	NO	NEG	10

Tab. 26.: Ergebnisse der immunhistochemischen Färbungen;

Legende: Zahlenangaben in den drei IHC-Spalten in Prozent (%). CK20: NO = normale Expression; NEG = negativ; Mat. = Material.

Variable	Kategori- sierung	CK20			MIB-1			MIB-1		
		norm.	abnorm.	p ^a	≤25%	>25%	p ^a	≤10%	>10%	p ^a
Histolog. Grade	G2	1	18	0,502	18	2	<0,001	12	8	0,013
	G3	1	45		22	27		13	36	
Begleit-CIS	ja	0	13	1,000	5	10	0,042	4	11	0,547
	nein	2	49		34	19		20	33	
Multifo- kalität	unifokal	2	17	0,088	11	10	0,601	8	13	1,000
	multifokal	0	44		27	18		16	29	
Wachstums- muster	papillär	2	54	1,000	38	21	0,014	23	36	0,308
	solide	0	9		2	8		2	8	

Variable	Kategori- sierung	p53			p53		
		≤10%	>10%	p ^a	<10%	≥10%	p ^a
Histolog. Grade	G2	15	5	0,177	14	6	0,123
	G3	28	23		25	26	
Begleit-CIS	ja	5	10	0,035	4	11	0,020
	nein	37	18		34	21	
Multifo- kalität	unifokal	16	7	0,301	15	8	0,207
	multifokal	25	21		22	24	
Wachstums- muster	papillär	40	21	0,043	37	24	0,035
	solide	3	7		2	8	

^a Fisher exact Test (zweiseitig), fettgedruckte kursive Werte sind p-Werte <0,05

Tab. 27: Vergleich histopathologischer Parameter mit immunhistochemischen Markern

Hierbei fällt erneut auf, dass mit den Grenzen >25% für MIB-1 bzw. ≥10% für p53 die Log-Rang-Werte niedriger ausfallen als mit >10% bzw. >10%, weshalb im Folgenden nur diese Berücksichtigung finden. CK20 war mit keinem der histopathologischen Parameter korreliert, wobei hier die Aussagekraft durch die geringe Zahl normaler Fälle sicher eingeschränkt ist. Die p53-IHC (≥10%) zeigte eine signifikante Assoziation zu Begleit-CIS und Wachstumsmuster (p = 0,020 bzw. p = 0,035): Tumoren mit Begleit-CIS zeigten signifikant häufiger eine p53-Überexpression als diejenigen Tumoren ohne (11/15 vs. 21/55) und waren signifikant öfter in soliden als in papillären Tumoren überexprimiert (8/10 vs. 24/61). Interessanterweise war hierbei die Korrelation mit der Kombination aus p53-IHC und TP53-Sequenzierung (vgl.

Tab. 21 im Kapitel 3.1.3) der alleinigen p53-IHC unterlegen, während die TP53-Sequenzierung der Exons 5 bis 8 der Kombination beider Methoden unterlegen war (s. o.).

Die Überexpression von MIB-1 (>25%) war stark mit dem Grading ($p < 0,001$) assoziiert: G2-Tumoren zeigten signifikant seltener als G3-Tumoren eine MIB-1-Überexpression (2/20 vs. 27/49). Mit Begleit-CIS und Wachstumsmuster ergaben sich ebenfalls signifikante Werte ($p = 0,042$ bzw. $p = 0,014$): MIB-1 (>25%) war signifikant öfter in Tumoren mit Begleit-CIS bzw. solidem Wachstumsmuster im Vergleich zu Tumoren ohne Begleit-CIS bzw. papillärem Wachstumsmuster überexprimiert (10/15 vs. 19/53 bzw. 8/10 vs. 21/59).

Auch hierbei muss angemerkt werden, dass Begleit-CIS und Wachstumsmuster ($p = 0,031$) sowie Grading und Begleit-CIS ($p = 0,002$) assoziiert sind: Signifikant häufiger waren Begleit-CIS bei soliden als bei papillären Tumoren vertreten (5/10 vs. 11/65); alle 16 Tumoren mit Begleit-CIS wiesen das Stadium G3 auf, bei Tumoren ohne Begleit-CIS war das Verhältnis G2/G3 23:36.

3.2 Vergleich der molekularen Parameter untereinander

Variable	Kategorisierung	p16-Deletion			Polysomie			LOH		
		ja	nein	p ^a	ja	nein	p ^a	ja	nein	p ^a
CK20	normal	2	0	0,540	1	1	0,387	0	2	1,000
	abnormal	29	11		32	8		13	45	
p53-IHC	≤10%	23	11	0,102	26	8	0,409	7	33	1,000
	>10%	11	1		11	1		5	21	
p53-IHC	<10%	20	11	0,070	24	7	0,696	36	7	1,000
	≥10%	14	1		13	2		30	5	
MIB-1	≤25%	20	11	0,070	24	7	0,696	6	31	0,747
	>25%	14	1		13	2		6	21	
MIB-1	≤10%	13	8	0,107	14	7	0,059	2	22	0,184
	>10%	21	4		23	2		40	10	
FGFR3	Wilttyp	15	8	1,000	19	4	1,000	9	31	0,538
	Mutant	14	6		16	4		4	23	
TP53-Mutation	ja	3	1	1,000	4	0	0,566	3	8	0,444
	nein	26	14		31	9		11	49	

Variable	Kategori- sierung	p16-Deletion			Polysomie			LOH		
		ja	nein	p ^a	ja	nein	p ^a	ja	nein	p ^a
p53-Kombi (>10% od. Mut.)	ja	3	1	0,175	11	1	0,236	6	25	1,000
	nein	26	14		24	8		6	30	
p53-Kombi (≥10% od. Mut.)	ja	16	2	0,091	16	2	0,449	6	29	1,000
	nein	18	11		22	7		6	26	

^a Fisher exact Test (zweiseitig), fettgedruckte kursive Werte sind p-Werte <0,05

Tab. 28: Vergleich der molekularen Parameter untereinander (CK20, p53-IHC, MIB-1, FGFR3, TP53-Mutation, p53-Kombi jeweils mit p16-Deletion, Polysomie und LOH);

Legende: p53-Kombi: entweder p53-Mutation auf den Exons 5 bis 8 *oder* positive p53-Immunhistochemie (>10% bzw. ≥10%).

Variable	Kategori- sierung	FGFR3			MIB-1			MIB-1		
		wt	mut	p ^a	≤25%	>25%	p ^a	≤10%	>10%	p ^a
TP53- Mutation	ja	10	1	0,040	4	7	0,179	1	10	0,042
	nein	30	26		33	20		23	30	
p53-Kombi (>10% od. Mut.)	ja	25	5	0,001	12	20	0,002	6	26	0,006
	nein	15	20		28	9		19	18	
p53-Kombi (≥10% od. Mut.)	ja	27	6	0,001	16	20	0,028	27	6	0,050
	nein	13	19		24	9		13	9	
p53-IHC	≤10%	19	20	0,018	28	13	0,044	19	22	0,071
	>10%	20	5		11	16		6	21	
p53-IHC	<10%	17	19	0,019	24	13	0,221	16	21	0,313
	≥10%	22	6		15	16		9	22	
MIB-1	≤25%	16	20	0,002						
	>25%	22	4							
MIB-1	≤10%	9	14	0,008						
	>10%	29	10							

^a Fisher exact Test (zweiseitig), fettgedruckte kursive Werte sind p-Werte <0,05

Tab. 29: Vergleich der molekularen Parameter untereinander (TP53-Mutation, p53-Kombi, p53-IHC, MIB-1 jeweils mit FGFR3, MIB-1); Legende: wt = wildtyp, mut = mutiert; pos. = positiv, neg. = negativ; norm. = normal, abnorm. = abnormal; p53-Kombi: entweder p53-Mutation auf den Exons 5 bis 8 *oder* positive p53-Immunhistochemie (>10% bzw. ≥10%).

Aus obiger Tab. 29 ist ersichtlich, dass der FGFR3-Status stark invers mit p53-Veränderungen und einer Überexpression von MIB-1 korreliert ist. Der signifikanteste Wert ($p = 0,001$) konnte wieder mit der Kombination aus p53-IHC mit TP53-Mutation notiert werden, was erneut die Überlegenheit dieser Kombination gegenüber den Einzelwerten, vor allem aber gegenüber der alleinigen Mutationsanalyse zeigt: FGFR3-Mutationen waren signifikant häufiger in Tumoren ohne irgendeine p53-Veränderung als bei Tumoren mit einer solchen (20/35 vs. 5/30). Damit traten beide Ereignisse selten gleichzeitig bei einem Tumor auf.

Bei der MIB-1-Überexpression war die $>25\%$ -Grenze erneut besser ($p = 0,002$). Dabei waren FGFR3-Mutationen signifikant öfter in Tumoren mit niedriger MIB-1-Expression ($\leq 25\%$) zu finden (20/36 vs. 4/26 bei denen $>25\%$).

Bei der Korrelation von MIB-1 mit p53-Veränderungen fiel auf, dass wieder die p53-Kombination (vor allem mit $>10\%$) den einzelnen p53-Veränderungen überlegen war ($p = 0,002$). Hierbei wiesen Tumoren, die eine MIB-1-Überexpression ($>25\%$) zeigten, signifikant öfter auch irgendeine p53-Veränderung auf als diejenigen Tumoren ohne eine p53-Veränderung (20/32 vs. 9/37).

Die insgesamt sehr signifikanten Werten lassen erkennen, dass FGFR3-Status, p53-Veränderungen und MIB-1-Überexpression unabhängige Einflussgrößen beim Urothelkarzinom der Harnblase sein könnten. Im besonderen Maße gilt dies für FGFR3 im Vergleich zu p53-Alterationen oder einer MIB-1-Überexpression.

3.3 Marker und Krankheitsverlauf

Die Endpunkte dieser Betrachtung waren das rezidivfreie Überleben sowie das tumorspezifische Gesamtüberleben. Daten zum progressionsfreien Überleben waren leider nicht verfügbar. Die Ergebnisse wurden auf die Gesamtheit, also nicht geschlechtsspezifisch ausgewertet, da das Geschlecht keine Assoziation zeigte ($p = 0,3712$ beim tumorspezifischen Gesamtüberleben bzw. $p = 0,1854$ beim rezidivfreien Überleben). Dieses Vorgehen wurde auch in (fast) allen bisher zu Urothelkarzinomen der Harnblase durchgeführten Studien angewandt.

3.3.1. Einfluss einzelner Parameter

3.3.1.1 Einfluss klinischer Daten und histopathologischer Marker

Parameter: dichotome Grenze	tumorspezifisches Gesamtüberleben Log Rang	rezidivfreies Gesamtüberleben Log Rang
Alter: ≥ 70 Jahre, < 70 Jahre	<i>0,0460</i>	0,3327
Geschlecht: männlich, weiblich	0,4202	0,1854
Grading: G2, G3	0,1901	0,7614
Begleit-Carcinoma-in-situ: ja, nein	0,7946	0,6861
Wachstumsmuster: papillär, solide	<i>0,0220</i>	0,9245
Multifokalität: ja, nein	0,3957	0,5180

Tab. 30: tabellarische Zusammenfassung der p-Werte für das tumorspezifische Gesamtüberleben und das rezidivfreie Überleben aus den Kaplan-Meier-Analysen für nicht-molekulare Parameter; fettgedruckte kursive Werte sind p-Werte $< 0,05$

Erwartungsgemäß waren Alter und Wachstumsmuster mit dem tumorspezifischen Gesamtüberleben signifikant korreliert (Kaplan-Meier-Kurven nicht dargestellt), hatten allerdings ebenso wie die anderen nicht-molekularen Marker keinen signifikanten Einfluss auf das rezidivfreie Überleben. Patienten, die bei der Erstdiagnose des primären pT1-Tumors jünger als 70 Jahre waren, oder solche mit papillärem Wachstumsmuster lebten signifikant länger als über 70-Jährige oder solche mit solidem Wachstumsmuster.

3.3.1.2. Einfluss molekularer Marker

Die Kombination von TP53-Sequenzierung und immunhistochemischer Darstellung von p53 in einem Parameter (p53-Kombi) erwies sich als synergistisch: die p-Werte für diese Kombination waren sowohl für das tumorspezifische Gesamtüberleben als auch für das rezidivfreie Überleben kleiner als bei den Einzelwerten. Dabei war die Grenze $\geq 10\%$ bei der p53-IHC spezifischer als die Grenze $> 10\%$ beim tumorspezifischen Gesamtüberleben und beim rezidivfreien Überleben. Bei MIB-1 war die $> 25\%$ -Grenze der $> 10\%$ -Grenze nur bezüglich des

tumorspezifischen Gesamtüberlebens überlegen, beim rezidivfreien Überleben verhielt es sich umgekehrt.

Statistisch signifikant besser war das tumorspezifische Gesamtüberleben bei Tumoren mit einer p53-Überexpression $\geq 10\%$ ($p = 0,0423$). In Kombination mit TP53-Mutationen wurde dieser Wert noch unterboten ($p = 0,0214$). Mit dem rezidivfreien Überleben zeigte keiner der molekularen Marker eine signifikante Korrelation, lediglich Tumoren mit FGFR3-Mutationen korrelierten fast signifikant ($p = 0,0545$) mit einer höheren Rezidivrate.

Die Ergebnisse zu den einzelnen molekularen Markern sind in unten stehender Tab. 31 zusammengefasst:

Parameter (dichotome Grenze)	tumorspezifisches Gesamtüberleben Log Rang	rezidivfreies Gesamtüberleben Log Rang
LOH in 4 Primern: ja, nein	0,3607	0,6641
MSI in 4 Primern: ja, nein	0,1421	0,8598
p16-Deletion: ja, nein	0,2323	0,7227
Polysomie: ja, nein	0,5118	0,5521
TP53-Mutation auf Exon 5 bis 8: ja, nein	0,4292	0,4362
p53-Kombination ($>10\%$)	0,0415	0,1647
p53-Kombination ($\geq 10\%$)	0,0214	0,1053
FGFR3-Mutation: Wildtyp, Mutant	0,9826	0,0545
CK20: normales, abnormes Expressionsmuster	0,8240	0,7432
p53 ($>10\%$)	0,0726	0,1979
p53 ($\geq 10\%$)	0,0423	0,1380
MIB-1 ($>25\%$)	0,1778	0,4424
MIB-1 ($>10\%$)	0,7332	0,2562

Tab. 31: tabellarische Zusammenfassung der p-Werte für das tumorspezifische Gesamtüberleben und das rezidivfreie Überleben aus den Kaplan-Meier-Analysen für molekulare Marker;

fettgedruckte kursive Werte sind p-Werte $< 0,05$, fast signifikante p-Werte nur kursiv;

Legende: p53-Kombination: entweder TP53-Mutation oder positive p53-Immunhistochemie ($> 10\%$ bzw. $\geq 10\%$ als Grenze)

Obwohl die restlichen Marker nicht signifikant mit dem CSS oder RFS korreliert waren, zeigten sich augenscheinlich bei den Kaplan-Meier-Kurven (nicht dargestellt) gewisse Tendenzen:

- LOH auf Chromosom 8 schien für das CSS und das RFS positiv zu sein.
- Patienten mit einer MIB-1-Überexpression (>25%) lebten scheinbar kürzer, zeigten aber ein scheinbar längeres rezidivfreies Überleben.
- p16-Deletionen scheinen sich negativ auf das tumorspezifische Überleben auszuwirken.
- MSI, Polysomie und FGFR3-Mutationen hatten keinen Einfluss auf das tumorspezifische Überleben.
- MSI und Polysomie hatten keinen Einfluss auf das rezidivfreie Überleben.

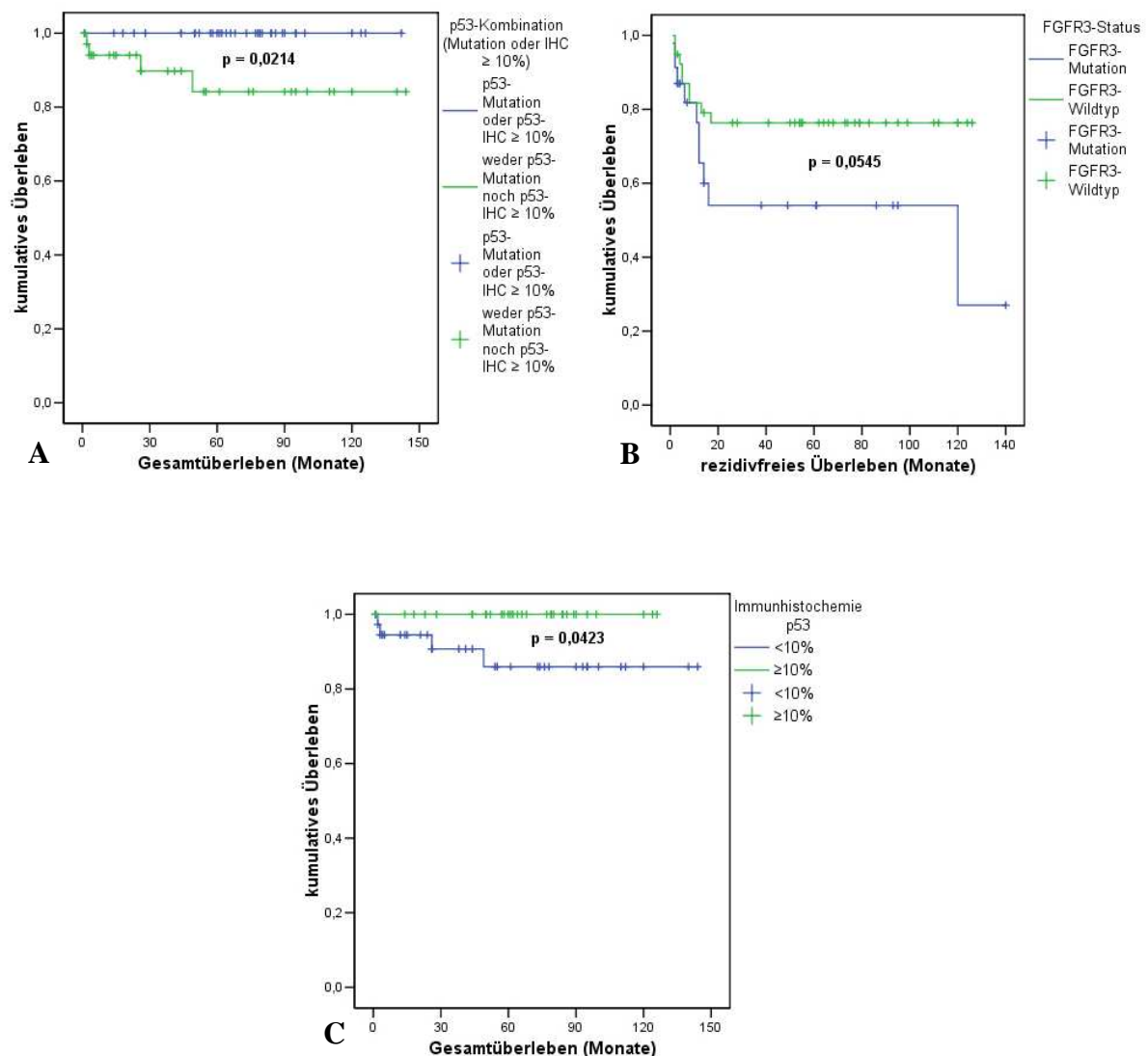


Abb. 23: Kaplan-Meier-Kurven mit (fast) signifikanten Werten bei der Berechnung für molekulare Parameter
 (A) p53-Kombination (positive p53-IHC oder TP53-Mutation auf den Exons 5 bis 8) und tumorspezifisches Gesamtüberleben
 (B) FGFR3-Status und rezidivfreies Überleben
 (C) Immunhistochemie von p53 (≥10%) und tumorspezifisches Gesamtüberleben

3.3.2 Einfluss von Marker-Kombinationen

Aus den bisherigen Daten kristallisierten sich vor allem FGFR3-, p53- und MIB-1-Status als interessante, voneinander unabhängige Marker heraus, die einen gewissen Einfluss auf das klinische Outcome besitzen könnten. Deshalb wurden jeweils für das tumorspezifische Gesamtüberleben und das rezidivfreie Überleben folgende Surrogatparameter konstruiert:

Für das tumorspezifische Gesamtüberleben:

- Low-Risk-Gruppe: p53-Veränderung (p53-Kombination: ja) und MIB-1-IHC $\leq 25\%$
- High-Risk-Gruppe: keine p53-Veränderung (p53-Kombination: nein) und MIB-1-IHC $> 25\%$
- intermediäre Gruppe: die restlichen zwei Kombinationen

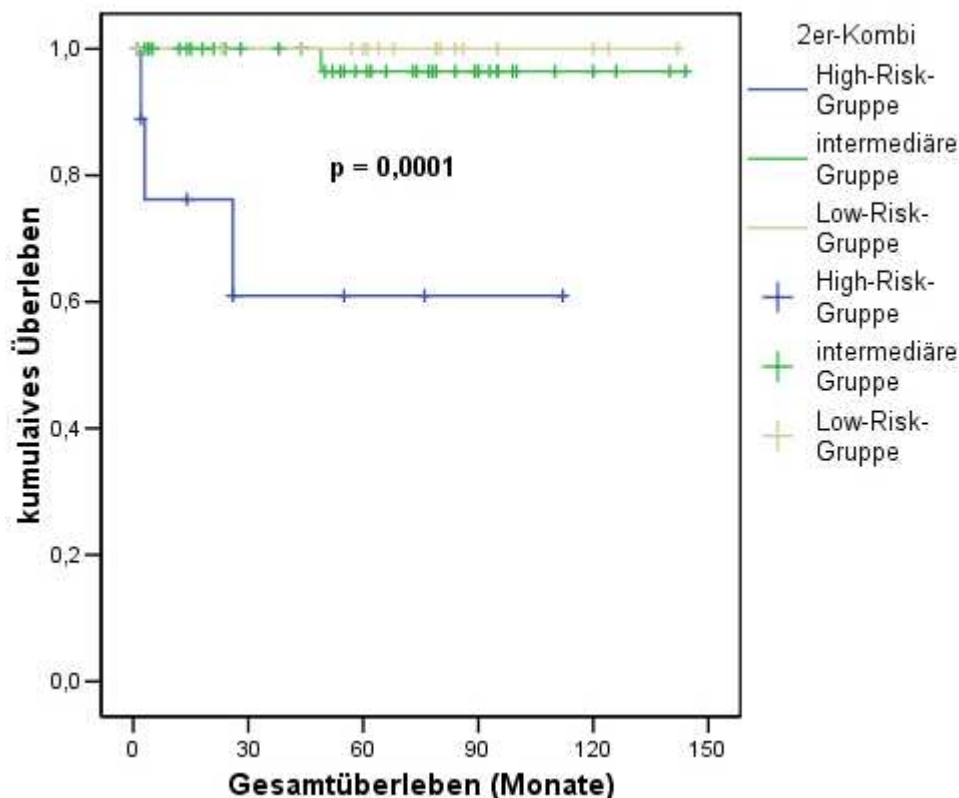


Abb. 24: Kaplan-Meier-Kurve für die Kombination aus p53-Status (Mutationstatus oder IHC auffällig) und MIB-1-Expression in Bezug auf das tumorspezifische Gesamtüberleben

Diese Kombination beeinflusste hoch signifikant das tumorspezifische Überleben und unterbot damit sogar das signifikante $p = 0,0214$, das die p53-Kombination allein schon aufwies. Patienten aus der Low-Risk-Gruppe lebten signifikant länger als die aus der High-Risk- oder

der intermediären Gruppe. Während der Unterschied zwischen der High-Risk-Gruppe und der intermediären Gruppe ebenfalls hoch war, hatten Patienten mit Low-Risk-Gruppe gegenüber der intermediären Gruppe kaum noch Vorteile.

Diese p53/MIB-1-Kombination war damit als „molekulares Grading“ allen anderen (sowohl molekularen als auch histopathologischen) Parametern bezüglich der Vorhersage des tumorspezifischen Überlebens deutlich überlegen.

Außerdem wurde noch die Kombination aus p16-Status und p53-Veränderung getestet. Dafür wurden die Subgruppen wie folgt definiert:

- Low-Risk-Gruppe: keine p16-Deletion und gleichzeitig eine p53-Veränderung (p53-Mutation in den Exons 5 bis 8 und/oder positive Immunhistochemie $\geq 10\%$)
- High-Risk-Gruppe: p16-Deletion und gleichzeitig keine p53-Alteration (weder p53-Mutation noch eine immunhistochemische Färbung $< 10\%$)
- Intermediär-Gruppe: die restlichen zwei möglichen Kombinationen

Damit konnte zwar ein signifikanter Wert erreicht werden ($p = 0,0204$; Kaplan-Meier-Kurve nicht dargestellt), dieser konnte den Wert der Kombination p53/MIB-1 jedoch nicht erreichen. Patienten aus der High-Risk-Gruppe wiesen (paradoxe Weise) ein signifikant längeres tumorspezifisches Gesamtüberleben auf als die beiden anderen Gruppen, die sich kaum voneinander unterschieden. Nur zwei Patienten gehörten dabei der Low-Risk-Gruppe an, hatten also keine p16-Deletion und gleichzeitig eine TP53-Mutation.

Für das rezidivfreie Gesamtüberleben:

- Low-Risk-Gruppe: FGFR3-Wildtyp, p53-Veränderung (p53-Kombination: ja) und MIB-1-IHC $> 25\%$
- High-Risk-Gruppe: FGFR3-Mutant, p53-Veränderung (p53-Kombination: nein) und MIB-1-IHC $\leq 25\%$
- Intermediär-Gruppe: die restlichen möglichen Kombinationen

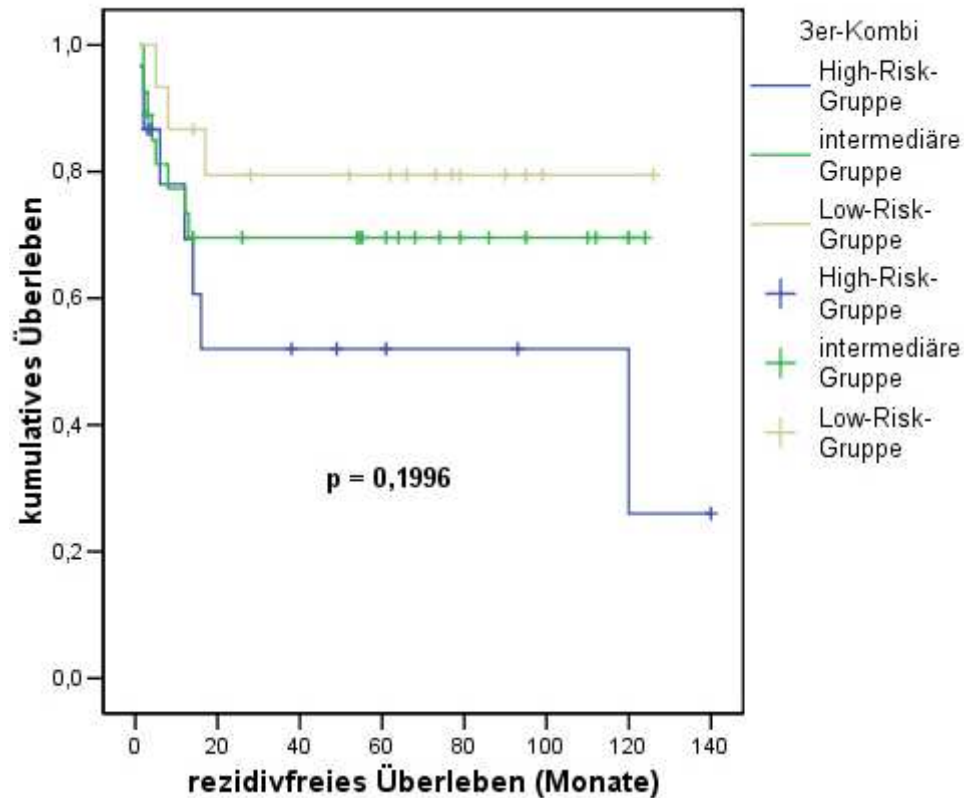


Abb. 25: Kaplan-Meier-Kurve für die Kombination aus FGFR3-Status, p53-Status (Mutationstatus oder IHC auffällig) und MIB-1-Expression in Bezug auf das rezidivfreie Überleben

Zwar war mit einem $p = 0,1996$ der Zusammenhang nicht signifikant, dennoch konnten durch dieses „molekulare Grading“ die entsprechenden Werte für das rezidivfreie Überleben bei den klassischen histopathologischen Markern deutlich unterboten werden (s. Tab. 30 unter Kapitel 3.3.1.1).

Außerdem wurde die Zweier-Kombination aus FGFR3-Status und p53-Status allein getestet, da MIB-1 dahingehend unbefriedigend ist, dass sich für das RFS und das CSS entgegengesetzte Resultate errechneten. Für diese Gruppen definierten sich somit die drei Surrogatparameter wie folgt:

- Low-Risk-Gruppe: FGFR3-Wildtyp und p53-Veränderung (p53-Kombination: ja)
- High-Risk-Gruppe: FGFR3-Mutant und keine p53-Veränderung (p53-Kombination: nein)
- Intermediär-Gruppe: die restlichen zwei Kombinationen

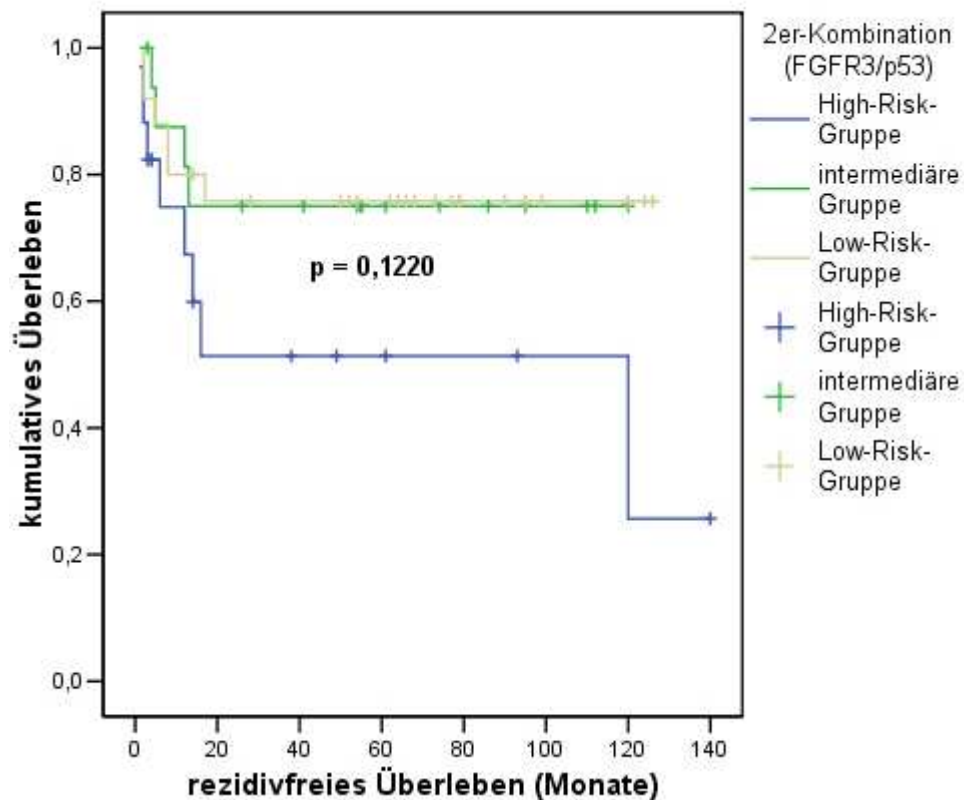


Abb. 26: Kaplan-Meier-Kurve für die Kombination aus FGFR3-Status und p53-Status (Mutationsstatus oder IHC auffällig) in Bezug auf das rezidivfreie Überleben

Wie vermutet, rückte durch den Verzicht auf MIB-1 als Teil des Surrogatmarkers der p-Wert näher an die Signifikanzgrenze heran ($p = 0,1220$ statt $p = 0,1996$), blieb jedoch über dem Wert von FGFR3 allein ($p = 0,0545$). Der Unterschied zwischen High-Risk-Gruppe und den beiden anderen Gruppen, die sich kaum unterschieden, war groß. Wenn man deshalb die intermediäre Gruppe und die Low-Risk-Gruppe zu einer gemeinsamen Entität zusammenfasst und anschließend mit der High-Risk-Gruppe vergleicht, ergibt sich ein signifikanter Wert von $p = 0,0403$: Die Patienten aus der High-Risk-Gruppe haben ein signifikant kürzeres rezidivfreies Überleben als die Patienten aus den beiden anderen Gruppen. Damit ist die Kombination von FGFR3-Status und p53-Status (p53-Kombination) der einzige Parameter, der das rezidivfreie Überleben signifikant beeinflusst (FGFR3-Status allein war mit $p = 0,0545$ knapp über der Signifikanzgrenze).

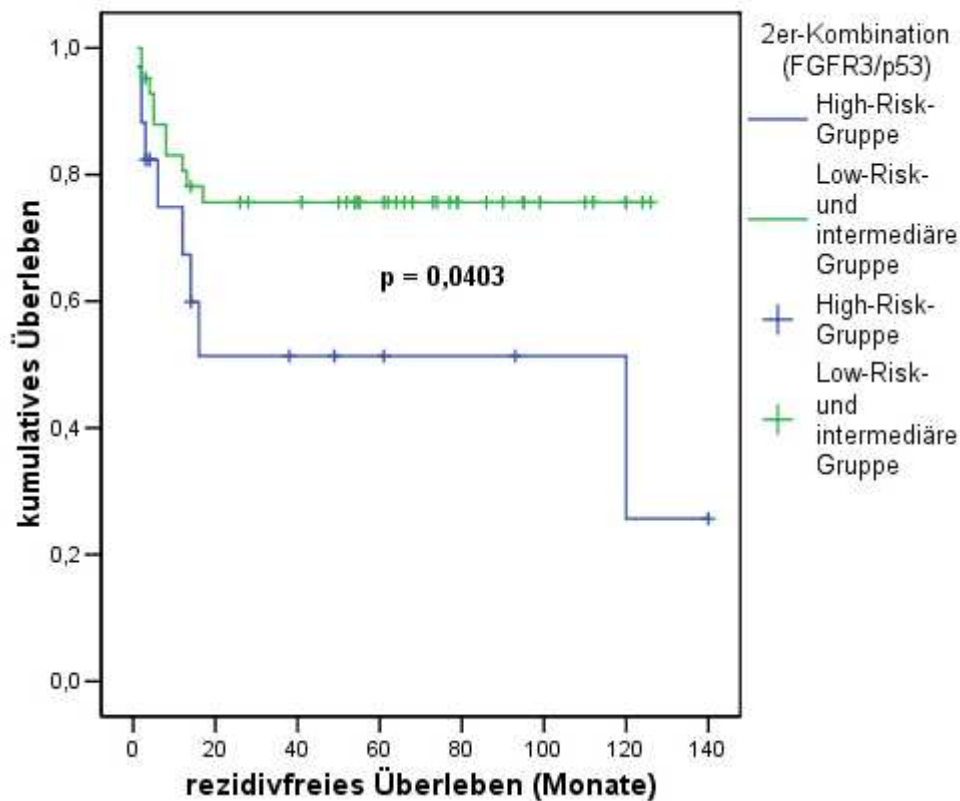


Abb. 27: Kaplan-Meier-Kurve für die Kombination aus FGFR3-Status und p53-Status (Mutationstatus *oder* IHC auffällig) in Bezug auf das rezidivfreie Überleben; Low-Risk- und intermediäre Gruppe sind zu einer gemeinsamen Gruppe zusammengefasst (grüne Darstellung).

Außerdem wurde noch die Kombination aus p16-Status und LOH-Status in Kaplan-Meier-Kurven für das tumorspezifische Gesamtüberleben getestet, da diese einzeln zumindest augenscheinlich einen Einfluss darauf hatten (s. Kapitel 3.3.1.2). Die Surrogatparameter waren wie folgt definiert:

- Low-Risk-Gruppe: LOH und gleichzeitig keine p16-Deletion
- High-Risk-Gruppe: normaler LOH-Status und gleichzeitig eine p16-Deletion
- Intermediär-Gruppe: die restlichen zwei Kombinationen

Es ergab sich ein $p = 0,4544$, wobei das tumorspezifische Überleben bei der intermediären und der Low-Risk-Gruppe ähnlich war, weshalb diese im nächsten Schritt zu einer gemeinsamen Gruppe zusammengefasst wurden. Damit ergab sich ein $p = 0,2091$, das zwar in der Kaplan-Meier-Kurve (nicht dargestellt) wieder scheinbar ein längeres tumorspezifisches Gesamtüberleben suggerierte, aber dennoch weit von der Signifikanzgrenze oder gar den hervorragendem Wert der p53/MIB-1-Kombination ($p = 0,0001$) entfernt lag.

Aus diesem Grund wurde auf die Testung weiterer Markerkombinationen verzichtet, da die Einzelparameter bereits wenig viel versprechend waren. Auch eine Kombination von drei oder noch mehr Markern hätte den p-Wert der p53/MIB-1-Kombination nicht unterbieten können.

4 Diskussion

4.1. Kritische Betrachtung der verwendeten Methoden und Daten

4.1.1 Kritische Betrachtung der PCR-Reaktion/-Ergebnisse

Das Problem einer negativen PCR bestand bei vielen Patienten zumindest in einem, oft in mehreren Loci. Dass einzelne Loci ausfallen, ist aus unten genannten Gründen verständlich, doch es gab auch insgesamt fünf Tumoren, bei denen alle Loci trotz mehrfacher Wiederholung nicht amplifizierbar (NA) waren. Möglich Gründe hierfür sind:

- Fehler beim Pipettieren: Außer dem DMSO sind sämtliche Reagenzien essentiell für das Gelingen der PCR-Reaktion.
- kontaminierte Reagenzien, beispielsweise Proteinasen, die die Taq-Polymerase abbauen
- degradierte DNA

Letzteres Problem wurde durch das Einfrieren der Reagenzien und die prompte Verarbeitung minimiert. Einzig die DNA, die durch häufiges Einfrieren und Wiederauftauen mit den damit verbundenen Temperaturwechseln schneller degradiert wäre, wurde bei 4°C im Kühlschrank gelagert.

Da bei negativen Ergebnissen in der PCR eine Wiederholung mit doppelter DNA-Menge erfolgte, konnte die Degradierung der DNA in der Mehrzahl der Fälle als Ursache für das fehlende Ergebnis ausgemacht werden. Gründe für die Unbrauchbarkeit der DNA könnten vor allem die lange Lagerungszeit und die DNA-Isolierung aus manchmal 14 Jahre alten Paraffinblöcken sein, obwohl dort die Ergebnisse nicht schlecht waren. Es kann außerdem nicht ausgeschlossen werden, dass trotz der Reinigungsschritte bei der DNA-Isolierung verschiedene PCR-Inhibitoren in der DNA vorliegen. Andere Gründe sind die Formalinfixierung mit nachfolgender Paraffinarchivierung, die den extrahierbaren DNA-Gehalt auf etwa 15% im Vergleich zur Extraktion von Gefrierschnittgewebe sinken lassen (Serth et al., 2000) oder lange Fixationszeiten, die zu Degradierung führen. Doch auch die Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung, die immunhistochemischen Färbungen, die TP53-Sequenzierung sowie die FGFR3-Analysen konnten ohne größere Probleme an dem in Paraffin eingebetteten Material durchgeführt werden.

Die LOH-Analyse und auch die PCR für die direkte Sequenzierung wurden bei unbefriedigenden Ergebnissen mindestens noch zwei- bis dreimal wiederholt. Bei dann noch immer fehlenden Banden auf dem Silbergel wurde als Ergebnis „NA“ (nicht amplifizierbar) notiert.

4.1.2 Kritische Betrachtung der LOH- und MSI-Analyse

Es gibt einige theoretische Einwände gegen die Reproduzierbarkeit der LOH-Analyse. Dazu gehören:

1. Manchmal war die Auslöschung der Bande bei den LOHs nicht vollständig. Der Grund dafür ist die Kontamination des mikrodisszierten Gewebes mit Stroma- und Entzündungszellen, die das im Tumor deletierte Allel noch enthalten. Dieses Allel wird in der PCR amplifiziert und erscheint im Silbergel. Deshalb wurde ein Tumoranteil bei der Mikrodissektion von mindestens 80% gefordert (Böhm et al., 1997), um diesen Effekt möglichst gering zu halten. Da bei den Proben dieser Arbeit das Tumorgewebe meist sehr gut abgrenzbar und selten disseminiert vorlag, wurde ausschließlich manuell mikrodissziert, und ein Einsatz der computergestützten Laser-Mikrodissektion war nicht nötig.
2. Der Vorteil der manuellen Mikrodissektion liegt zwar darin, dass außer einem Stereomikroskop und sterilen Kanülen keine aufwendigen bzw. teureren Geräte notwendig sind, der Nachteil aber besteht in dem höheren Zeitaufwand dieser Methode und der Anfälligkeit für mögliche akzidentielle Kontaminationen, die zu verfälschten Ergebnissen führen. Um die oben beschriebene Problematik bestmöglich gering zu halten, wurde folgendes Procedere gewählt: Vorauswahl der HE-Schnitte sowie Achten auf Gewinnung möglichst homogener Urothelzellpopulationen. Außerdem wurden während der gesamten manuellen Mikrodissektion Einmalhandschuhe und Mundschutz getragen, um eine akzidentielle Kontamination mit Fremdmaterial (Hautzellen, Speichel) zu vermeiden. Wenn nacheinander in einem Schnitt Normal- und Tumorgewebe gewonnen wurde, so wurden dazu jeweils zwei sterile Kanülen benützt. Selbstverständlich wurden auch bei jedem neuen Tumor neue sterile Kanülen verwendet.
3. Als weiteres Problem kann die ungleich starke Amplifikation der beiden Allele (präferentielle oder inhomogene allelische Amplifikation) angeführt werden, die einen LOH vortäuschen kann. Auch Schädigungen der einzelnen Allele durch Fixierung und Lagerung oder spezifische Inhibitoren der Amplifikation können Gründe sein. Diese Ursachen können durch eine ausreichend hohe DNA-Konzentration (viele Zellen) im Template in ihrer Auswirkung minimiert werden. Falsch positive LOH-Ergebnisse werden durch Verifizierung jedes LOH in einer zweiten PCR verhindert (Tischfield, 1997).

4. Liegt eine Mikrosatelliteninstabilität vor, kann bei Heterozygotie ein LOH durch die Überlagerung der Allele vorgetäuscht werden (Boland et al., 1998).
5. Sind im Tumor beide Allele deletiert (homozygote Deletion), werden nur die Allele des kontaminierenden Normalgewebes amplifiziert, was eine Heterozygotie des Tumors vortäuscht.
6. Im Rahmen der intratumoralen Heterogenität können innerhalb eines Tumors verschiedene Subklone vorliegen mit unterschiedlichen genetischen Alterationen. Auf diese Weise kann ein LOH eines Zellstammes durch die Polyploidie eines anderen kompensiert werden.
7. Eine zu geringe Zahl an Urothelzellen kann durch die inhomogene Amplifikation der Allele zu einem scheinbaren LOH führen. Wird z. B. nur ein Allel vervielfältigt, kommt es zu einem falsch positiven Resultat; wird das nicht-deletierte Allel nicht amplifiziert, zu einem falsch negativen Ergebnis. Bei Verwendung von DNA aus mikrodisseziertem Material sollte daher die Zellzahl möglichst mehr als 100 Zellen betragen (Dietmaier et al., 1999). Im Rahmen dieser Arbeit wurde sehr darauf geachtet, eine möglichst große Menge an Urothel zu verwenden. Bei der Mikrodissektion wurden daher bis zu 18 Schnitte bearbeitet, so dass die Zellzahl weit über 100 Zellen lag.
8. Werden in der PCR zu viele Zyklen durchgeführt, könnte die Deletion eines Allels im Tumor durch Erreichen der Plateauphase durch das entsprechende Allel im kontaminierenden Normalgewebe maskiert werden und Heterozygotie vortäuschen. Als geeignet hatte sich in Vorarbeiten eine Zellzyklenzahl von 35 erwiesen.
9. Verwendung schlecht interpretierbarer Marker: Einige Marker erwiesen sich als ungeeignete Deletionsmarker, da ihre instabilen Amplifikationsmuster eine präzise Auswertung der zwei Alle erschwerten. Wegen der schlechten Interpretierbarkeit und Verlässlichkeit der mit diesen Primern erzielten Ergebnisse ist nach einigen Versuchen auf die Verwendung dieser Primer verzichtet worden.

Trotz dieser Verbesserungen bleibt die LOH-Analyse anfällig und die Interpretation subjektiv. Deshalb wurden inzwischen bessere Methoden entwickelt, um verlässlichere Ergebnisse zu erzielen. Dazu gehört vor allem der Einsatz des ABI-Geräts, das öfter noch interpretierbare Ergebnisse lieferte, wo die Silbergele „nicht informative“ oder „nicht amplifizierbare“ Ergebnisse anzeigten (Beobachtung aus dem Vergleich von Silbergelen und der ABI-Methode am Institut für Pathologie der Universität Regensburg).

4.1.3 Kritische Betrachtung der UroVysion-FärbungTM für die FISH

Der UroVysionTM Bladder Cancer Recurrence Kit (UroVysion-Kit) wurde zur Detektion von Aneuploidie und p16-Deletion in Urothelzellen konzipiert, die aus Urin oder durch Blasen-spülung gewonnen wurden. Hinsichtlich der Sensitivität scheint die UroVysion-Untersuchung gegenüber der alleinigen zytologischen Begutachtung deutlich überlegen zu sein (Halling et al., 2000) (Bubendorf et al., 2001) (Sauter et al., 2002) (Skacel et al., 2003). Längst ist diese Sonde auch für in Paraffin eingebettetes Harnblasengewebe erfolgreich verwendet worden. Dazu wurde ein optimiertes FISH-Standardprotokoll erarbeitet, das eine sehr gute Hybridisierung erlaubt und hervorragende Ergebnisse liefert. Dabei konnten für in Paraffin eingebettetes Harnblasengewebe Ergebnisse erzielt werden, die mit denen von Zytologien, wie sie in der Literatur beschrieben werden, vergleichbar sind (Bubendorf et al., 2001). Damit dürften die Ergebnisse als aussagekräftig gelten.

4.1.4 Kritische Betrachtung der Verwendung von Tissue-Micro-Arrays

In dieser Arbeit kam die Verwendung von Tissue-Micro-Arrays (TMAs) zur Immunhistochemie- und FISH-Analyse zum Einsatz. Die einzelnen Untersuchungen wurden also nicht an einem einzelnen Schnitt des Ursprungsgewebes vorgenommen, sondern die für die Analyse relevanten Gewebestellen wurden aus einer Probe gezielt herausgestanzt. Zirka 35 dieser Areale wurden in einen neuen Paraffinblock eingebettet. Die von diesen Blöcken gewonnenen Schnitte zeigen somit 35 relevante Gewebeproben gleichzeitig.

Die Vorteile dieser Methode liegen auf der Hand: Mit nur einer immunohistochemischen Färbung oder DNA-Sondenhybridisierung können gleichzeitig zweistellige Probenzahlen im mittleren Bereich evaluiert werden. Die Technik birgt ein großes Einsparungspotential in sich. Neben Zeitersparnis (was gleichzeitig auch weniger Personalkosten für eine Studie bedeutet) lassen sich vor allem die Kosten für teure Sonden und Material reduzieren (Handbuch, Fa. Zytomed) (Torhorst et al., 2001). Das verbessert die Effizienz einer Methode und gleichzeitig wird die Vergleichbarkeit der einzelnen Proben untereinander (noch) besser, da alle Gewebeproben mit der gleichen Prozedur behandelt wurden. Daher treten kaum interexperimentelle Unterschiede auf (Handbuch, Fa. Zytomed). Jedoch sollten sich die Ursprungsgewebe hinsichtlich Methoden der Probengewinnung, ihrer Lagerdauer in Paraffin und der Qualität des

Einbettungsmaterials nicht zu sehr unterscheiden. So kann das Risiko falsch positiver bzw. falsch negativer Ergebnisse minimiert werden.

Allerdings benötigt die Vorbereitung und Erstellung eines solchen TMA bedeutend mehr Zeit als eine konventionelle Schnitterstellung. Alle Proben müssen vor der Array-Erstellung durchgesehen und die für die Fragestellung der Untersuchung relevanten Gewebsareale markiert werden. Das Herausstanzen der Proben stellt einen zusätzlichen zeitlichen Aufwand dar. Dafür spart man sich bei der Auswertung das Aufsuchen spezieller Bereiche, da diese durch das Herausstanzen bereits ausgewählt sind. Allerdings entfällt die Möglichkeit, nachträglich benachbarte Gebiete der Stanze zu evaluieren, wenn sich erst bei der Untersuchung herausstellen würde, dass diese vielleicht von Interesse wären.

Eminent wichtig ist, ob die Stanzen auch repräsentativ für die Originalläsion ist. Dies mag für die Kritiker der Methode das Hauptproblem darstellen. Deshalb ist eine genaue Vorauswahl und Vorbereitung nötig, womit sich aber dann die gewünschten Areale relativ exakt herausstanzen lassen. Größere Evaluierungsstudien haben darüber hinaus gezeigt, dass aus größeren Tumoren, die oft heterogen sind, gestanzte Gewebeproben signifikant repräsentativ für das Ursprungsgewebe waren (Moch et al., 2001) (Nocito et al., 2001) (Tzai et al., 2003). In den genannten Arbeiten wurden sogar noch kleinere Stanzen benützt, so dass die Aussage dieser Studien umso mehr für die in der vorliegenden Arbeit verwendeten größeren Stanzen gelten muss, insbesondere bei morphologisch kleinen Läsionen wie Urotheltumoren.

Zusammenfassend sollten die hier gewonnenen Gewebeproben als repräsentativ für das Ursprungsgewebe angesehen und die so gewonnenen Ergebnisse dieser Arbeit als verwertbar betrachtet werden. Tissue-Micro-Arrays sind heute längst als eine effiziente und effektive Methode etabliert, die es ermöglicht, mit kleinerem finanziellem und personellem Aufwand eine große Anzahl von Proben zu untersuchen.

4.1.5 Kritische Betrachtung der TP53-Sequenzierung der Exons 5 bis 8

In dieser Arbeit wurden bei 69 Tumoren die Exons 5 bis 8 sequenziert. Die dabei verwendete Taq-Polymerase besitzt keine Exonukleasefunktion, so dass Polymerasefehler zur Mutation führen können. Die Wahrscheinlichkeit für ein solches Ereignis lässt sich nach einer Formel von Keohavong et al. (1989) berechnen. Die Mutationsfraktion F ergibt sich aus der Länge b der Zielsequenz, der Fehlerrate f der verwendeten DNA-Polymerase (10^{-4} /Base, Dietmaier et al., 1999) und der Anzahl der PCR-Zyklen aus der Formel $F = 1 - e^{-bdf}$. Im Fall dieser Arbeit

kommt man damit (je nach Exon) zu einer Mutationsfraktion M von nahe 100%, d. h. in fast jeder Probe wäre ein Taq-Fehler zu finden gewesen. Es ist allerdings zu beachten, dass diese Angaben nur gültig wären, wenn als Template in die Outer-PCR die DNA einer einzigen Zelle eingesetzt worden wäre. Schon die Tatsache, dass sich viel weniger Fehler fanden, spricht dafür, dass die DNA vieler Zellen eingesetzt wurde, und die Taq-Polymerase-Fehler unter diesen Bedingungen nicht so sehr ins Gewicht fielen. Der gegenteilige Fall, nämlich dass eine Mutation im Gen durch die Taq-Polymerase ausgebessert wird, ist so unwahrscheinlich (1:1.000.000), dass aus Kosten- und Zeitgründen auf eine Verifizierung von Normalsequenzen verzichtet wurde.

Wie bei der Mikrosatelliten-Analyse ist es außerdem wichtig, dass die DNA-Konzentration nicht zu niedrig ist. Leider war es bei einigen Tumoren unmöglich, die gesuchten Sequenzen in der nested-PCR darzustellen. Wie schon bei der LOH-Analyse war dies dann in fast allen oder sogar allen Exons eines Tumors der Fall, selten war ein einzelnes Exon nicht auswertbar.

4.1.6 Kritische Betrachtung der FGFR3-Mutationsanalyse

Bei der in Rotterdam/Niederlande entwickelten Methode sei auf die Diskussion bei van Oers et al. (2005) verwiesen.

4.1.7 Kritische Betrachtung der histopathologischen und klinischen Daten

Das Grading und Staging birgt Probleme, wie sich aus dem Vergleich von Nachbefundung und Originalbefunden im PAS-System für die vorliegende Arbeit erkennen ließ. Zwar sind Tumor-Grade und -Stage etablierte prognostische Faktoren beim Harnblasenkarzinom, dennoch sind Probleme bei der mikroskopischen Beurteilung der Urothelkarzinome wohl bekannt (Mian et al., 2006): Tumorlokalisation, Verbrennungseffekte bei der transurethralen Resektion, Schneidartefakte durch die Schnittpräparation und die Tiefe der geschnittenen Gewebstreifen sind Stolpersteine auf dem Weg zum richtigen histopathologischen Urteil. Vergleichsuntersuchungen des gleichen Schnitts bei verschiedenen pathologischen Instituten ergeben variierende Resultate. Diese sind jedoch sowohl vom Untersucher als auch von morphologischen Parametern abhängig. Vor allem das Tumor-Grading unterliegt einer hohen intraindividuellen und interindividuellen Variabilität (Ooms et al., 1983). Tosoni et al. (2000), die ihr Augenmerk besonders auf interindividuelle Unterschiede bei der Beurteilung von pT1-Tumo-

ren gerichtet hatten, raten an, Biopsien von Blasen Tumoren möglichst von zwei Pathologen unabhängig voneinander bewerten zu lassen, bevor eine radikale Therapie empfohlen wird. Ebenfalls erwähnt werden muss, dass sich die intraoperative Diagnostik bei der TUR-B durch die Einführung der Fluoreszenzdiagnostik mittels Delta-Aminolävulinsäure verbessert hat, vor allem für flache Läsionen wie CIS. Ob diese Methode zu einer Verbesserung des Outcomes von pT1-High-Grade-Tumoren geführt hat, wurde in einer randomisierten Studie untersucht (Denzinger et al., 2007): In Bezug auf das rezidivfreie Überleben ist die fluoreszenz-diagnostische transurethrale Resektion signifikant besser als die konventionelle Weißlicht-Resektion. Jedoch wird die Progressionsrate hin zur Muskelinvasivität durch die Fluoreszenzdiagnostik nicht verbessert, womit der klinische Verlauf (die Progression) von T1-High-Grade-Tumoren unberührt bleibt. Da die Fluoreszenzdiagnostik erst Mitte der 1990er Jahre eingeführt wurde, sind die Ergebnisse für das Rezidiv kritisch zu hinterfragen (Tumoren in dieser Arbeit von 1990 bis 2000!), während die Resultate des tumorspezifischen Gesamtüberlebens unberührt bleiben sollten. Ob ein Patient ein Rezidiv erlitt oder nicht, hatte in den vorliegenden Daten keinen signifikanten Einfluss auf das tumorspezifische Gesamtüberleben ($p = 0,4350$).

Als hilfreicher und klinisch relevanter zeigte sich in Studien eine genauere Unterteilung in anatomisch-pathologischer Weise in pT1a-c (Mhawech-Fauceglia et al., 2007) (van der Aa et al., 2005) (Orsola et al., 2005) und die Berücksichtigung von Begleit-CIS und Multifokalität (Denzinger et al., 2007). Allerdings halten Paner et al. (2007) aufgrund der Inkonsistenz einer distinkten Muscularis mucosae-Schicht und wegen Variationen im Gefäßplexus der Lamina propria ein Substaging für problematisch. Die Arbeit von Orsola et al. (2005) zeigte zusätzlich, dass die Anzahl der Fälle, bei denen dieses Substaging möglich ist, mit der Zeit durch die Zusammenarbeit von Urologen und Pathologen stieg.

Die genannten Kritikpunkte an den verwendeten Methoden und Daten sollten deshalb bei der anschließenden Evaluation immer im Hinterkopf behalten werden.

4.2 Genetische Veränderungen als molekulare Prognosefaktoren?

4.2.1 Vorbemerkung zur Diskussion

Bei der Literaturrecherche lässt sich die Tendenz erkennen, in den Arbeiten eine Vielzahl von Markern gleichzeitig zu untersuchen. Dies erschwert natürlich eine übersichtliche Darstellung der einzelnen Parameter. Der Vergleich mehrerer Marker trägt dennoch dem Problem Rechnung, dass die Entstehung von Urothelkarzinomen im Allgemeinen, im Speziellen aber besonders das Verhalten und die Progression von pT1-Tumoren auf molekularer Ebene sehr komplex und noch nicht genau verstanden sind. Durch den Vergleich der Marker besteht die Möglichkeit, die pathogenetischen Grundlagen dieser Erkrankung näher zu erforschen. Bisher konnten vor allem die Kombinationen von Markern die Prognose und das Überleben des Patienten besser vorhersagen als ein einzelner Marker allein.

Es gibt wenige Arbeiten, die sich speziell mit pT1-Tumoren beschäftigen. Oft wurden pTa- und pT1-Tumoren zusammen als sog. „oberflächliche“ Urothelkarzinome betrachtet (was inzwischen obsolet ist) oder gar Urothelkarzinome im Allgemeinen. Leider konnte aus den Veröffentlichungen oft nicht speziell auf die in der vorliegenden Arbeit abgehandelte Untergruppe der pT1-Tumoren geschlossen werden. Falls aber doch die Rohdaten zur Einsicht waren, war der pT1-Anteil für statistische Analysen meist (zu) klein.

Zusätzlich wird die Vergleichbarkeit durch die Anwendung verschiedener Methoden noch verkompliziert. Weitere Probleme waren außerdem Beurteilungskriterien (Reproduzierbarkeit, Scoring-Systeme), Studiengröße, Endpunkte [disease-free survival (DFS), recurrence-free survival (RFS), overall survival (OS), progression-free survival (PFS), Progressionsraten, 5-Jahres-Überleben, etc.], die Populationen, das meist retrospektive Design der Studien, Antigen-Retrieval durch die Mikrowelle, die verwendeten Antikörper, statistische Probleme (multifaktorielle Analysen) und Unterschiede zwischen den genetischen Alterationen und den immunhistochemischen Ergebnissen. Auch die unterschiedliche Therapie nach Diagnose eines pT1-Tumors hat einen wesentlichen Einfluss auf das Outcome. Diese Therapie wiederum hängt vom jeweiligem Stand der Wissenschaft, örtlichen Gegebenheiten, dem Urologen sowie nicht zuletzt vom Patientenwunsch ab.

Mit dem Wissen um diese Probleme sollen nun die bisher veröffentlichten Artikel mit den Ergebnissen aus der vorliegenden Dissertation diskutiert werden:

4.2.2 Bedeutung von Deletionen / LOH auf dem Chromosom 8(p)

Mit LOH-Analysen konnten seit den frühen 1990er Jahren immer wieder Regionen auf dem Chromosom 8 detektiert werden, auf denen Tumorsuppressorgene vermutet wurden. Dazu wurden in einer Vielzahl von Arbeiten bis zu 30 LOH-Marker gleichzeitig untersucht. Bei der Literaturrecherche fällt auf, dass bei den meisten Arbeitsgruppen pT1G2/3-Tumoren nur einen kleinen Teil ausmachten. Nur bei wenigen Arbeiten kann die genaue Verteilung von Chromosom 8-Deletionen auf die einzelnen Stadien abgelesen werden. Deshalb und aufgrund der schlechten Vergleichbarkeit der Arbeiten sei auf eine tabellarische Darstellung verzichtet. Bis auf einige wenige Ausnahmen scheinen Deletionen auf dem Chromosom 8 mit höheren Blasenkarzinomstadien assoziiert zu sein (Knowles et al., 1993a und 2005) (Ohgaki et al., 1999) (Muscheck et al., 2000), beim Grading hingegen war keine Assoziation zu den Chromosom-8-LOHs zu erkennen (Erbersdobler et al., 2000) (Sengeløv et al., 2000) (Stöhr et al., 2004). Auch eine Assoziation mit einem Tumorrezidiv oder der Muskelinvasion ist nicht gesichert (Knowles, 1993b).

Als interessante Gebiete konnten in den Arbeiten immer wieder ähnliche, benachbarte Regionen eingegrenzt werden, die als Loci für Tumorsuppressorgene vermutet werden. Insbesondere die Region zwischen 8p11 und 8p22, vor allem aber 8p22 selbst scheinen viel versprechend.

Die in dieser Arbeit eingesetzten interpretierbaren vier Primer sind alle in der Arbeit von Stöhr et al. (2004) ebenfalls verwendet worden. Aus diesem Grund können die in der vorliegenden Arbeit gewonnenen Ergebnisse am besten mit denen von Stöhr et al. verglichen werden. Dort waren 9 von 10 getesteten Chromosom 8-Markern interpretierbar, in der vorliegenden Arbeit 4 von 7. Vermutlich deshalb konnte nur bei 14 von 72 Tumoren (19%) mindestens ein LOH pro Tumor detektiert werden; bei Stöhr et al. waren es 25 von 99 (25%), obwohl der hohe pTa-Anteil dort berücksichtigt werden muss. Damit haben sich die vier interpretierbaren Marker in der Anwendung bewährt und scheinen Regionen darzustellen, die häufiger von Deletionen betroffen sind, denn auch bei Stöhr et al. waren bei diesen 4 Markern häufiger LOHs zu finden als bei den übrigen. Im Besonderen schien der Marker D8S1145 in einer interessanten Region, nämlich auf 8p22 zu liegen, denn er zeigte in den beiden Arbeiten jeweils mit die meisten LOHs. Dies war auch schon in den älteren Arbeiten herausgearbeitet worden und bestärkt damit die Bedeutung von 8p22.

Weder beim Vergleich mit der Histopathologie noch mit anderen Markern und dem Outcome

ergaben sich statistisch signifikante Assoziationen. Allerdings sind Aussagen über den Einfluss von Veränderungen auf den untersuchten Chromosomenregionen auf das Rezidivverhalten oder die Progression von pT1-Tumoren aufgrund der relativ kleinen Probenzahl kaum möglich.

4.2.3 Bedeutung der p16-Deletion und Polysomie (der Chromosomen 3, 7 und 17)

Diese zwei Parameter p16-Deletion und Polysomie wurden in einem Kapitel zusammengefasst, da sie beide mit der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierungstechnik analysiert wurden. Viele Analysen in der Literatur zu diesen Themen wurden ebenfalls mit dieser Technik oder sogar dem gleichen Kit von UroVysionTM erarbeitet, so dass eine getrennte Diskussion weniger übersichtlich darzustellen wäre.

81,6% waren bezüglich Polysomie FISH-positiv, bezüglich p16-Deletion waren es 69,4%. Die p16-Deletionen waren dabei mit dem Grading positiv assoziiert, sonst konnten keine Assoziationen detektiert werden, auch nicht mit dem Outcome. Allerdings wiesen fast alle (14/15) Tumoren mit einer MIB-1-Überexpression (>25%) auch eine p16-Deletion auf ($p = 0,070$). Bei Markerkombinationen führte lediglich die Kombination von p16-Status mit dem p53-Status zu einem signifikanten Wert ($p = 0,0204$).

Leider sind die Ergebnisse der bisherigen Studien zur FISH-Analyse schwer vergleichbar, da sowohl die Auswertungskriterien als auch die Wahl der Zentromersonden nicht einheitlich waren. Neuhaus et al. (1999) und Yu et al. (2002) fanden keine Assoziation zwischen Polysomie und Prognose bzw. zur Histopathologie, Mian et al. (2006) dagegen fanden ein merklich kürzeres krankheitsspezifisches Überleben für Patienten mit Hochrisiko-Chromosomenmuster. Placer et al. (2005) und Krause et al. (2006) konnten übereinstimmend feststellen, dass pT1-Tumoren ähnliche multichromosomale Alterationen aufweisen wie muskelinvasive Tumoren.

Friedrich et al. (2001) konnten keine Assoziation zwischen rezidivfreiem Intervall und p16-IHC feststellen, Zellweger et al. (2006) dagegen fanden ein erhöhtes Rezidivrisiko. Bei Hitchings et al. (2004) wies p16 einen unabhängigen prognostischen Wert für die Progression auf.

Bei den Studien konnte selten auf die pT1-Subgruppe geschlossen werden. Außerdem wurden bei den meisten Studien Blasenspülflüssigkeiten oder Urin untersucht sowie andere Interpre-

tationsgrenzen gewählt, dennoch wurden in der Tendenz ähnliche Befunde detektiert: Auch bei unseren Daten zeigt sich eine hohe Frequenz von Polysomie, allerdings war dies nicht statistisch signifikant mit dem Grade assoziiert. Dabei bestätigen unsere Daten, dass weder die Kombination aus Polysomie und p16-Deletion noch die Parameter als Einzelwerte einen prädiktiven Wert für das Rezidiv aufweisen. Allerdings erreichte der p16-Status in Kombination mit dem p53-Alterationsstatus einen signifikanten Wert bezüglich des tumorspezifischen Gesamtüberlebens und bestärkte damit die Tendenz, dass p16-deletierte Tumoren mit schlechterem tumorspezifischem Überleben assoziiert zu sein scheinen.

Somit kann zwar die Rolle von Polysomie und vor allem von p16-Deletionen als Marker für tendenziell höhere Stadien bestätigt werden, jedoch kann eine relevante Aussagekraft höchstens in Kombination mit anderen Markern erreicht werden.

4.2.4 Bedeutung von FGFR3-Mutationen

Autoren, Jahr	pT1 mit FGFR3-Mutationen	
Billerey et al., 2001	4/19	21%
Bakkar et al., 2003	9/30	30%
van Rhijn et al., 2004	17/55	31,%
Jebar et al., 2005	14/23	61%
Zieger et al., 2005	13/35	37%
Lamy et al., 2006	26/35	74%
Mhaweck-Fauceglia et al., 2006	69/147	47%
Hernández et al., 2006	27/145	19%
van Oers et al., 2007	9/38	24%
diese Arbeit	27/68	39,7%

Tab. 32: Literaturdaten für FGFR3-Mutationen bei pT1-Urothelkarzinomen der Harnblase

Der bei uns gefundene Prozentsatz von 39,7% bei pT1-Tumoren liegt im Mittelfeld der bisherigen Veröffentlichungen (17% bis 74%), wobei sich die niedrigeren Prozentsätze vor allem bei Studien zum fortgeschritteneren Stadium pT1G3 zeigten. Auch bei unseren pT1-Daten waren bei den G3-Stadien seltener FGFR3-Mutationen zu finden als bei den G2-Stadien (31,3% bei G3 bzw. 60,0% bei G2). Außerdem waren FGFR3-Mutationen insgesamt signifikant häufiger in Tumoren mit besserer Histopathologie (G2, kein Begleit-CIS, unifokal, papil-

läres Wachstumsmuster) vertreten, so dass sich diese Ergebnisse gut in die bisherigen Erkenntnisse einreihen lassen: Billerey et al. (2001), Bakkar et al. (2003), van Rhijn et al. (2004) oder Mhawech-Fauceglia et al. (2006) fanden Assoziationen zwischen FGFR3-Mutationen und Low-Grade- und Low-Stage-Tumoren. Die gefundene Häufigkeitsverteilung der einzelnen FGFR3-Mutationen deckt sich gut mit denen, die für pT1-Tumoren bekannt sind. So war bei Jebar et al. (2005) ebenfalls die Mutation S249C mit 69% am häufigsten vertreten, danach folgten die Mutationen Y375C mit 12,7% und R248C mit 10,9% (unsere Daten: S249C 60,7%; Y375C 7,1%; R248C 17,9%).

Immer wieder wurden Hinweise gefunden, die das Modell der Entwicklung des Harnblasenkarzinoms über zwei unterschiedliche molekulargenetische Pathways unterstützen, nämlich über CIS mit p53-Alterationen zu invasiven Tumoren oder über FGFR3-Mutationen, die häufiger in pTa-Tumoren gefunden werden und ein gutes Outcome indizieren sollen. Dabei waren CIS und FGFR3-Mutation zwei (fast) exklusive Ereignisse. pT1-Tumoren scheinen eine Ausnahme darzustellen, wo sich jene diskutierten Pathways kreuzen (Hernández et al., 2005) (van Rhijn et al., 2004) und bringen daher widersprüchliche Resultate hervor: Während sich bei van Rhijn et al. (2003) die Kombination aus FGFR3 und MIB-1 in multivariaten Analysen mit Rezidivrate, Progression und krankheitsfreiem Überleben als statistisch unabhängig erwies und dabei das molekulare Grading reproduzierbarer war als das pathologische Grading, konnten bei Zieger et al. (2005) FGFR3-Mutationen die Progression nicht beeinflussen und die Rezidivrate war im Gegensatz zu van Rhijn statistisch signifikant höher bei Tumoren mit FGFR3-Mutation. Lamy et al. (2006) fanden bei pTa- und pT1-Tumoren keinen Zusammenhang mit dem Tumorrezidiv; interessanterweise waren jedoch bei G2-Tumoren eine höhere FGFR3- und eine niedrigere TP53-Mutationsfrequenz zu finden als in G1-Tumoren. Ferner ähneln in ihrer Arbeit T1-Tumoren den T2-Tumoren auf molekularer Ebene und könnten dadurch die fehlende Assoziation zwischen FGFR3/TP53-Status in Bezug auf das Rezidiv erklären. Lokeshwar (2006) diskutiert die sich daraus ergebenden Fragen und vermutet, dass andere genetische Veränderungen in G2-Tumoren, welche zu einer schlechten Prognose beitragen, den protektiven Effekt von mut-FGFR3/TP53-wt bezüglich Tumorrezidiven aufheben. Das könnte ihrer Meinung nach auch die Ergebnisse von Hernández et al. (2005) erklären, die bei pT1G3-Tumoren weder eine gegenseitige Exklusivität von FGFR3- und TP53-Mutationen noch eine Assoziation zwischen FGFR3- und TP53-Status eruieren konnten und deshalb postulieren, dass pT1G3-Tumoren mehr molekulare Veränderungen als Low-Grade-Tumoren aufweisen würden und deshalb die gute Prognose, die mit FGFR3-

Mutationen assoziiert ist, nicht mehr beobachtet werden könne. Die Studie von Lamy et al. reflektiere, dass es – obwohl das Modell für die Entstehung und Progression des Blasenkarzinoms über zwei divergente Pathways sehr reizvoll ist – eine Überlappung und/oder Überschneidung zwischen jenen zwei diskutierten Pathways gibt. Da klinische Low-Grade-/Low-Stage-Tumoren fortschreiten können, aber High-Grade-Tumoren keinen Rückschritt hin zu Low-Grade-Tumoren vollziehen, geschieht die Überkreuzung der beiden Pathways, sobald Low-Grade-Tumoren (mit einer FGFR3-Mutation, die eine gute Prognose repräsentiert) invasiv werden, indem sich eine TP53-Mutation und/oder andere Alterationen ereignen.

Mit der vorliegenden Arbeit können wir die Daten von Zieger et al. am ehesten bestätigen, denn in unseren Daten hatten bei den pT1-Tumoren FGFR3-Mutationen ebenfalls keinen signifikanten Einfluss auf das tumorspezifische Überleben, und gleichzeitig wiesen Patienten mit FGFR3-Mutation ein fast signifikant kürzeres rezidivfreies Überleben auf. pT1-Tumoren mit FGFR3-Mutationen weisen daher wahrscheinlich *nicht a priori* eine gute Prognose auf.

Außerdem konnte eine wechselseitige Exklusivität von FGFR3-Mutationen und Begleit-CIS sowie die negative Assoziation zwischen FGFR3-Mutationen und TP53-Mutationen nicht bestätigt werden. Jedoch war im Gegensatz zu der Veröffentlichung von van Rhijn (2003) die Kombination FGFR3/Ki-67 kein unabhängiger Prädiktor für das tumorspezifische Überleben oder das Rezidivverhalten, obwohl beide Marker signifikant miteinander assoziiert waren ($p = 0,001$).

Obwohl FGFR3-Mutationen mit günstigerer Histopathologie assoziiert sind, scheinen sie sich *nicht a priori* positiv auf das Überleben und sogar gegenteilig auf das rezidivfreie Intervall auszuwirken. Welche zusätzlichen Faktoren den Einfluss von FGFR3-Mutationen bei pT1-Tumoren außer Kraft setzen bzw. vielleicht sogar vekehren, bleibt zu klären.

4.2.5 Bedeutung von Mutationen auf den Exons 5 bis 8 des TP53-Gens

Bei unserem pT1-Tumorkollektiv konnten 12 Mutationen bei 11 Tumoren von 71 Patienten gefunden werden. Der Prozentsatz von 15,5% ist etwas niedriger als in anderen Studien (0% bis 58%). Dort wurden manchmal außer den Exons 5 bis 8 noch benachbarte Exons sequenziert, andere Methoden verwendet bzw. bei Hernández et al. nur pT1G3-Tumoren (TP53-Mutationen bei unseren Daten: 25%) evaluiert. Dennoch erklären diese Faktoren die geringere Zahl an Mutationen nicht ausreichend. Mutationen in nicht sequenzierten Exons oder in den

Basenpaaren, die bei manchen Exons fehlten, sowie Mutationen, die sich bei der Wiederholung nicht verifizieren ließen, wären mögliche Erklärungen.

Autoren, Jahr (Exons/Methode/n)	pT1 mit TP53-Mutation(en)	
Fujimoto et al., 1992 (Exons 4-11)	0/5	0,0%
Uchida et al., 1995 (RFLP + PCR)	3/13	23,1%
Pfister et al., 1999a (p53-Hefe-Assay)	8/24	33,3%
Friedrich et al., 2001 (Exons 5-8)	8/22	36,4%
Bakkar et al., 2003 (Exons 2-11)	7/30	23,3%
Lorenzo-Romero et al., 2004 (Exons 5-9)	10/23	43,5%
Hernández et al., 2005 (Exons 4-9, nur pT1G3)	69/119	58,0%
diese Arbeit	11/71	15,5%

Tab. 33: Literaturdaten für TP53-Mutationen bei pT1-Urothelkarzinomen der Harnblase

Bei uns wurden 11 Missense-Mutationen sowie eine Leserasterverschiebung gefunden. Diese Verteilung deckt sich gut mit den Ergebnissen der p53-Datenbank (Abb. 28). Der FGFR3-Status war dabei unabhängig von TP53-Mutationen (und bis auf eine Ausnahme auch exklusiv) und den immunhistochemischen Färbungen von p53 und MIB-1 sowie von der Kombination TP53-Mutationsstatus/p53-IHC.

In einer Vielzahl von Veröffentlichungen konnte eine Assoziation von TP53-Mutationen mit höherem Staging und Grade detektiert werden (Fujimoto et al., 1992) (Esrig et al., 1993) (Bakkar et al., 2003) (Lorenzo-Romero et al., 2004). Diese Tendenz war aus unseren Daten ebenfalls zu erkennen, auch wenn der Wert nicht signifikant war ($p = 0,156$ für das Grading). Viele Arbeiten deuten darauf hin, dass TP53-Mutationen mit einer schlechteren Prognose (invasivere Tumoren, kürzeres Überleben) verbunden ist (Uchida et al., 1995) (Zieger et al., 2005), aber keinen Einfluss auf das rezidivfreie Überleben haben (Friedrich et al., 2001). Letzteres kann mit den vorliegenden Daten ebenfalls bestätigt werden; beim tumorspezifischen Gesamtüberleben konnte dagegen kein signifikanter Einfluss festgestellt werden. Allerdings erreichte beim tumorspezifischen Überleben die Kombination aus p53-IHC und TP53-Mutationanalyse signifikante Werte. Dabei erkannte man aber überraschenderweise ein signifikant längeres tumorspezifisches Überleben bei Patienten mit p53-Alterationen als bei solchen ohne, eine Tendenz, die sich augenscheinlich in den Kaplan-Meier-Kurven (nicht dargestellt) schon bei TP53-Mutationen und der p53-IHC allein abzeichnete und sich damit verfestigte. Diese Befunde liefern eine den bisherigen Erkenntnissen diametral entgegengesetzte

Aussage. Bisher konnte eine gute Prognose für Tumoren mit TP53-Mutation nur in einzelnen Studien zu anderen Tumoren (Cerebrum, Ösophagus, Ovarien, Pankreas und Magen) nachgewiesen werden. Mögliche Deutungen sind unter dem Kapitel 4.2.6.2 ausgeführt.

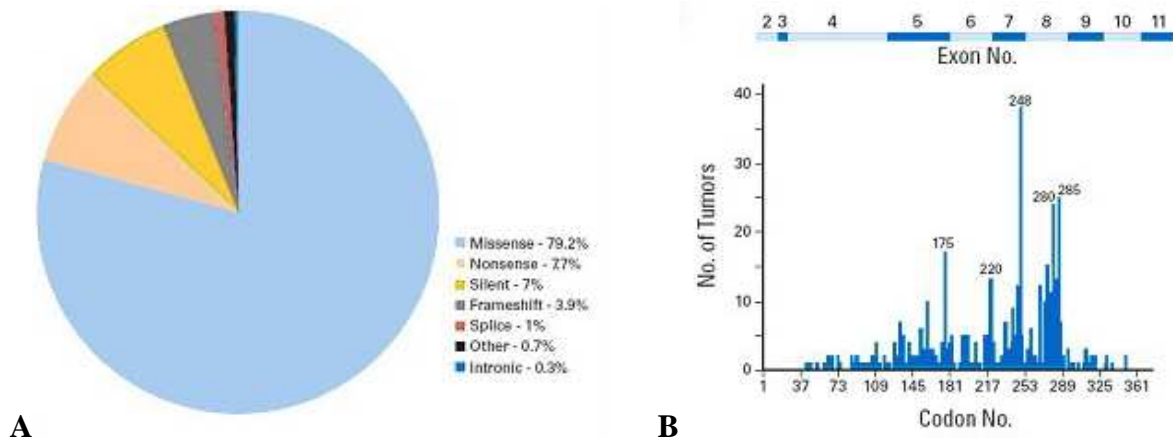


Abb. 28: TP53-Mutationen in Urothelkarzinomen der Blase (International Agency for Research on Cancer Database, online im Internet: URL: <http://www-p53.iarc.fr/statistics.html> - Stand 12.11.2007) (Olivier et al., 2002)

(A) Verteilung der Mutationen entsprechend ihres Effekts

(B) Verteilung der einzelnen Basensubstitutionen entsprechend der Codons und Exons

Die Erkenntnis, ob die p53-Überexpression mit höherem Grade und Stage sowie ungünstigerem Outcome assoziiert ist, wurde zwar in Studien mit inzwischen mehr als 10.000 Blasenkarzinomen untersucht (Real, 2007), dennoch sind die Erkenntnisse nicht ausreichend, um die Rolle von p53-Veränderungen festzulegen (Malats et al., 2005). In den TP53-Datenbanken sind Sequenzinformationen von hingegen nur ca. 1.200 Blasentumoren (Stand 2007) gespeichert, wiederum ohne einen klaren Beweis für eine Assoziation mit dem Outcome. George et al. (2007) untersuchten beides: die immunhistochemische Darstellung von p53 und die TP53-Mutationsanalyse. Dabei wurden mit einem speziell designten Chip *alle* kodierenden Exons abgefragt. Zwei Erkenntnisse waren zu konstatieren:

1. Wie in anderen Studien (Kelsey et al., 2004) (López-Knowles et al., 2006) war die Übereinstimmung beider Analysen nur mäßig. Diese Erkenntnis war aber besonders interessant, da die gesamte kodierende Sequenz von TP53 analysiert wurde. Neu waren folgende Beobachtungen: Tumoren mit einer Exon 5-Mutation zeigten im Gegensatz zu den übrigen TP53 mutierten Tumoren häufiger eine normale p53-Färbung. Exon 5-Mutationen waren außerdem häufiger in auf die Blase begrenzten Tumoren.

Ein Vergleich unserer Mutationen ist aufgrund der geringen Fallzahl allerdings nicht sinnvoll.

2. In Bezug zum Outcome hatten Patienten mit abnormen Befunden in beiden Assays die schlechteste Prognose, die mit normalen Befunden in beiden Assays die beste Prognose, und

die mit einem abnormen und einem normalen Befund hatten eine intermediäre Wahrscheinlichkeit bezüglich eines Rezidivs und bezüglich des Überlebens. Deshalb sollten beide Untersuchungen durchgeführt werden, um durch die synergistischen Informationen eine bessere Prognose für Patienten mit fortgeschrittenen Blasenkarzinomen zu etablieren.

Diese Synergie kann aus den vorliegenden Daten bestätigt werden, allerdings war diese nicht auf additiven Effekten beruhend, sondern darauf, dass sich TP53-Sequenzierung und p53-Immunhistochemie ergänzen.

Die Synergie aus Berücksichtigung von TP53-Mutationen gemeinsam mit der p53-Überexpression konnte eindrucksvoll in unserer Arbeit bestätigt werden. Dazu wurde der Parameter p53-Kombination (ja/nein) geschaffen, der als p53-alteriert definiert wurde, falls entweder die p53-IHC positiv war und/oder eine Mutation in den Exons 5 bis 8 des TP53-Gens vorlag. Bei der Assoziation dieses Parameters mit anderen Markern und dem Outcome wurden die Ergebnisse der p53-IHC und der Mutationsanalyse auf den Exons 5 bis 8 zum Teil deutlich unterboten. Die p53-IHC lag dabei näher an den Ergebnissen des Kombinationsparameters als die Mutationsanalyse der Exons 5 bis 8. Mithilfe dieser synergistischen Kombination konnten so mehrere signifikante Assoziationen festgestellt werden. Die IHC-Grenze $\geq 10\%$ lieferte dabei meist bessere Ergebnisse als die $>10\%$ -Grenze, war also spezifischer in der Aussage. p53-Alterationen waren wie in fast allen Studien mit höherem Grading assoziiert. Bezüglich der Aussage zum Outcome wurde jedoch das Gegenteilige von George et al. und auch den früheren Arbeiten festgestellt: Patienten mit p53-Alterationen lebten signifikant tumorspezifisch länger als solche ohne, bezüglich des rezidivfreien Überlebens war der Wert nicht signifikant, zeigte in Tendenz jedoch ebenfalls ein längeres rezidivfreies Überleben bei Patienten mit p53-Alteration an. Auf dieses paradoxe Ergebnis wird genauer im Kapitel 4.2.6.2 eingegangen.

Die Verteilung auf die einzelnen Exons und Codons war bei unseren Daten ohne ein bestimmtes Muster, wie aus den in den TP53-Datenbanken gefundenen Verteilungen zu erwarten war (s. Abb. 28B). Assoziationsberechnungen von bestimmten Mutationen mit dem rezidivfreien oder tumorspezifischen Überleben sind aufgrund der uneinheitlichen Verteilung auf die Exons und Codons nicht durchgeführt worden.

Bei unseren Daten war die immunhistochemische Akkumulation von p53 mit den Ergebnissen aus der Mutationsanalyse der Exons 5 bis 8 nicht assoziiert, wofür es folgende Gründe gibt:

Die gefundenen Mutationen haben wahrscheinlich nicht alle Einfluss auf die Faltung und Funktion des Proteins, womit sich auch erklären ließe, warum die immunhistochemische

Darstellung von p53 besser mit dem Outcome assoziiert ist als die Mutationsanalyse der Exons 5 bis 8. Die IHC zeigt alle Veränderungen an, die zu einer Akkumulation von p53 führen, also beispielsweise auch Mutationen auf Exons, die außerhalb der für diese Dissertation gewählten Exons 5 bis 8 liegen. Allerdings konnten Hartmann et al. (1995) außerhalb der Exons 5 bis 8 keine Missense-Mutationen finden, dagegen meist Leserasterverschiebungs- und Nonsense-Mutationen. Auch die Überexpression des Wildtypproteins als Reaktion auf genotoxische Einflüsse kann ein Grund sein. Veränderte p53-Proteinexpressionen bei dem Vorhandensein eines Wildtyp-p53 könnten auch durch andere Veränderungen hervorgerufen sein, z. B. durch Veränderungen im regulatorischen p14/MDM2-Signalweg (Mitra et al., 2006). Umgekehrt können Fälle, in denen die Immunhistochemie von p53 negativ war, aber eine Mutation in den Exons 5 bis 8 gefunden wurde, damit begründet werden, dass entweder die Mutation keinen Einfluss auf die Faltung und Funktion des Proteins hatte (Tumor Nr. 63: hydrophile Aminosäure gegen andere hydrophile ersetzt: Arginin gegen Histidin) oder im anderen Extrem so gravierend war, dass p53 gar nicht erst produziert wurde (Tumor Nr. 10: Tausch einer Base bewirkt Stopp statt Cystein, analog bei Tumor Nr. 54: dort Stopp statt Serin, Tumor Nr. 72: Leserasterverschiebung). In unseren Daten konnte so mit den durchgeführten Untersuchungen zwar bei 10 Tumoren eine molekulargenetische Begründung für die IHC in den Mutationen gefunden werden, bei 24 Tumoren (70,6%) mit p53-Überexpression ($\geq 10\%$) bleibt die Ursache für die Überexpression aber unklar. Damit bleibt aber die Ursache für den Großteil der p53-Überexpressionen unbefriedigend.

Eine Tumor-Klassifizierung in TP53-Wildtyp und TP53-Mutant wäre somit auch eine viel zu starke Vereinfachung (Soussi, 2007): Vielleicht haben TP53-Mutationen *per se* keine wirkliche Bedeutung, da jeder TP53-Mutant ein andersartiges Protein mit unterschiedlichem Verhalten repräsentiert. Dabei ist diese Heterogenität der TP53-Mutationen gleichzeitig ein Anlass für gründlichere Analysen in Bezug auf die Biologie und die klinische Relevanz der Mutationen. Hier eröffnet sich ein interessantes Feld für weitere Forschungen.

Besonders bei TP53- und FGFR3-Mutationen gibt es interessante zusätzliche Erkenntnisse. So untersuchten Wallerand et al. (2005) den Unterschied zwischen Rauchen und den zwei genannten Mutationen bei 110 Patienten. Ihre Resultate deuten darauf hin, dass Rauchen beim initialen Erscheinen mit invasiveren und High-Grade-Tumoren assoziiert ist und auf TP53 oder dessen molekularen Signalweg, der durch diese Mutationen definiert ist, einwirkt. Im Gegensatz dazu waren FGFR3-Mutationen vom Rauchen unbeeinflusst und resultieren wahr-

scheinlich von endogenen Alterationen her. Diese Daten sind ein Beitrag zum Einfluss von endogenen zu exogenen Karzinogenen.

4.2.6 Bedeutung der Immunhistochemie

Zu Anfang dieses Kapitels sei darauf hingewiesen, dass sich besonders in diesem Unterkapitel manche widersprechenden Ergebnisse der immunhistochemischen Färbungen in vorherigen Studien oder auch im Vergleich der vorliegenden Arbeit mit älteren Studien, mit Unterschieden in der Effizienz und Interpretation der Färbungen erklären lassen. Deshalb ist auf eine tabellarische Darstellung der Studienergebnisse der bisherigen immunhistochemischen Färbungen verzichtet worden.

4.2.6.1 Diskussion der Ergebnisse von CK20

CK20 war in dem pT1-Tumorkollektiv erwartungsgemäß selten normal exprimiert (2 von 65 Tumoren). Aufgrund der geringen Zahl von zwei Tumoren mit normaler Expression erübrigte sich ein Vergleich der CK20-Ergebnisse mit der Histopathologie, den anderen Markern oder dem Outcome der Patienten.

Bei den Studien zu CK20 gibt es aufgrund unterschiedlicher Grenzen einige Widersprüche, dennoch scheint vor allem nach neueren Studien von 2007 eine normale CK20-Expression zusammen mit FGFR3-Mutationen niedrigere Stufen der Urotheltumoren zu definieren (van Oers et al.), aber keinen Einfluss auf das Überleben der Tumorpatienten zu haben, was Burger et al. (2007) bestätigen. Bei Southgate et al. (1999) war ein normales CK20-Expressionsmuster prädiktiv für ein Nicht-Rezidiv, San Miguel Fraile et al. (2003) fanden keine signifikante Assoziation zur Rezidivrate. Besonders in der nicht-invasiven Detektion von malignen Blasenläsionen kann CK20 hilfreich sein (Rotem et al., 2000) (Siracusano et al., 2005), kann aber bei fortgeschritteneren Tumoren auch negativ ausfallen, weshalb man sich nicht auf die Detektion von CK20 im Urin verlassen sollte (Desai et al., 2000).

Da ein normales Färbeverhalten in dem vorselektierten pT1-Kollektiv erwartungsgemäß selten auftrat (zwei Fälle von 65, 3,1%), beide aber eine FGFR3-Mutation aufwiesen, müssen die zwei gefundenen Fälle (ein G2, ein G3) als Ausnahme von der Regel gelten und sind wohl

nach van Oers et al. (und der neuen WHO-Klassifikation von 2004) als einzige nicht als high-grade, sondern als low-grade PUC zu betiteln. Diese beiden zeigten im Vergleich zu den restlichen Tumoren (die demnach alle high-grade waren) zwar ein besseres Markermuster (kein CIS, unifokal, kein LOH, p53-IHC negativ, keine TP53-Mutation der Exons 5 bis 8, relativ niedrige MIB-Expression), aber aufgrund der zu kleinen Zahl von zwei Fällen erübrigt sich ein Vergleich mit dem Outcome. Dennoch lässt sich dieser Befund gut in die bisherigen Veröffentlichungen einreihen, v. a. in die von van Oers et al. (dort einer von 45 pT1-Tumoren mit normalem CK20-Expressionsmuster).

Zusammenfassend kann die prädiktive Bedeutung von CK20 bei pT1-Tumoren vernachlässigt werden, es sei denn es ist normal exprimiert. Dann zeigt es wahrscheinlich ein positives Outcome an.

4.2.6.2 Diskussion der Ergebnisse von p53

Bei unserem pT1-Kollektiv waren 39,4% bzw. 45,1% p53-positiv (>10% bzw. $\geq 10\%$ als Grenze), was im Mittelfeld der bisherigen Daten liegt. Die statistische Auswertung zeigte keine signifikante Assoziation zwischen dem Grading und positiver p53-Expression. Allerdings zeigten Tumoren mit einem Begleit-CIS signifikant häufiger eine Überexpression als diejenigen Tumoren ohne; zudem war p53 öfter in soliden als in papillären Tumoren überexprimiert. Interessanterweise war hierbei die Kombination aus p53-IHC und TP53-Sequenzierung der Exons 5 bis 8 der alleinigen p53-IHC unterlegen, während die TP53-Sequenzierung der Exons 5 bis 8 erwartungsgemäß sowohl der Kombination beider Methoden als auch der p53-IHC allein unterlegen war. Alle p53-Alterationen (egal ob IHC, Sequenzierung oder Kombination aus beiden) waren dabei signifikant negativ mit einer FGFR3-Mutation und einer niedrigen ($\leq 25\%$) MIB-1-Expression assoziiert, was auf die Unabhängigkeit dieser drei Parameter hinweist. Eine Exklusivität dieser Parameter konnte allerdings nicht nachgewiesen werden: Es fanden sich 12 Tumoren mit gleichzeitiger p53-Positivität und FGFR3-Mutationen.

Die Synergie von p53-IHC und TP53-Mutationsanalyse der Exons 5 bis 8 ist bereits im Kapitel 4.2.5 angesprochen worden. Dort ist auch auf die nur teilweise geklärten Zusammenhänge zwischen Genmutation und IHC hingewiesen.

Die p53-IHC ($\geq 10\%$) und vor allem irgendeine p53-Alteration waren allein, aber auch in Kombination mit MIB-1 oder dem p16-Status signifikant mit dem tumorspezifischen Überleben assoziiert. Beim rezidivfreien Überleben zeigten p53-Alterationen die Tendenz, mit einem längeren rezidivfreien Überleben assoziiert zu sein, erreichten jedoch nur in Kombination mit dem FGFR3-Status einen signifikanten Wert, wobei der p53-Beitrag dafür unbedeutend war und p53-Alterationen wohl eher das tumorspezifische Überleben beeinflussen denn das rezidivfreie Überleben.

Besonders bei der IHC von p53 sind die unterschiedlichen Antikörper, Auswertkriterien und Cut-off-Werte Faktoren, die einen Vergleich der Studien sehr erschweren. In einem Review über die Bedeutung von p53 bei Harnblasenkarzinomen von 2005 veröffentlichten Malats et al. eine Metaanalyse von 168 Publikationen aus 117 Studien mit mehr als 10.000 Blasentumoren. 27% der Studien zeigten eine Signifikanz zwischen positiver Expression von p53 und Rezidivrate, 50% zeigten eine Signifikanz für die Progression und 29% für die Letalität. Dabei müssen die Autoren feststellen, dass nach über 10 Jahren Forschung über p53 keine ausreichende Evidenz darüber besteht, ob p53 als Marker für die Prognose des Harnblasenkarzinoms verwendet werden kann.

Speziell zu pT1-Tumoren gibt es wenige Studien, die aber in der Mehrzahl p53 eine prognostische Bedeutung beimessen. Besonders einig sind sich die Autoren, dass p53 progressive Tumoren anzeigt (Sarkis et al., 2003) (Esrig et al., 1994) (Grossman et al., 1998) (Toktaş et al., 1999) (Llopis et al., 2000) (Wolf et al., 2001) (Kilicli-Camur et al., 2002) (Lopez-Beltran et al., 2004) (Queipo Zaragoza et al., 2005), lediglich in Studien vor dem Jahr 2000 wird dem Grading eine Überlegenheit gegenüber p53 zugesprochen (Thomas et al., 1994) (Pfister et al., 1999b) oder gar keine Assoziation (Gardiner et al., 1994) (Vatne et al., 1995). Dabei gehen nur wenige Autoren so weit, dass sie für p53-positive Tumoren eine aggressivere Therapie empfehlen (Grossmann et al., 1998) (Toktaş et al., 1999). Masters et al. (2003) halten weder die Sensitivität noch die Spezifität von p53 als ausreichend für eine Zystektomieempfehlung beim einzelnen Patienten. Interessant ist noch die Beobachtung von Rodríguez-Alonso et al. (2003), die einen Dosis-Wirkungseffekt zeigten: je größer die Expression von p53, desto größer das Progressionsrisiko. In einer der wenigen prospektiven Arbeiten erwies sich bei Dalbagni et al. (2007) die p53-IHC als kein nützlicher Prognosemarker bei pT1-Tumoren.

Die Anzahl der Studien, die p53 eine Assoziation mit Rezidiven zugestehen, ist geringer (Toktaş et al., 1999) (Kilicli-Camur et al., 2002). Moch et al. (1994) deuten an, dass erhöhte Proliferation bei p53-positiven pT1-Tumoren durch zusätzliche Alterationen, die sich wäh-

rend der Tumorprogression ereignen, verursacht wird. Da in Kombination von p53 mit dem FGFR3-Status das rezidivfreie Überleben nur minimal besser war als der FGFR3-Status allein, kann mit den vorliegenden Berechnungen in Einklang mit Stavropoulos et al. (2002) geschlossen werden, dass p53 keine zusätzliche prognostische Information bezüglich des Rezidivs anzubieten scheint.

Sowohl beim rezidivfreien Überleben als auch beim tumorspezifischen Gesamtüberleben zeigten die erarbeiteten Daten überraschenderweise den bisherigen Veröffentlichungen entgegengesetzte Resultate: p53-Alterationen (Mutation oder positive Immunhistochemie) waren mit längerem rezidivfreiem (tendenziell) und tumorspezifischem Überleben assoziiert. Beim tumorspezifischen Überleben gab es nur vier tumorspezifische Todesfälle zu verzeichnen, weshalb hier die geringe Zahl via Zufall zu den paradoxen Ergebnissen führen könnte. Die Resultate des rezidivfreien Überlebens aufgrund von 25 Rezidivfällen bestätigen jedoch diese paradoxe Tendenz. Die in den anderen Studien gefundenen Assoziationen von p53 mit prognostisch ungünstiger Histopathologie konnten dagegen verifiziert werden. Die scheinbar paradoxen Ergebnisse bezüglich des Outcomes bedürfen einer Überprüfung in anderen Studien und hinterfragen bei pT1-Tumoren die Bedeutung von p53.

Aufgrund ihres Reviews zu p53-Akkumulation und Prognose forderten Schmitz-Dräger et al. schon 2000 eine Standardisierung der Assay-Procedure und der Probenbeurteilung sowie prospektive Multicenterstudien. Ihrer Meinung nach würden weitere retrospektive Untersuchungen zu p53 nicht zur Problemlösung beitragen und seien deshalb obsolet.

So muss nach vielen Jahren Forschung über p53 mit Soussi (2007) konstatiert werden: „p53 alterations in human cancer: more questions than answers.“ Der Autor argumentiert dabei, dass p53 nur *eine* Komponente des gigantischen Überwachungsnetzwerkes ist, dessen Effizienz durch viele andere Elemente zusätzlich moduliert wird.

4.2.6.3 Diskussion der Ergebnisse von MIB-1

Zu Anfang dieses Kapitels sei nochmals darauf hingewiesen, dass in manchen, vor allem älteren Literaturangaben der Begriff Ki-67 (oder ki-67, ki67) anstatt von MIB-1 (oder MIB) verwendet wird, was auf zwei unterschiedlichen Antikörpern beruht, die allerdings dasselbe nukleäre Antigen markieren (Cattoretti et al., 1992). Dass eine statistische Korrelation zwischen Ki-67 und MIB-1 gefärbten Präparaten besteht, wurde 1994 von Mazerolles et al. be-

wiesen. Inzwischen wird meistens nur noch der Antikörper MIB-1 verwendet, da dieser auch bei in Paraffin eingebettetem Material Verwendung finden kann.

Die Ergebnisse der Färbung mit MIB-1 zeigen eine Überexpression in 42,0% (>25%) bzw. in 63,8% (>10%). Das liegt im Rahmen der bisher gefundenen Literaturwerte, wobei auf die in Kapitel 4.2.1 angesprochene Problematik hingewiesen sei. MIB-1 war in der vorliegenden Arbeit mit FGFR3 und p53 statistisch signifikant assoziiert, was seine Entsprechung in der wissenschaftlichen Literatur ebenfalls findet (van Oers et al., 2007). Dabei erwies sich insgesamt die 25%-Grenze spezifischer als die 10%-Grenze. Bei Tumoren in Stadium pT1 sollten deshalb Tumoren mit einer Expression von >25% als pathologisch betrachtet werden.

Eine Überexpression (>25%) war stark mit einer ungünstigen Histopathologie assoziiert. Diese Erkenntnis steht hervorragend mit den bisherigen Veröffentlichungen im Einklang (Moch et al., 1994) (Liukkonen et al., 1996) (van Rhijn et al., 2003) (van Oers et al., 2007), die MIB-1 alle eine signifikante Assoziation mit dem Grading und dem Stage bescheinigen.

Die Überexpression von MIB-1 scheint sich tendenziell negativ auf das tumorspezifische Gesamtüberleben, aber eher positiv auf das rezidivfreie Überleben auszuwirken. Das könnte damit erklärt werden, dass die meisten Patienten mit MIB-1 überexprimierenden Tumoren versterben, bevor sie das Rezidiv erleben. Dafür spricht auch der Sachverhalt, dass MIB-1 in Kombination mit p53 im Gegensatz zu p53 allein das Gesamtüberleben signifikant vorhersagte, jedoch beim rezidivfreien Überleben von Nachteil ist: Durch das Weglassen von MIB-1 bei der Testung von Markerkombinationen an Kaplan-Meier-Kurven für das rezidivfreie Überleben wurden mit FGFR3- und p53-Status allein bessere Ergebnisse erzielt als mit der Dreier-Kombination MIB-1/FGFR3/p53. MIB-1 scheint damit zwar in Kombination mit dem p53-Status ein hervorragender Prädiktor für das tumorspezifische Gesamtüberleben zu sein, jedoch insuffizient für das rezidivfreie Überleben (MIB-1 scheint damit besonders bei aggressiven pT1-Tumoren überexprimiert zu sein).

Damit können die vorliegenden Daten jene von Liukkonen et al. (1999), Oosterhuis et al. (2000), Quintero et al. (2006) und Stavropoulos et al. (2002), bei denen MIB-1 statistisch signifikant das rezidivfreie Überleben vorhersagte, nicht bestätigen. Diese Studien mit "oberflächlichen" Tumoren beinhalteten aber wesentlich mehr pTa- als pT1-Tumoren. Dies bestärkt den Sachverhalt, dass es sich bei pT1-Tumoren um eine Entität handelt, deren molekulare Veränderungen sich doch erheblich von denen der pTa-Tumoren unterscheiden. Bei pTa-Tumoren könnte eine MIB-1-Expression noch eher das Rezidivverhalten vorhersagen, da die-

se Entität weniger aggressiv ist und Patienten somit eher ein Rezidiv erleben. Auch Queipo Zaragoza et al. (2005), die nur pT1G3-Patienten untersuchten, schreiben der immunhistochemischen Bestimmung von Ki-67 keinen prädiktiven Wert für die Progression zu. Der Cut-off-Wert bei dieser Studie war mit 40% höher, bestätigt aber tendenziell die vorliegenden Ergebnisse. Dass MIB-1 vor allem in progressiveren Tumoren überexprimiert ist bzw. die Progression besser vorhersagt, findet sich bei Pfister et al. (1998), Liukkonen et al. (1999), Lopez-Beltran et al. (2004) und Quintero et al. (2006).

Beim Marker MIB-1 fehlen leider ebenso wie bei der Anwendung von CK20 oder p53 eine Standardisierung der technischen Durchführung sowie Richtlinien zur Auswertung der Resultate. Besonders bei diesem Marker beziehen sich viele Veröffentlichungen auf „oberflächliche“ Urothelkarzinome (pTa und pT1), obwohl dies inzwischen obsolet ist, da man um die Unterschiede dieser beiden Entitäten weiß. Speziell Aussagen für pT1-Tumoren zu treffen wäre mit den jeweiligen Rohdaten sicher möglich, aber aus den Veröffentlichungen ist dies oft nur schwerlich durchführbar. Zwar sind bedeutend weniger pT1- als pTa-Stadien in den Publikationen eingeschlossen worden, dennoch würden sich trotz der niedrigeren Tumorzahl bessere Aussagen für den Grenzfall pT1 ergeben. Interessant ist das Ergebnis von Pfister et al. (1998), die wie die meisten anderen Autoren auch eine Assoziation zwischen der MIB-1-Expression und der Histopathologie feststellen konnten, aber außerdem zwar einen signifikanten Unterschied zwischen pT0 und pTa, pTa und pT1, pTa und pT2, jedoch nicht zwischen pT1 und pT2 demonstrieren konnten. Das verdeutlicht, dass pT1-Tumoren nicht mit pTa-Tumoren als eine gemeinsame Entität („oberflächliche“ Tumoren) betrachtet werden sollten und pT1-Tumoren die Bezeichnung „invasiv“ seit der neuen WHO-Klassifikation 2004 zurecht mit den Tumoren \geq pT2 teilen.

Insgesamt kann in Tendenz die Rolle von MIB-1 als Prognosemarker für das tumorspezifische Überleben bestärkt werden, wobei signifikante Werte allein in Kombination mit p53 erreicht werden. Für das rezidivfreie Überleben von pT1-Tumoren bedarf es aufgrund der sich widersprechenden Resultate weiterer Studien, da es bisher (fast) immer gemeinsam mit pTa-Tumoren untersucht worden ist. Dennoch kann das Ergebnis der vorliegenden Arbeit die Funktion von MIB-1 als Marker für aggressive pT1-Tumoren stützen.

4.2.7 Bedeutung von Markerkombinationen/molekularem Grading

Für das tumorspezifische Gesamtüberleben konnte mit der Zweier-Kombination aus p53- und MIB-1-Status ein hoch signifikanter Wert von $p = 0,0001$ erzielt werden. Dabei ergänzen sich die negativen Effekte von MIB-1-Überexpression und normalem p53-Status, denn der Unterschied der Low-Risk-Gruppe zur intermediären Gruppe (nur MIB-1-Überexpression oder normaler p53-Status) war gering, während das Überleben der High-Risk-Gruppe sowohl gegenüber der Low-Risk- als auch der intermediären Gruppe signifikant besser war. Dazu trägt auch die statistische Unabhängigkeit von p53-Status (Kombination mit $>10\%$) und MIB-1-Expression ($>25\%$) bei ($p = 0,002$), die aus den bisherigen Arbeiten erwartet worden war.

Die Kombination aus p53 und MIB-1 in Kombination wurde bisher selten bei der Subpopulation der pT1-Tumoren getestet, zeigt jedoch bessere Werte als die Einzelmarker. Letzteres kann aus den bisher veröffentlichten Daten zu Urothelkarzinomen im Allgemeinen eindeutig bestätigt werden. Dabei wurden die Surrogatparameter dieser Dissertation erst nach Auswertung der Einzelparameter definiert und entsprechend der Aussagen der Einzelparameter kombiniert, so dass eine Abnahme des p-Wertes zu erwarten war. Deshalb sollten die Markerkombinationen sicherlich in weiteren Studien – dann schon a priori festgelegt – getestet werden, um diesen durch Subgruppenbildung entstandenen Effekt zu umgehen.

Was jedoch den bisher veröffentlichten Daten widerspricht (und dadurch die Rolle von p53 als Prognosemarker in Frage stellt), ist der Sachverhalt, dass sich eine p53-Alteration, egal ob immunhistochemisch, Mutationen auf den Exons 5 bis 8 betreffend oder in Kombination der beiden, positiv auf das Outcome auswirkt. Bisherige Daten wiesen für positive p53-IHC oder TP53-Mutationen oft ein schlechteres Outcome aus. Diese berechneten Ergebnisse sind schwer zu erklären, da doch TP53 ein Tumorsuppressorgen darstellt. Schon bei der Auswertung der p53-Ergebnisse allein fiel dies auf.

TP53 wirkt auf vielfältigen Ebenen im Zellzyklus und spricht dabei unterschiedliche Regionen an. Dass bei pT1-Tumoren zusätzliche Veränderungen beteiligt sind, die bei der Tumorgenese eine die prognostisch ungünstige Auswirkung von p53 aufhebende Wirkung haben, wäre eine Erklärung. Dennoch muss festgehalten werden, dass bisher mit kaum einer der bis dato getesteten Markerkombinationen das tumorspezifische Überleben so signifikant beeinflusst worden ist. Die p53/MIB-1-Kombination, aber auch noch die Kombination p16/p53 waren als „molekulares Grading“ allen anderen (sowohl molekularen als auch histopathologischen) Parametern bezüglich der Vorhersage des tumorspezifischen Überlebens überlegen.

Bezüglich der Vorhersage des rezidivfreien Überlebens konnte mit der Kombination aus FGFR3- und p53-Status im Vergleich von High-Risk-Gruppe mit Low-Risk- und intermediärer Gruppe zusammen der einzige statistisch signifikante Wert ($p = 0,0403$) erreicht werden. Diese unterbot den Wert des FGFR3-Status ($p = 0,0545$) allein nur wenig, so dass sich hauptsächlich FGFR3 für diese statistische Relevanz verantwortlich zeigt. Dabei gab es nur einen Tumor, der gleichzeitig eine TP53-Mutation und eine FGFR3-Mutation aufwies. Dieser eine Tumor von 67 (1,5%) verhilft sozusagen der p53/FGFR3-Kombination über die Signifikanzgrenze. Dass FGFR3-Mutationen und TP53-Mutationen (fast) exklusive Ereignisse darstellen und somit verschiedene Entstehungswege repräsentieren, wurde bereits mehrfach formuliert (Bakkar et al., 2003), doch als Ausnahme von der Regel wurden vor allem pT1-Tumoren gefunden, was in Folgearbeiten herausgearbeitet wurde: Bei Bakkar et al., die alle Stages untersuchten, war die einzige Ausnahme von 81 Tumoren ein pT1G3-Tumor (von 30 pT1-Tumoren), Hernández et al., die 2005 speziell pT1G3-Tumoren untersuchten, fand 9,2% und Zieger et al. (2005), die T1- und G3-Tumoren gemeinsam evaluierten, wiesen 18% mit gleichzeitiger Mutation von TP53 und FGFR3 nach. Mit unseren Daten wird somit bestätigt, dass FGFR3- und TP53-Mutationen bei pT1-Tumoren nicht gänzlich exklusiv sind, wobei die Daten am ehesten denen von Bakkar et al. entsprechen.

Dies bestätigt das Überschneiden der beiden bisher propagierten Pathways bei pT1-Tumoren, könnte darüber hinaus aber auch für eine Entwicklung von pT1-Tumoren sprechen, die abweichend von den Entstehungsmodellen über p53-Alterationen (und CIS) bzw. FGFR3-Mutationen (bei pTa-Tumoren) zu erklären wäre. Bei diesem „dritten“ Weg würde das entgegengesetzte Verhalten von p53 durch zusätzliche Alterationen verursacht werden. Dies bedarf aber zusätzlicher Studien zur Überprüfung.

Außerdem beeinflusst in den vorliegenden Daten der p53-Status das rezidivfreie Überleben tendenziell erneut entgegengesetzt zu dem, was aus der bisherigen Literatur zu erwarten wäre (s. o.). Erklärungsmöglichkeiten sind in den vorherigen Kapiteln genannt. Hier ist diese Tendenz zwar weniger ausgeprägt als beim tumorspezifischen Überleben, trotzdem stützt es dadurch, dass auch die Resultate für p53 bezüglich des rezidivfreien Überlebens den meisten bisher veröffentlichten Daten widersprechen (und es 25 Rezidive gab, aber nur vier tumorspezifische Todesfälle), die Infragestellung der Rolle von p53. Dadurch könnte p53-Alterationen eventuell *nicht a priori* ein schlechteres Outcome zugeschrieben werden.

4.2.8 Schlussbemerkung zur Diskussion

Aus der bereits in der Vorbemerkung (Kapitel 4.2.1) angesprochenen Problematik der schweren Vergleichbarkeit der Studien zu diesem Thema sei auf Verbesserungsvorschläge hingewiesen, die eine internationale Konsultation zur Diagnose von nicht-invasiven Urothelneoplasien in Ancona (Italien) bereits im Jahre 2001 machte (Helpap et al., 2003) (übersetzt aus dem Englischen): „Was nötig erscheint, ist eine Standardisierung der Marker-Erforschung (z. B. ein Variabilitätsindex), der Arrays, Metaanalysen/kombinierten Analysen, Netzwerkuntersuchungen genauso wie der Evaluation von anderen Faktoren, die über die Biologie des Tumors hinaus eine Rolle spielen könnten. Dazu gehören die Behandlung, der Chirurg, das umgebende phänotypisch normale Gewebe und „host factors“, also Faktoren wie die Acetylierung, GST, Cyt p450, das Rauchen oder die Th1-Cytokin-Sekretion. Zwar wurden inzwischen manche dieser Vorschläge beherzigt, dennoch ist man noch weit entfernt von dem Ziel, dass die Studien ein einheitliches Design aufweisen.“

Ins gleiche Horn stoßen Lorenzo Gómez et Schroeder (2003), die in einer Metaanalyse die Literatur zu Tumormarkern für die Prognose von Urotheltumoren durcharbeiteten: Es gäbe signifikante Unterschiede zwischen den Betrachtern, Probleme beim lokalen Staging und eine niedrige Korrelation zwischen klinischem und pathologischem Staging. Die Autoren müssen konstatieren, dass es keine prognostischen Marker für das Blasenkarzinom gäbe, die dem konventionellen Grading oder Staging überlegen wären, trotz deren Unvollkommenheit. Benötigt würde eine Standardisierung der Assay-Methoden bei Blasentumormarkern, um schlüssigere und reproduzierbarere Ergebnisse zu ermöglichen und ein klinisches Werkzeug zu werden. Die Kontroversen aus einigen Studien stellten die Bedeutung von einigen vermeintlichen Prognosemarkern beim Urothelkarzinom in Frage.

Dennoch birgt eben auch das Grading und Staging Probleme, wie bereits im Kapitel 4.1.7 erläutert wurde.

Mitra et al. (2006) wagen nach einer Analyse der Befunde einen Blick in die Zukunft (übersetzt aus dem Englischen): „Eindeutige epigenetische und genetische Ereignisse charakterisieren das Zusammenspiel zwischen den Molekülen, die in die entdeckten Signalwege eingebunden sind. Dadurch gebietet sich ihr Einsatz als Prognoseindikatoren. Momentan gibt es Bemühungen, molekulare Panels zu konstruieren, die multiple Marker beinhalten und so robuster das Outcome vorhersagen können. Während klinische Studien für zielgerichtete Che-

motherapien begonnen wurden, sind neuartige genetische und pharmakologische Mittel in Entwicklung, die spezifisch auf die molekularen Signalwege gerichtet sind. Die nächste Generation des klinischen Managements von Urothelkarzinomen wird den Einsatz von Multi-Marker-Panels zur Vorhersage sowie die auf neuartige molekulare Ziele gerichtete Kombinationstherapie beinhalten.“

Falls die Studien zu molekularen Prognosemarkern so uneinheitlich wie bisher betrieben werden, wird das von Mitra Vorhergesagte sicherlich noch länger auf sich warten lassen. Deshalb sind bessere und einheitlichere Studiendesigns notwendig. Am besten wären prospektive klinische Multicenter-Studien mit einem einheitlichen Patientenmanagement. Dann müssen auch nicht Faktoren berücksichtigt werden, die bei retrospektiven Arbeiten wie der vorliegenden von Nachteil waren: Die Erstdiagnosen der Patienten wurden z. T. vor fast 20 Jahren gestellt. Das nachfolgende Management (Zystektomie, BCG-Instillation, etc.) beeinflusst jedoch ebenfalls das Outcome und hat sich mit der Zeit gewandelt. Dies ist besonders wichtig, wenn man als Endpunkte das rezidivfreie und das tumorspezifische Überleben wählt. Besonders der letztgenannte Endpunkt selbst, das tumorspezifische Überleben, begründet, dass nur wenige statistisch signifikante Assoziationen zwischen dem tumorspezifischen Überleben und den Markern detektiert werden konnten. Nur bei 10 der 21 Todesfälle konnte mit Sicherheit zwischen tumorspezifischem (4 Fälle) und nicht tumorspezifischem Tod (6 Fälle) unterschieden werden, bei den restlichen elf Todesfällen lautete die Todesursache „fraglich“ oder „unbekannt“. Da aber bei statistischen Analysen (wie hier der Kaplan-Meier-Berechnung) nur die tumorspezifischen vier Todesfälle berücksichtigt werden dürfen, sind aufgrund der geringen Zahl die Ergebnisse kritisch zu hinterfragen. Dennoch können immerhin Tendenzen abgelesen werden, die allerdings nicht überzubewerten sind. Zum rezidivfreien Überleben als Endpunkt können ebenfalls Kritikpunkte angeführt werden: Ob und wann ein Rezidiv eintritt, wird auch durch exogene Faktoren beeinflusst. Dazu gehört die eingesetzte Therapie nach der TUR (z. B. Chemotherapiefrühinstillation, Nachresektion, Zystektomie), aber ebenso andere Faktoren wie das Rauchen, das beispielsweise wiederum einen Einfluss auf p53 haben soll (Wallerand et al., 2005, s. Kapitel 4.2.5). Besonders bei pT1G2/3-Tumoren wäre das progressionsfreie Überleben am interessantesten, da hier zwischen zwei für den Patienten sehr gravierenden Therapieoptionen entschieden werden muss: die radikale Zystektomie mit allen Folgen oder konservatives Vorgehen mit eventuell besserer Lebensqualität. Drei verschiedene Subgruppen wären in Bezug auf die molekularen Veränderungen bei primären pT1 nach der TUR zu notieren: diejenigen Patienten, die völlig rezidivfrei bleiben; diejenigen, die einen Progress hin zur Muskelinvasion

erfahren; und schließlich diejenigen, die ein nicht-muskelinvasives Rezidiv erleiden, also pTa- und pT1-Stadien. Dies ist aus ethischen Gründen allerdings nicht möglich, da bereits histopathologische und klinische Faktoren wie Begleit-CIS, Multifokalität und Tumorgroße als relevant für die Indikationsstellung zur Zystektomie gelten und auch angewendet werden. Deshalb sollten, wie bereits erwähnt, prospektive klinische Multicenter-Studien mit einem einheitlichen Patientenmanagement sowie einheitlich festgelegten Marker-Kriterien begonnen werden, um schnell Fortschritte zu erzielen. Dies ist sicherlich nicht einfach umzusetzen, aber erste Schritte wurden bereits unternommen.

5 Zusammenfassung und Ausblick

5.1 Zusammenfassung

Ziel dieser Dissertation war es, bei Urothelkarzinomen der Harnblase im Stadium pT1G2 oder G3 molekulare und genetische Untersuchungen durchzuführen und diese mit dem tumorspezifischen Überleben und dem rezidivfreien Überleben in Bezug zu setzen. Dabei wurde nach Zusammenhängen gesucht, die eine Hilfestellung beim Management der Tumorpatienten liefern könnten, da es zu den genannten Stadien invasive und konservative Therapieansätze gibt. Dazu wurden an 76 oberflächlich invasiven Urothelkarzinomen der Harnblase (Stadium pT1G2 und G3) mit Mikrosatellitenmarkern LOHs und MSIs auf dem Chromosom 8 sowie die Deletion von p16 auf dem Chromosom 9p21 und die Polysomie der Chromosomen 3, 7 und 17 mit der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierungs-Technik analysiert. Diese wurden ergänzt durch immunhistochemische Färbung mit den Markern CK20, p53, MIB-1 sowie durch direkte Sequenzierung der Exons 5 bis 8 des TP53-Gens und FGFR3-Mutationsanalysen mit Hilfe der SNaPshot-Sequenzierung.

Als Substrat zur Gewinnung von DNA wurde formalinfixiertes und paraffineingebettetes Gewebematerial verwendet. Nach manueller Mikrodissektion wurde die DNA der Tumorzellen und auch die DNA des Normalgewebes isoliert. Für die Durchführung der LOH- und MSI-Analysen erfolgte die Amplifikation der DNA mit bis zu 7 Mikrosatellitenmarkern mit Hilfe der PCR und der nested-PCR. Die PCR-Amplifikate wurden mittels Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennt und anschließend die Banden in einer Silberfärbung sichtbar gemacht. Als Weiteres wurden Stenzen aus demselben paraffineingebetteten Tumormaterial als Tissue-Micro-Arrays mit Hilfe der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung auf die Deletion von p16 und auf Polysomie mit Zentromersonden der Chromosomen 3, 7 und 17 hin untersucht.

Die Ergebnisse all dieser Untersuchungen wurden mit SPSS statistisch ausgewertet und in Bezug zum rezidivfreien Überleben und zum tumorspezifischen Gesamtüberleben gesetzt (Kaplan-Meier-Analysen):

In 19,7% der Tumoren wurden LOHs auf dem Chromosom 8 gefunden. Es zeigte sich eine MSI-Rate von 10% (7 Tumoren), wobei ein MSI-high und sechs MSI-low gefunden wurden. Es zeigte sich keine signifikante Assoziation zur Histopathologie oder zu den anderen untersuchten Markern und dem Outcome.

Die FISH-Analyse ergab eine p16-Deletion bei 69,4% der Tumoren und eine Polysomie bei 81,6%. p16 war nur mit dem Grading assoziiert, ansonsten gab es keine signifikanten Assoziationen der histopathologischen Parameter mit den Ergebnissen der FISH-Analyse. Dabei waren Polysomie und p16-Deletionen allerdings tendenziell gehäuft bei Tumoren mit ungünstiger Histopathologie.

Eine Mutation auf den Exons 5 bis 8 auf dem TP53-Gen wiesen 15,5% der Tumoren auf. Dabei zeigten sich keine signifikanten Korrelationen mit der Histopathologie oder dem Outcome.

39,7% der Tumoren zeigten eine FGFR3-Mutation, wobei 60,0% der G2- und 31,3% der G3-Tumoren Mutationen aufwiesen. FGFR3-Mutation kamen signifikant häufiger in Tumoren mit besserer Histopathologie vor (G2, kein Begleit-CIS, unifokal, papilläres Wachstumsmuster), wiesen aber ein kürzeres rezidivfreies Überleben auf. Dies widerspricht unter anderem mit der Studie von Zieger et al. (2005) den älteren Veröffentlichungen, die FGFR3-Mutationen einen positiven Effekt bezüglich des Rezidivs zugesprochen haben.

Die Auswertung der Immunhistochemie von CK20 ergab fast immer (63/65) eine dedifferenzierte Expression. Die beiden einzigen Tumoren mit normaler Expression wiesen tendenziell eine bessere Histopathologie auf. CK20 ist bei pT1-Tumoren also wahrscheinlich nur hilfreich, falls es normal exprimiert ist. Dann spricht es für eine gute Prognose.

Die immunhistochemische Auswertung von p53 und die TP53-Mutationsanalyse der Exons 5 bis 8 waren synergistisch, wobei jede einzelne Mutation exakt ihre Entsprechung (wie aus der Biochemie zu erwarteten) in der Immunhistochemie fand. Deshalb wurde ein spezifischerer Parameter definiert, der zwischen p53-alteriert (Mutation und/oder positive IHC) und nicht p53-alteriert (weder Mutation noch positive IHC) unterschied. Dabei waren p53-Alterationen häufiger bei Tumoren mit schlechterer Histopathologie, zeigten aber paradoxerweise diametral entgegengesetzt zu den bisherigen Literaturdaten ein längeres rezidivfreies und tumorspezifisches Überleben.

Die MIB-1-Expression war ebenfalls mit ungünstigerer Histopathologie korreliert und bestätigte damit seine Rolle als Progressionsmarker mit schlechterem tumorspezifischem Überleben. Das Ergebnis unserer Daten, dass eine hohe Proliferation zu einem längeren rezidivfreien Überleben führt, widerspricht dagegen den bisherigen Veröffentlichungen.

Das tumorspezifische Gesamtüberleben war signifikant länger ($p = 0,0214$) bei p53-Alterationen und vor allem bei der Kombination der letzteren mit einer niedrigen Proliferation ($\leq 25\%$; $p = 0,0001$). Die restlichen Marker und Markerkombinationen schienen keinen oder weniger signifikanten Einfluss (p16-/p53-Alterationsstatus, $p = 0,0204$) zu besitzen.

Bezüglich der Aussagekraft für den Zeitraum bis zum Auftreten eines Rezidivs ergab sich Folgendes: Die Markerkombination aus FGFR3- und p53-Alterationsstatus (Kombination) beeinflusste das RFS signifikant ($p = 0,0403$), wobei fast allein der FGFR3-Status dafür verantwortlich war ($p = 0,0545$). Da FGFR3-Mutationen zwar mit histopathologisch günstigen Parametern assoziiert waren, scheinen bei pT1-Tumoren Alterationen hinzuzukommen, die die positiven Eigenschaften von FGFR3-Mutationen überwiegen. Damit sind FGFR3-Mutationen bei Urothelkarzinomen wahrscheinlich *nicht a priori* mit einem besserem Outcome assoziiert.

Sowohl das rezidivfreie als auch das tumorspezifische Überleben wurden von p53-Alterationen diametral entgegengesetzt beeinflusst, wie aus den bisherigen Veröffentlichungen zu erwarten war. Die gefundenen Ergebnisse stellen unter Berücksichtigung der Literaturdaten die bis dato herausragende Rolle von p53 bei Urothelkarzinomen in Frage.

Einen „dritter“ Weg bei der Entstehung von Harnblasenkarzinomen (neben FGFR3- und p53-Alterationen) wäre eine gewagte, aber mögliche Deutung. Auch das gleichzeitige Auftreten von FGFR3-Mutationen und TP53-Mutationen ebenso wie die Koinzidenz von CIS und FGFR3-Mutation sprächen dafür. Die verantwortliche Alterationen müssten aber erst definiert werden.

Eingeschränkt werden die Ergebnisse durch Sachverhalte, die auch bei den anderen Veröffentlichungen zu diesem Thema zu kritisieren waren (siehe Kapitel 4.2.1), vor allem aber die relativ geringe Zahl gesicherter nicht-tumorspezifischer bzw. tumorspezifischer Todesfälle in unseren Daten sowie das allgemein bekannte Problem der Vergleichbarkeit der Studien durch die Nicht-Standardisierung der Markerforschung. Darüber hinaus darf nicht vergessen werden, dass die jeweilige Therapie nach pT1-Diagnose (z. B. Chemotherapiefrühinstillation, Nachresektion, Zystektomie) das Outcome wesentlich beeinflusst. Diese Therapie war und ist einem stetigen Wandel unterworfen. Schon allein deswegen sind die Berechnungen zum rezidivfreien Überleben und dem tumorspezifischen Überleben sehr problematisch. Bei größeren Fallzahlen wäre eine Subgruppenanalyse sinnvoll.

Zusammenfassend zeigen die in der vorliegenden Arbeit untersuchten molekularen und genetischen Alterationen wie viele andere spezifische Moleküle mit veränderten Expressionsmustern in Blasentumoren, die bereits erprobt worden sind, gewisse Signifikanzen, liefern aber vor allem in Kombination die besten Aussagen über das Verhalten von pT1-Tumoren.

CK20, p16-Deletionen und Polysomie sowie LOH und MSI, die in dieser Dissertation beleuchtet wurden, lassen sich mit ihren Ergebnissen gut in die bisherigen Veröffentlichungen

einreihen, stellen aber allein keine Prädiktoren für das Outcome von pT1-Urothelkarzinompatienten dar. Die gefundenen Ergebnisse von FGFR3 und p53 sowie Kombinationen mit deren Beteiligung sind widersprüchlicher, könnten aber mögliche neue Erkenntnisse bei der Entstehung von Urothelkarzinomen andeuten: FGFR3-Mutationen könnte *nicht a priori* eine bessere Prognose zugeschrieben werden; die Ergebnisse zu p53 sollten aufgrund der geringen Zahlen nicht überbewertet werden, stellen jedoch auch vor dem Hintergrund der bisher zahlreichen uneinheitlichen Veröffentlichungen dazu die herausragende Rolle von p53 beim Urothelkarzinom der Harnblase in Frage bzw. verlangen nach einer differenzierteren Betrachtung.

Dass generell ein einziger molekularer Marker für die Therapieentscheidung oder als Prognosemarker ausreicht, ist sehr unwahrscheinlich – vor allem vor dem Hintergrund der Komplexität der molekularen Interaktionen, die immer mehr aufgedeckt werden.

Alterationen, die ein entsprechendes Potential für eine spezialisierte Klassifikation oder ein molekulares Grading haben, können somit bisher nur als Ergänzung zur klassischen Histopathologie dienlich sein. Somit wird wahrscheinlich nur eine Kombination von mehreren Markern – sowohl molekularer wie histopathologischer Natur – zur Prognoseabschätzung von pT1G2/3-Urothelkarzinomen der Harnblase hilfreich sein. Dazu sind die standardisierte Prüfung neuer Marker beziehungsweise die weitere Testung von Kombinationen von Markern sowie – nicht zu vergessen – eine gute Zusammenarbeit zwischen Pathologen und Urologen für ein Vorwärtstkommen auf diesem Gebiet unerlässlich.

5.2 Ausblick

Ständig werden Studien zu neuen Markern veröffentlicht, darunter zuletzt z. B. Gonzalez et al. (2008), die an pT1G3-Urotheltumoren der Harnblase einen Zusammenhang zwischen der Kombination aus der Immunfärbung von p53 und Survivin mit einem höheren Progressionsrisiko zeigen konnten. Daneben werden immer wieder neue und kostengünstigere Methoden und Geräte entwickelt, die es ermöglichen, gleichzeitig schneller und billiger Marker zu untersuchen. Besonders vor dem Hintergrund der Komplexität der Entstehung von muskelinvasiven Urothelkarzinomen der Blase, die eine Kombination mehrerer Marker sinnvoll erscheinen lassen, ist diese Entwicklung positiv zu sehen. Denn oftmals scheitern wissenschaftliche Erkenntnisse an der Übertragbarkeit in den klinischen Alltag aufgrund von hohem Zeit- und Geldaufwand.

Ein weiterer weltweiter Trend ist die nicht-invasive Detektion von Blasen-tumoren und deren Rezidiven. Dabei bleibt allerdings das Problem der Progressionsvorhersage von pT1-Tumoren bestehen. Voraussetzung für nicht-invasive Techniken ist, dass die Ergebnisse aus Resektionsmaterial und Urinproben vergleichbar sind. Als Beispiel seien Halachmi et al. (2007) genannt, die in ihrer Arbeit eine effizientere Methode der Fluoreszenz-Mikrosatellitenanalyse und automatisierten Gen-Analysiersystemen beschreiben. Welche Detektionssysteme und Prognose-Scores sich für den klinischen Alltag durchsetzen werden, bleibt offen. Gleichzeitig sind auch zielgerichtete Chemotherapien sowie neuartige genetische und pharmakologische Mittel in Entwicklung, die spezifisch auf die molekularen Signalwege gerichtet sind (Mitra et al., 2006/2007).

Darüber hinaus darf aber nicht vergessen werden, dass immer der Patient im Zentrum des ärztlichen Handelns stehen sollte. Deshalb darf als Kriterium für den Erfolg oder Misserfolg einer medizinischen Maßnahme nicht nur eine objektive Größe wie die Anzahl der Überlebensmonate gelten, sondern – oft wesentlich wichtiger für die Betroffenen – die subjektive Lebensqualität nach einer medizinischen Maßnahme. Dazu gibt es leider nur wenige Studien. Letztlich entscheidet der Wille des Patienten.

Dies setzt eine Aufklärung durch seinen Arzt nach bestem Wissen und Gewissen voraus. Zu Ersterem möge die vorliegende Arbeit einen kleinen Beitrag leisten.

QUIDQUID AGIS, PRUDENTER AGAS, ET RESPICE FINEM.

6 Quellenverzeichnis

van der **Aa** MN, van Leenders GJ, Steyerberg EW, van Rhijn BW, Jöbsis AC, Zwarthoff EC, van der Kwast TH: *A new system for substaging pT1 papillary bladder cancer: a prognostic evaluation*. Hum Pathol **2005**; 36:981-986.

Bakkar AA, Wallerand H, Radvanyi F, Lahaye JB, Pissard S, Lecerf L, Kouyoumdjian JC, Abbou CC, Paireon JC, Jaurand MC, Thiery JP, Chopin DK, de Medina SG: *FGFR3 and TP53 gene mutations define two distinct pathways in urothelial cell carcinoma of the bladder*. Cancer Res **2003**; 63:8108-8112.

Bender CM, Jones CA: *Molecular genetics in carcinoma of the bladder*. In: Petrovich Z, Baert L, Brady LW (Hrsg.): *Carcinoma of the bladder: innovations in management*. New York. Springer Verlag, Heidelberg – New York. **1998**; 37-51.

Billerey C, Chopin D, Aubriot-Lorton MH, Ricol D, Gil Diez de Medina S, van Rhijn B, Bralet MP, Lefrere-Belda MA, Lahaye JB, Abbou CC, Bonaventure J, Zafrani ES, van der Kwast T, Thiery JP, Radvanyi F: *Frequent FGFR3 mutations in papillary non-invasive bladder (pTa) tumors*. Am J Pathol **2001**; 158:1955-1959.

Böhm M, Wieland I, Schütze K, Rübber H: *Microbeam MOMeNT: non-contact laser microdissection of membrane-mounted native tissue*. Am J Pathol **1997**; 151:63-67.

Boland CR, Thibodeau SN, Hamilton SR, Sidransky D, Eshleman JR, Burt RW, Meltzer SJ, Rodríguez-Bigas MA, Fodde R, Ranzani GN, Srivastava S: *A National Cancer Institute Workshop on Microsatellite Instability for cancer detection and familial predisposition: development of international criteria for the determination of microsatellite instability in colorectal cancer*. Cancer Res **1998**; 58:5248-5257.

Budowle B; Chakraborty R, Giusti AM, Eisenberg AJ, Allen RC: *Analysis of the VNTR locus DIS80 by the PCR followed by high-resolution PAGE*. Am J Hum Genet **1991**; 48:137-144.

Bubendorf L, Grilli B, Sauter G, Mihatsch MJ, Gasser TC, Dalquen P: *Multiprobe FISH for enhanced detection of bladder cancer in voided urine specimens and bladder washings*. Am J Clin Pathol **2001**; 116(1):79-86.

Burger M, Denzinger S, Hartmann A, Wieland WF, Stöhr R, Obermann EC: *Mcm2 predicts recurrence hazard in stage Ta/T1 bladder cancer more accurately than CK20, Ki67 and histological grade*. Br J Cancer **2007**; 96(11):1711-1715.

Cahill DP, Lengauer C, Yu J, Riggins GJ, Willson JK, Markowitz SD, Kinzler KW, Vogelstein B: *Mutations of mitotic checkpoint genes in human cancers*. Nature **1998**:300-303.

Cappellen D, De Oliveira C, Ricol D, de Medina S, Bourdin J, Sastre-Garau X, Chopin D, Thiery JP, Radvanyi F: *Frequent activating mutations of FGFR3 in human bladder and cervix carcinomas*. Nat Genet **1999**; 23:18-20.

Cattoretto G, Becker MH, Key G, Duchrow M, Schlüter C, Galle J, Gerdes J: *Monoclonal antibodies against recombinant parts of the Ki-67 antigen (MIB 1 and MIB 3) detect*

proliferating cells in microwave-processed formalin-fixed paraffin sections. J Pathol **1992**; 168(4):357-363.

Cina SJ, Lancaster-Weiss KJ, Lecksell K, Epstein JI: *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 **2001**; 125(5):646-651.

Chow NH, Liu HS, Chan SH: *The Role of nm23-H1 in the Progression of Transitional Cell Bladder Cancer.* Clin Cancer Res **2000**; 6:3595-3599.

Cremer T, Jauch A, Ried T, Schröck E, Lengauer C, Cremer M, Speicher MR: *Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH).* Dt Ärzteblatt **1995**; 92:1177-1185.

Dalbagni G, Parekh DJ, Ben-Porat L, Potenzoni M, Herr HW, Reuter VE: *Prospective evaluation of p53 as a prognostic marker in T1 transitional cell carcinoma of the bladder.* BJU Int **2007**; 99:281-285.

Demetrick DJ, Zhang H, Beach DH: *Chromosomal mapping of the human genes CKS1 to 8q21 and CKS2 to 9q22.* Cytogenet Cell Genet **1996**; 73:250-254.

Denzinger S, Wieland WF, Otto W, Filbeck T, Knuechel R, Burger M: *Does photodynamic transurethral resection of bladder tumour improve the outcome of initial T1 high-grade bladder cancer? A long-term follow-up of a randomized study.* BJU Int **2007**; 101:566-569.

Denzinger S, Fritsche HM, Otto W, Blana A, Wieland WF, Burger M: *Early versus deferred cystectomy for initial high-risk pT1G3 urothelial carcinoma of the bladder: do risk factors define feasibility of bladder-sparing approach?* Eur Urol **2008**; 53:146-152.

Desai S, Lim SD, Jimenez RE, Chun T, Keane TE, McKenney JK, Zavala-Pompa A, Cohen C, Young RH, Amin MB: *Relationship of cytokeratin 20 and CD44 protein expression with WHO/ISUP grade in pTa and pT1 papillary urothelial neoplasia.* Mod Pathol **2000**; 13:1315-1323.

Deshpande N, Mitchell IP, Hayward SW, Love S, Towler JM: *Tumor enzymes and prognosis in transitional cell carcinoma of the bladder: prediction of risk of progression in patients with superficial disease.* J Urol **1991**; 146:1247-1251.

Dietmaier W, Wallinger S, Bocker T, Kullmann F, Fishel R, Ruschoff J: *Diagnostic microsatellite instability: definition and correlation with mismatch repair protein expression.* Cancer Res **1997**; 57:4749-4756.

Dietmaier W, Hartmann A, Wallinger S, Heinmöller E, Kerner T, Endl E, Jauch KW, Hofstädter F, Rüschoff J: *Multiple mutation analyses in single tumor cells with improved whole genome amplification.* Am J Pathol **1999**; 154:83-95.

Erbersdobler A, Kaiser H, Friedrich MG, Henke RP: *Numerical aberrations of chromosome 8 and allelic loss at 8p in non-muscle-invasive urothelial carcinomas of the urinary bladder.* Eur Urol **2000**; 38:590-596.

Esrig D, Spruck CH 3rd, Nichols PW, Chaiwun B, Steven K, Groshen S, Chen SC, Skinner DG, Jones PA, Cote RJ: *p53 nuclear protein accumulation correlates with mutations in the p53 gene, tumor grade, and stage in bladder cancer*. Am J Pathol **1993**; 143:1389-1397.

Friedrich MG, Riethdorf S, Erbersdobler A, Tiemer C, Schwaibold H, Sölter JK, Huland E, Riethdorf L, Conrad S, Hammerer PG, Huland H: *Relevance of p53 gene alterations for tumor recurrence in patients with superficial transitional cell carcinoma of the bladder*. Eur Urol **2001**; 39:159-166.

Fields S, Jang SK: *Presence of a potent transcription activating sequence in the p53 protein*. Scienc **1990**; 249:1046-1049.

Finlay CA, Hinds PW, Tan TH, Eliyahu D, Oren M, Levine AJ: *Activating mutations for transformation by p53 produce a gene product that forms an hsc70-p53 complex with an altered half-life*. Mol Cell Biol **1988**; 8:531-539.

Fujimoto K, Yamada Y, Okajima E, Kakizoe T, Sasaki H, Sugimura T, Terada M: *Frequent association of p53 gene mutation in invasive bladder cancer*. Cancer Res **1992**; 52:1393-1398.

Gardiner RA, Walsh MD, Allen V, Rahman S, Samaratinga ML, Seymour GJ, Lavin MF: *Immunohistological expression of p53 in primary pT1 transitional cell bladder cancer in relation to tumour progression*. Br J Urol **1994**; 73:526-532.

Gasser TC, Rutishauser G: *Basiswissen Urologie*. Springer Verlag, Berlin – Heidelberg. 3. Auflage **2006**:89.

George B, Datar RH, Wu L, Cai J, Patten N, Beil SJ, Groshen S, Stein J, Skinner D, Jones PA, Cote RJ: *p53 gene and protein status: the role of p53 alterations in predicting outcome in patients with bladder cancer*. J Clin Oncol **2007**; 25:5352-5358.

Gerdes J, Schwab U, Lemke H, Stein H: *Production of a mouse monoclonal antibody reactive with a human nuclear antigen associated with cell proliferation*. Int J Cancer **1983**; 15:31:13-20.

Gerdes J, Lemke H, Baisch H, Wacker HH, Schwab U, Stein H: *Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67*. J Immunol **1984**; 133:1710-1715.

Gerdes J, Li L, Schlueter C, Duchrow M, Wohlenberg C, Gerlach C, Stahmer I, Kloth S, Brandt E, Flad HD: *Immunobiochemical and molecular biologic characterization of the cell proliferation-associated nuclear antigen that is defined by monoclonal antibody Ki-67*. Am J Pathol **1991**; 138:867-873.

Goelz SE, Hamilton SR, Vogelstein B: *Purification of DNA from formaldehyde fixed and paraffin embedded human tissue*. Biochem Biophys Res Commun **1985**; 16:130:118-126.

Gonzalez S, Aubert S, Kerdraon O, Haddad O, Fantoni JC, Biserte J, Leroy X: *Prognostic value of combined p53 and survivin in pT1G3 urothelial carcinoma of the bladder*. Am J Clin Pathol **2008**; 129:232-237.

Greenblatt MS, Bennett WP, Hollstein M and Harris CC: *Mutations in the p53 tumor suppressor gene: clues to cancer etiology and molecular pathogenesis*. Cancer Res **1994**; 54:4855-4878.

Greer CE, Peterson SL, Kiviat NB, Manos MM: *PCR amplification from paraffin-embedded tissues. Effects of fixative and fixation time*. Am J Clin Pathol **1991**; 95: 117-124.

Greer CE, Wheeler CM, Manos MM: *Sample preparation and PCR amplification from paraffin-embedded tissues*. PCR Methods Appl **1994**; 3:113-122.

Grignon DJ: *Neoplasms of the urinary bladder*. In: Bostwick DG, Eble JN (Hrsg.): *Urologic surgical pathology*. Mosby-Year Book Inc., St. Louis - Missouri, **1997**: 216-282.

Grossmann HB, Liebert M, Antelo M, Dinney CP, Hu SX, Palmer JL, Benedict WF: *p53 and RB expression predict progression in T1 bladder cancer*. Clin Cancer Res **1998**; 4:829-834.

Hainaut P, Hollstein M: *p53 and human cancer: the first ten thousand mutations*. Adv Cancer Res **2000**; 77:81-137.

Halachmi S, Cohen M, Szargel R, Cohen N: *Molecular detection of bladder cancer by fluorescence microsatellite analysis and an automated genetic analyzing system*. ScientificWorldJournal **2007**; 7:1553-1557.

Hall PA, Ray A, Lemoine NR, Midgley CA, Krausz T, Lane DP: *p53 immunostaining as a marker of malignant disease in diagnostic cytopathology*. Lancet **1998**; 338:513.

Halling KC, King W, Sokolova IA, Meyer RG, Burkhardt HM, Halling AC, Cheville JC, Sebo TJ, Ramakumar S, Stewart CS, Pankratz S, O'Kane DJ, Seelig SA, Lieber MM, Jenkins RB: *A comparison of cytology and fluorescence in situ hybridization for the detection of urothelial carcinoma*. J Urol **2000**; 164:1768-1775.

Harnden P, Mahmood N, Southgate J: *Expression of cytokeratin 20 redefines urothelial papillomas of the bladder*. Lancet **1999**; 353:974-977.

Hartmann A, Blaszyk H, McGovern RM, Schroeder JJ, Cunningham J, De Vries EM, Kovach JS, Sommer SS: *p53 gene mutations inside and outside of exons 5-8: the patterns differ in breast and other cancers*. Oncogene **1995**; 10:681-688.

Hartmann A, Zanardo L, Bocker-Edmonston T, Blaszyk H, Dietmaier W, Stöhr R, Cheville JC, Junker K, Wieland W, Knuechel R, Rüschoff J, Hofstädter F, Fishel R: *Frequent microsatellite instability in sporadic tumors of the upper urinary tract*. Cancer Res **2002**; 1;62:6796-6802.

Helpap B: *Atlas der Pathologie urologischer Tumoren*. Springer Verlag, Berlin - Heidelberg - New York. **1993**:53-69.

Helpap B: *New WHO classification of urothelial carcinoma of the urinary bladder*. Verh Dtsch Ges Pathol **2002**; 86:57-66.

Helpap B, Schmitz-Dräger BJ, Hamilton PW, Muzzonigro G, Galosi AB, Kurth KH, Lubaroff D, Waters DJ, Droller MJ: *Molecular pathology of non-invasive urothelial carcinomas (part I)*. Virchows Arch **2003**; 442:309-316.

Hernández S, López-Knowles E, Lloreta J, Kogevinas M, Jaramillo R, Amorós A, Tardón A, García-Closas R, Serra C, Carrato A, Malats N, Real FX: *FGFR3 and Tp53 mutations in TIG3 transitional bladder carcinomas: independent distribution and lack of association with prognosis*. Clin Cancer Res **2005**; 11:5444-5450.

Hernández S, López-Knowles E, Lloreta J, Kogevinas M, Amorós A, Tardón A, Carrato A, Serra C, Malats N, Real FX: *Prospective study of FGFR3 mutations as a prognostic factor in nonmuscle invasive urothelial bladder carcinomas*. J Clin Oncol **2006**; 24:3664-3671.

Hitchings AW, Kumar M, Jordan S, Nargund V, Martin J, Berney DM: *Prediction of progression in pTa and pT1 bladder carcinomas with p53, p16 and pRb*. Br J Cancer **2004**; 91:552-557.

Hollstein M, Sidransky D, Vogelstein B, Harris CC: *p53 mutations in human cancers*. Science **1991**; 5:253:49-53.

Hopman AH, Ramaekers FC, Raap AK, Beck JL, Devilee P, van der Ploeg M, Vooijs GP: *In situ hybridization as a tool to study numerical chromosome aberrations in solid bladder tumors*. Histochemistry **1988**; 89:307-316.

Hopman AH, Poddighe PJ, Smeets AW, Moesker O, Beck JL, Vooijs GP, Ramaekers FC: *Detection of numerical chromosome aberrations in bladder cancer by in situ hybridization*. Am J Pathol **1989**; 135:1105-1117.

Hopman AH, Moesker O, Smeets AW, Pauwels RP, Vooijs GP, Ramaekers FC: *Numerical chromosome 1, 7, 9, and 11 aberrations in bladder cancer detected by in situ hybridization*. Cancer Res **1991**; 51:644-651.

Isobe M, Emanuel BS, Givol D, Oren M, Croce CM: *Localization of gene for human p53 tumour antigen to band 17p13*. Nature **1986**; 320:84-85.

Jebar AH, Hurst CD, Tomlinson DC, Johnston C, Taylor CF, Knowles MA: *FGFR3 and Ras gene mutations are mutually exclusive genetic events in urothelial cell carcinoma*. Oncogene **2005**; 24:5218-5225.

Kaplan EL, Meier P: *Non parametric estimation from incomplete observations*. J Am Stat Assoc **1958**; 53:457-481.

Karoui M, Hofmann-Radvanyi H, Zimmermann U, Couvelard A, Degott C, Faridoni-Laurens L, Ahomadegbe JC, Gazzeri S, Brambilla E, Clerici T, Charbonnier P, Tresallet C, Mitry E, Penna C, Rougier P, Boileau C, Thiery JP, Nordlinger B, Franc B, Radvanyi F: *No evidence of somatic FGFR3 mutation in various types of carcinoma*. Oncogene **2001**; 16;20:5059-5061.

Keegan K, Johnson DE, Williams LT, Hayman MJ: *Characterization of the FGFR-3 gene and its gene product*. Ann N Y Acad Sci **1991**; 638:400-402.

Kelsey KT, Hirao T, Schned A, Hirao S, Devi-Ashok T, Nelson HH, Andrew A, Karagas MR: *A population-based study of immunohistochemical detection of p53 alteration in bladder cancer*. Br J Cancer **2004**; 90:1572-1576.

Keohavong P, Thilly WG: *Fidelity of DNA polymerases in DNA amplification*. Proc Natl Acad Sci USA **1989**; 86:9253-9257.

Kern SE, Kinzler KW, Bruskin A, Jarosz D, Friedman P, Prives C, Vogelstein B: *Identification of p53 as a sequence-specific DNA-binding protein*. Science **1991**; 252:1708-1711.

Kilicli-Camur N, Kilicaslan I, Gulluoglu MG, Esen T, Uysal V: *Impact of p53 and Ki-67 in predicting recurrence and progression of superficial (pTa and pT1) urothelial cell carcinomas of urinary bladder*. Pathol Int **2002**; 52:463-469.

Knowles MA, Shaw ME, Proctor AJ: *Deletion mapping of chromosome 8 in cancers of the urinary bladder using restriction fragment length polymorphisms and microsatellite polymorphisms*. Oncogene **1993a**; 8:1357-1364.

Knowles MA, Currie GA: *Genetic alterations in bladder cancer*. Lancet **1993b**; 342:1184. Comment on: Lancet 1993; 342:469-471.

Knowles MA: *Molecular genetics of bladder cancer: pathways of development and progression*. Cancer Surv **1998**; 31:49-76.

Knowles MA, Aveyard JS, Taylor CF, Harnden P, Bass S: *Mutation analysis of the 8p candidate tumour suppressor genes DBC2 (RHOBTB2) and LZTS1 in bladder cancer*. Canc Lett **2005**; 225:121-130.

Knowles MA: *Role of FGFR3 in urothelial cell carcinoma: biomarker and potential therapeutic target*. World J Urol **2007**; 25:581-593.

Knudson AG: *Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma*. Proc Natl Acad Sci USA **1971**; 68:820-823.

Knudson AG: *Hereditary cancer, oncogenes, and antioncogenes*. Cancer Res **1985**; 45:1437-1443.

Krause FS, Rauch A, Schrott KM, Engehausen DG: *Clinical decisions for treatment of different staged bladder cancer based on multitarget fluorescence in situ hybridization assays?* World J Urol **2006**; 24:418-422.

Kulkarni GS, Finelli A, Fleshner NE, Jewett MA, Lopushinsky SR, Alibhai SM: *Optimal management of high-risk T1G3 bladder cancer: a decision analysis*. PloS Med **2007**; 4:284.

Lamy A, Gobet F, Laurent M, Blanchard F, Varin C, Moulin C, Andreou A, Frebourg T, Pfister C: *Molecular profiling of bladder tumors based on the detection of FGFR3 and TP53 mutations*. J Urol **2006**; 176:2686-2689.

Liukkonen T, Rajala P, Raitanen M, Rintala E, Kaasinen E, Lipponen P: *Prognostic value of MIB-1 score, p53, EGFr, mitotic index and papillary status in primary superficial (Stage*

pTa/T1) bladder cancer: a prospective comparative study. The Finnbladder Group. Eur Urol **1999**; 36:393-400.

Llopis J, Alcaraz A, Ribal MJ, Solé M, Ventura PJ, Barranco MA, Rodriguez A, Corral JM, Carretero P: *p53 expression predicts progression and poor survival in T1 bladder tumors.* Eur Urol **2000**; 37:644-653.

Lokeshwar VB: *Are there molecular signatures for predicting bladder cancer prognosis?* J Urol **2006**; 176:2347-2348. Comment on: J Urol 2006;176:2686-2689.

Lopez-Beltran A, Luque RJ, Alvarez-Kindelan, Quintero A, Merlo F, Carrasco JC, Requena MJ, Montironi R: *Prognostic Factors in Stage T1 Grade 3 Bladder Cancer Survival: The Role of G1-S Modulators (p53, p21Waf1, p27kip1, Cyclin D1, and Cyclin D3) and Proliferation Index (ki67-MIB1).* Eur Urol **2004**; 45:606-612.

López-Knowles E, Hernández S, Kogevinas M, Lloreta J, Amorós A, Tardón A, Carrato A, Kishore S, Serra C, Malats N, Real FX; EPICURO Study Investigators: *The p53 pathway and outcome among patients with T1G3 bladder tumors.* Clin Cancer Res **2006**; 12:6029-6036.

Lorenzo Romero JG, Salinas Sánchez AS, Giménez Bachs JM, Sánchez Sánchez F, Escribano Martínez J, Hernández Millán IR, Segura Martín M, Virseda Rodríguez JA: *p53 gene mutations in superficial bladder cancer.* Urol Int **2004**; 73:212-218.

Lorenzo Gómez MF, Schroeder G: *The role of tumor markers in prognosing transitional bladder cancer.* Actas Urol Esp **2003**; 27:501-512.

Ludbrook J: *Multiple comparison procedures updated.* Clin Exp Pharmacol Physiol **1998**; 25:1032-1037.

Luis NM, López-Knowles E, Real FX: *Molecular biology of bladder cancer.* Clin Transl Oncol **2007**; 9:5-12.

Malats N, Bustos A, Nascimento CM, Fernandez F, Rivas M, Puente D, Kogevinas M, Real FX: *p53 as a prognostic marker for bladder cancer: a meta-analysis and review.* Lancet Oncol **2005**; 6:678-686.

Mao L: *Microsatellite analysis. Applications and pitfalls.* Ann N Y Acad Sci **2000**; 906:55-62.

Masters JRW, Vani UD, Grigor KM, Griffiths GO, Crook A, Parmar MKB, Knowles MA with the MRC Superficial Bladder Cancer Group Mitomycin-C Trial Collaborators: *Can p53 staining be used to identify patients with aggressive superficial bladder cancer?* J Pathol **2003**; 200:74-81.

Mazerolles C, Rishmann P, Chopin D, Popov Z, Malavaud B, Selves J, Neulat-Duga I, Bellot J, Delsol G: *Usefulness of MIB-1 monoclonal antibody in assessing the proliferative index in human bladder carcinoma: comparison with Ki-67 antibody.* Histopathology **1994**; 25:563-68.

Mhaweck-Fauceglia P, Cheney RT, Fischer G, Beck A, Hermann FR: *FGFR3 and p53 protein expressions in patients with pTa and pT1 urothelial bladder cancer.* Eur J Surg Oncol **2006**; 32:231-237.

Mhaweck-Fauceglia P, Fischer G, Alvarez V Jr, Ahmed A, Herrmann FR: *Predicting outcome in minimally invasive (T1a and T1b) urothelial bladder carcinoma using a panel of biomarkers: a high throughput tissue microarray analysis.* BJU Int **2007**; 1182-1187.

Mian C, Lodde M, Comploj E, Lusuardi L, Palermo S, Mian M, Maier K, Pycha A: *Multiprobe fluorescence in situ hybridisation: prognostic perspectives in superficial bladder cancer.* J Clin Pathol **2006**; 59:984-987.

Miettinen M: *Keratin 20: Immunohistochemical marker for gastrointestinal, urothelial and Merkel cell carcinomas.* Mod Pathol **1995**; 8:384-388.

Miller K, Hautmann R: *Carcinoma of the urinary bladder. Konservative oder operative Therapie bei PTIG3?* Urologe A **2005**; 44:151-154.

Mitra AP, Datar RH, Cote RJ: *Molecular pathways in invasive bladder cancer: new insights into mechanisms, progression, and target identification.* J Clin Oncol **2006**; 24:5552-5564.

Mitra AP, Birkhahn M, Cote RJ: *p53 and retinoblastoma pathways in bladder cancer p53 and retinoblastoma pathways in bladder cancer.* World J Urol **2007**; 25:563-571.

Moch H, Sauter G, Mihatsch MJ, Gudat F, Epper R, Waldman FM: *p53 but not erbB-2 expression is associated with rapid tumor proliferation in urinary bladder cancer.* Hum Pathol **1994**; 25:1346-1251.

Moch H, Kononen T, Kallioniemi OP, Sauter G: *Tissue microarrays: what will they bring to molecular and anatomic pathology?* Adv Anat Pathol **2001**; 8:14-20.

Moll R, Löwe A, Laufer J, Franke WW: *Cytokeratin 20 in human carcinomas. A new histo-diagnostic marker detected by monoclonal antibodies.* Am J Pathol **1992**; 140:427-447.

Montironi R, Lopez-Beltran A: *The 2004 WHO classification of bladder tumors: a summary and commentary.* Int J Surg Pathol **2005**; 13:143-153

Müller M (Hrsg.): *Gynäkologie und Urologie für Studium und Praxis: inkl. Geburtshilfe, Reproduktionsmedizin, Sexualmedizin, Andrologie u. Venerologie; unter Berücksichtigung des Gegenstandskataloges und der mündlichen Examina in den Ärztlichen Prüfungen.* Medizinische Verl.- u. Informationsdienste, Breisach, Rhein. 1. Auflage 2003/04 (**2003**):330-331.

Muscheck M, Sükösd F, Pesti T, Kovacs G: *High density deletion mapping of bladder cancer localizes the putative tumor suppressor gene between loci D8S504 and D8S264 at chromosome 8p23.3.* Lab Invest **2000**; 80:1089-1093.

Neuhaus M, Wagner U, Schmid U, Ackermann D, Zellweger T, Maurer R, Alund G, Knönagel H, Rist M, Moch H, Mihatsch MJ, Gasser TC, Sauter G: *Polysomies but not Y chromosome losses have prognostic significance in pTa/pT1 urinary bladder cancer.* Hum Pathol **1999**; 30:81-86.

Nocito A, Bubendorf L, Tinner EM, Süess K, Wagner U, Forster T, Kononen J, Fijan A, Bruderer J, Schmid U, Ackermann D, Maurer R, Alund G, Knönagel H, Rist M, Anabitarte M, Hering F, Hardmeier T, Schoenenberger AJ, Flury R, Jäger P, Fehr JL, Schraml P, Moch H, Mihatsch MJ, Gasser T, Sauter G: *Microarrays of bladder cancer tissue are highly representative of proliferation index and histological grade*. J Pathol **2001**; 194:349-357.

Noll S, Schaub-Kuhnen S: *Nachweismethoden*. In: Höfler H, Müller KM (Hrsg.): *Praxis der Immunhistochemie*. Urban und Fischer Verlag, München – Jena, 1. Auflage **2000**:17-18.

van **Oers JM**, Lurkin I, van Exsel AJ, Nijsen Y, van Rhijn BW, van der Aa MN, Zwarthoff EC: *A simple and fast method for the simultaneous detection of nine fibroblast growth factor receptor 3 mutations in bladder cancer and voided urine*. Clin Cancer Res **2005**; 11:7743-7748.

van **Oers JM**, Wild PJ, Burger M, Denzinger S, Stöhr R, Roskopf E, Hofstädter F, Steyerberg EW, Klinkhammer-Schalke M, Zwarthoff EC, van der Kwast TH, Hartmann A: *FGFR3 mutations and normal CK20 staining pattern define low-grade noninvasive urothelial bladder tumors*. Eur Urol **2007**; 52:760-768.

Ohgaki K, Iida A, Ogawa O, Kubota Y, Akimoto M, Emi M: *Genes Chromosomes Cancer. Localization of tumor suppressor gene associated with distant metastasis of urinary bladder cancer to a 1-Mb interval on 8p22*. Genes Chromosomes Cancer **1999**; 25:1-5.

Olivier M, Eeles R, Hollstein M, Khan MA, Harris CC, Hainaut P: *The IARC TP53 database: new online mutation analysis and recommendations to users*. Hum Mutat **2002**; 19:607-614.

Ooms EC, Anderson WA, Alons CL, Boon ME, Veldhuizen RW: *Analysis of the performance of pathologists in the grading of bladder tumors*. Hum Pathol **1983**; 14:140-143.

Oosterhuis JW, Schapers RF, Janssen-Heijnen ML, Smeets AW, Pauwels RP: *MIB-1 as a proliferative marker in transitional cell carcinoma of the bladder: clinical significance and comparison with other prognostic factors*. Cancer **2000**; 88(11):2598-2605.

Orsola A, Trias I, Raventós CX, Español I, Cecchini L, Búcar S, Salinas D, Orsola I: *Initial high-grade T1 urothelial cell carcinoma: feasibility and prognostic significance of lamina propria invasion microstaging (T1a/b/c) in BCG-treated and BCG-non-treated patients*. Eur Urol **2005**; 48:231-238; discussion 238.

Paner GP, Ro YK, Wojcik EM, Venkataraman G, Datta MW, Amin MB: *Further characterization of the muscle layers and lamina propria of the urinary bladder by systematic histologic mapping: implications for pathologic staging of invasive urothelial carcinoma*. Am J Surg Pathol. **2007**; 31:1420-1429.

Parker DC, Folpe AL, Bell J, Oliva E, Young RH, Cohen C, Amin MB: *Potential utility of uroplakin III, thrombomodulin, high molecular weight cytokeratin, and cytokeratin 20 in noninvasive, invasive, and metastatic urothelial (transitional cell) carcinomas*. Am J Surg Pathol **2003**; 27:1-10.

Pfister C, Buzelin F, Casse C, Bochereau G, Buzelin JM, Bouchot O: *Comparative analysis of MiB1 and p53 expression in human bladder tumors and their correlation with cancer progression*. Eur Urol **1998**; 33:278-284.

- Pfister C**, Flaman JM, Martin C, Grise P, Frebourg T: *Selective detection of inactivating mutations of the tumor suppressor gene p53 in bladder tumors*. J Urol **1999a**; 161:1973-1975.
- Pfister C**, Moore L, Allard P, Larue H, Lacombe L, Têtu B, Meyer F, Fradet Y: *Predictive value of cell cycle markers p53, MDM2, p21, and Ki-67 in superficial bladder tumor recurrence*. Clin Cancer Res **1999b**; 5:4079-4084.
- Placer J**, Espinet B, Salido M, Solé F, Gelabert-Mas A: *Correlation between histologic findings and cytogenetic abnormalities in bladder carcinoma: a FISH study*. Urology **2005**; 65:913-918.
- Popov Z**, Hoznek A, Colombel M, Bastuji-Garin S, Lefrere-Belda MA, Bellot J, Abboh CC, Mazerolles C, Chopin DK: *The prognostic value of p53 nuclear overexpression and MIB-1 as a proliferative marker in transitional cell carcinoma of the bladder*. Cancer **1997**; 80:1472-1481.
- Queipo Zaragoza JA**, Ruiz Cerdá JL, Palmero Martí L, Rubio Martínez LA, Vera Sempere F, Jiménez Cruz JF: *Prognostic value for progression of the regulating proteins of the cellular cycle in PTIG3 bladder tumours*. Actas Urol Esp **2005**; 29:261-268.
- Quintero A**, Alvarez-Kindelan J, Luque RJ, Gonzalez-Campora R, Requena MJ, Montironi R, Lopez-Beltran A: *Ki-67 MIB1 labelling index and the prognosis of primary TaT1 urothelial cell carcinoma of the bladder*. J Clin Pathol **2006**; 59:83-88.
- Rammeh-Rommani S**, Zermani R, Zouari B, Sfaxi M, Chabchoub A, Farah F, Kourda N, Ayed M, Ben Jilani S: *Prognostic value of clinicopathologic factors in superficial bladder tumors: a retrospective analysis*. Tunis Med **2005**; 83:746-749.
- Raycroft L**, Wu HY, Lozano G: *Transcriptional activation by wild-type but not transforming mutants of the p53 anti-oncogene*. Science **1990**; 249:1049-1051.
- Real FX**: *p53: it has it all, but will it make it to the clinic as a marker in bladder cancer?* J Clin Oncol **2007**; 25(34):5341-5344.
- van **Rhijn BWG**, Lurkin 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**; 61:1265-1268.
- van **Rhijn BWG**, Vis AN, van der Kwast TH, Kirkels WJ, Radvanyi F, Ooms EC, Chopin DK, Boevé ER, Jöbsis AC, Zwarthoff EC: *Molecular grading of urothelial cell carcinoma with fibroblast growth factor receptor 3 and MIB-1 is superior to pathological grade for the prediction of clinical outcome*. J Clin Oncol **2003**; 21:1912-1921.
- van **Rhijn BWG**, van der Kwast TH, Vis AN, Kirkels WJ, Boevé ER, Jöbsis AC, Zwarthoff EC: *FGFR3 and P53 characterize alternative genetic pathways in the pathogenesis of urothelial cell carcinoma*. Cancer Res **2004**; 64:1911-1914.
- Rodríguez-Alonso A**, Pita-Fernández S, González-Carreró J, Nogueira-March JL: *Multivariate analysis of recurrence and progression in stage T1 transitional-cell carcinoma of the bladder. Prognostic value of p53 and Ki67*. Actas Urol Esp **2003**; 27:132-141.

Rotem D, Cassel A, Lindenfeld N, Mecz Y, Sova Y, Resnick M, Stein A: *Urinary cytokeratin 20 as a marker for transitional cell carcinoma.* Eur Urol **2000**; 37:601-604.

Rousseau F, Saugier P, Le Merrer M, Munnich A, Delezoide AL, Maroteaux P, Bonaventure J, Narcy F, Sanak M: *Stop codon FGFR3 mutations in thanatophoric dwarfism type 1.* Nat Genet **1995**; 10:11-12.

Rüschoff J, Dietmaier W, Bocker T, Wallinger S, Kullmann F, Beham A, Hofstädter F: *Molecular cancer disposition diagnosis exemplified by colorectal carcinoma. What is the contribution of pathology?* Pathologe **1998**; 19:269-278.

Sambrook J, Russel D: *Molecular Cloning: A Laboratory Manual.* Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY, Cold Spring Harbor, NY. 3. Auflage **2001**.

San Miguel Fraile P, Antón Badiola I, Ortiz Rey JA, Alvarez Alvarez C, Fernández Costas A, Lago Fernández M, Pelaez Boismorand E, Zungri Telo E, De La Fuente Buceta A: *Comparative study of expression of p53, ki-67, bcl-2 and CK20 in superficial transitional carcinoma of the bladder: correlation with recurrence histological grade, and clinical stage.* Actas Urol Esp **2003**; 27:587-593.

Sarkis AS, Dalbagni G, Cordon-Cardo C, Zhang ZF, Sheinfeld J, Fair WR, Herr HW, Reuter VE: *Nuclear overexpression of p53 protein in TCC: a marker for disease progression.* J Natl Cancer Inst **1993**; 85:53-59.

Sauter G, Deng G, Moch H, Kerschmann R, Matsumura K, De Vries S, George T, Fuentes J, Carroll P, Mihatsch MJ: *Physical deletion of the p53 gene in bladder cancer. Detection by fluorescence in situ hybridization.* Am J Pathol **1994**; 144:756-766.

Sauter G, Moch H, Carroll P, Kerschmann R, Mihatsch MJ, Waldman FM: *Chromosome-9 loss detected by fluorescence in situ hybridization in bladder cancer.* Int J Cancer **1995**; 64:99-103.

Sauter G, Simon R, Bubendorf L, Mihatsch M: *Molecular genetics of urinary bladder cancer progression.* Verh Dtsch Ges Pathol **2002**; 86:49-56.

Sauter G, Algaba F, Amin M, Busch C, Chevillet J, Gasser T, Grignon DJ, Hofstädter F, Lopez-Beltran A, Epstein JI: *Tumours of the urinary system: non-invasive urothelial neoplasias.* In: Eble JN, Sauter G, Epstein JI, Sesterhenn I (Hrsg.): *WHO classification of tumours of the urinary system and male genital organs.* Lyon: IARCC Press **2004**:89-157.

Schmitz-Dräger BJ, Goebell PJ, Ebert T, Fradet Y: *p53 immunohistochemistry as prognostic marker in bladder cancer. Playground for urology scientists?* Eur Urol **2000**; 38:691-699; discussion 700.

Schwarz S, Rechenmacher M, Lottner C, Brockhoff G, Hartmann A, Langer S, Knüchel R: *FISH analysis in the differential diagnosis of flat urothelial lesions using tissue microarrays.* Verh Dtsch Ges Pathol **2004**; 88:184-193.

Seitz M, Zaak D, Knüchel-Clarke R, Stief C: *Urinary bladder tumours. The new 2004 WHO classification.* Urologe A **2005**; 44:1073-1086.

Sengeløv L, Christensen M, von der Maase HD, Horn T, Marcussen N, Kamby C, Orntoft T: *Loss of heterozygosity at 1p, 8p, 10p, 13q, and 17p in advanced urothelial cancer and lack of relation to chemotherapy response and outcome.* Cancer Genet Cytogenet **2000**; 123:109-113.

Serth J, Kuczyk MA, Paeslack U, Lichtinghagen R, Jonas U: *Quantitation of DNA extracted after micropreparation of cells from frozen and formalin-fixed tissue sections.* Am J Pathol **2000**; 156:1189-1196.

Shibata A, Ohneseit PF, Tsai YC, Spruck CH 3rd, Nichols PW, Chiang HS, Lai MK, Jones PA: *Mutational spectrum in the p53 gene in bladder tumors from the endemic area of black foot disease in Taiwan.* Carcinogenesis **1994**; 15:1085-1087.

Sibley K, Cuthbert-Heavens D, Knowles MA: *Loss of heterozygosity at 4p16.3 and mutation of FGFR3 in transitional cell carcinoma.* Oncogene **2001a**; 20:686-691.

Sibley K, Stern P, Knowles MA: *Frequency of fibroblast growth factor receptor 3 mutations in sporadic tumours.* Oncogene **2001b**; 20:4416-4418.

Siracusano S, Niccolini B, Knez R, Tiberio A, Benedetti E, Bonin S, Ciciliato S, Pappagallo GL, Belgrano E, Stanta G: *The simultaneous use of telomerase, cytokeratin 20 and CD4 for bladder cancer detection in urine.* Eur Urol **2005**; 47:327-333.

Skacel M, Fahmy M, Brainard JA, Pettay JD, Biscotti CV, Liou LS, Procop GW, Jones JS, Ulchaker J, Zippe CD, Tubbs RR: *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**; 169:2101-2105.

Solsana E, Iborra I, Dumont R, Rubio-Briones J, Casanova J, Almenar S: *The 3-month clinical response to intravesical therapy as a predictive factor for progression in patients with high risk superficial bladder cancers.* J Urol 2000;164(3 Pt 1):685-689. Comment in: J Urol **2000**; 164 (3 Pt 1):690-691.

Southgate J, Harnden P, Trejdosiewicz LK: *Cytokeratin expression patterns in normal and malignant urothelium: a review of the biological and diagnostic implications.* Histol Histopathol **1999**; 14:657-664

Soussi T: *p53 alterations in human cancer: more questions than answers.* Oncogene **2007**; 26:2145-2156.

Stavropoulos NE, Filliadis I, Ioachim E, Michael M, Mermiga E, Hastazeris K, Nseyo UO: *CD44 Standard form expression as a predictor of progression in high risk superficial bladder tumors.* International Urology and Nephrology **2001**; 33:479-483.

Stöhr R: *Molekulargenetisch-histopathologische Kartierung humaner Harnblasen zur Klärung von Entstehung und Progression des Urothelkarzinoms.* Regensburg, Univ., Diss., **2002**.

Stöhr R, Wissmann C, Suzuki H, Knüchel R, Krieg RC, Klopocki E, Dahl E, Wild P, Blaszyk H, Sauter G, Simon R, Schmitt R, Zaak D, Hofstädter F, Rosenthal A, Baylin SB, Pilarsky C, Hartmann A: *Deletions of chromosome 8p and loss of sFRP1 expression are progression markers of papillary bladder cancer.* Lab Invest **2004**; 84:465-478.

Stryer L: *Biochemie*. Spektrum akademischer Verlag, Heidelberg - Berlin - Oxford. 4. Auflage **1996**; 127-139.

Takle LA, Knowles MA: *Deletion mapping implicates two tumor suppressor genes on chromosome 8p in the development of bladder cancer*. *Oncogene* **1996**; 12:1083-1087.

Thalmann GN, Markwalder R, Shahin O, Burkhard FC, Hochreiter WW, Studer UE: *Primary TIG3 bladder cancer: organ preserving approach or immediate cystectomy?* *J Urol* **2004**; 172:70-75.

Thalmann GN: *Organ preservation for TIG3 bladder cancer: is it feasible?* *Eur Urol* **2008**; 53:27-29. Comment on: *Eur Urol* 2008; 53:146-152.

Thomas DJ, Robinson MC, Charlton R, Wilkinson S, Shenton BK, Neal DE: *P53 expression, ploidy and progression in pT1 transitional cell carcinoma of the bladder*. *Br J Urol* **1994**; 73:533-537.

Tischfield JA: *Loss of heterozygosity or: how I learned to stop worrying and love mitotic recombination*. *Am J Hum Genet* **1997**; 61:995-999.

Toktaş G, Türkeri LN, Ünlüer E, Atug F, Murat C, Özveren B, Caliskan M, Akdas A: *Prognostic Significance of p53 Protein Accumulation in Stage pT1 Transitional Cell Carcinoma of the Bladder*. *Int Urol Nephrol* **1999**; 31:437-441.

Toma V, Hauri D, Schmid U, Ackermann D, Maurer R, Alund G, Knönagel H, Rist M, Gasser TC, Sauter G, Roth J: *Focal Loss of CD44 Variant Protein Expression is related to Recurrence in Superficial Bladder Carcinoma*. *Am J Pathol* **1999**; 155:1427-1432.

Torhorst J, Bucher C, Kononen J, Haas P, Zuber M, Köchli OR, Mross F, Dieterich H, Moch H, Mihatsch M, Kallioniemi OP, Sauter G: *Tissue microarrays for rapid linking of molecular changes to clinical endpoints* *Tissue microarrays for rapid linking of molecular changes to clinical endpoints*. *Am J Pathol* **2001**; 159:2249-2256.

Tosoni I, Wagner U, Sauter G, Egloff M, Knönagel H, Alund G, Bannwart F, Mihatsch MJ, Gasser TC, Maurer R: *Clinical significance of interobserver differences in the staging and grading of superficial bladder cancer*. *BJU Int* **2000**; 85:48-53.

Tzai TS, Chen HH, Chan SH, Ho CL, Tsai YS, Cheng HL, Dai YC, Lin JS, Yang WH, Chow NH: *Clinical significance of allelotyping for urothelial carcinoma*. *Urology* **2003**; 62:378-384.

Uchida T, Uchida T, Wada C, Ishida H, Wang C, Egawa S, Yokoyama E, Kameya T, Koshiha K: *p53 mutations and prognosis in bladder tumors*. *J Urol* **1995**; 153:1097-1104.

Vatne V, Maartmann-Moe H, Hoestmark J: *The prognostic value of p53 in superficially infiltrating transitional cell carcinoma*. *Scand J Urol Nephrol* **1995**; 29:491-495.

Vet JA, Bringuier PP, Schaafsma HE, Witjes JA, Debruyne FM, Schalken JA: *Comparison of p53 protein overexpression with p53 mutation in bladder cancer: clinical and biologic aspects*. *Lab Invest* **1995**; 73:837-843.

Viola MV, Fromowitz F, Oravez S, Deb S, Schlom J: *ras Oncogene p21 expression is increased in premalignant lesions and high grade bladder carcinoma.* J Exp Med **1985**; 1;161:1213-1218.

Wagner U, Bubendorf L, Gasser TC, Moch H, Görög JP, Richter J, Mihatsch MJ, Waldman FM, Sauter G: *Chromosome 8p deletions are associated with invasive tumor growth in urinary bladder cancer.* Am J Pathol **1997**; 151:753-759.

Wallerand H, Bakkar AA, de Medina SG, Pairon JC, Yang YC, Vordos D, Bittard H, Fauconnet S, Kouyoumdjian JC, Jaurand MC, Zhang ZF, Radvanyi F, Thiery JP, Chopin DK: *Mutations in TP53, but not FGFR3, in urothelial cell carcinoma of the bladder are influenced by smoking: contribution of exogenous versus endogenous carcinogens.* Carcinogenesis **2005**; 26:177-184.

Watters AD, Stacey MW, Going JJ, Grigor KM, Cooke TG, Sim E, Bartlett JMS: *Genetic Aberrations of NAT2 and Chromosom 8: Their Association with Progression in Transitional Cell Carcinoma of the Urinary Bladder.* Urol Int **2001**; 67:235-239.

Wheless LL, Reeder JE, Han R, O'Connell MJ, Frank IN, Cockett AT, Hopman AH: *Bladder irrigation specimens assayed by fluorescence in situ hybridization to interphase nuclei.* Cytometry **1994**; 17:319-326.

Wolf HK, Stöber C, Hohenfellner R, Leissner J: *Prognostic Value of p53, p21/WAF1, Bcl-2, Bax, Bak and Ki-67 Immunoreactivity in pT1 G3 Urothelial Bladder Carcinomas.* Tumor Biology **2001**; 22:328-336.

Wright C, Mellon K, Johnston P, Lane DP, Harris AL, Horne CHW, Neal DE: *Expression of mutant p53, c-erbB-2 and the epidermal growth factor receptor in transitional cell carcinoma of the human urinary bladder.* Br J Cancer **1991**; 63:967-970.

Yu DS, Chen HI, Chang SY: *Chromosomal aberrations in transitional cell carcinoma: its correlation with tumor behavior.* Urol Int **2002**; 69:129-135.

Zellweger T, Benz G, Cathomas G, Mihatsch MJ, Sulser T, Gasser TC, Bubendorf L: *Multi-target fluorescence in situ hybridization in bladder washings for prediction of recurrent bladder cancer.* Int J Cancer **2006**; 119:1660-1665.

Zieger K, Dyrskjøt L, Wiuf C, Jensen JL, Andersen CL, Jensen KM, Ørntoft TF: *Role of activating fibroblast growth factor receptor 3 mutations in the development of bladder tumors.* Clin Cancer Res **2005**; 11:7709-7719.

Fa. **Zytomed**, Berlin (Hrsg): *Handbuch, Erstellung eines Paraffinblocks mit multiplen Gewebeproben.* online im Internet: URL: www.multiblock.de/download/handbuch.pdf. (Stand: 03.04.2009)

7 Anhang

7.1 Abkürzungsverzeichnis

Soweit die Abkürzungen nicht schon in den Legenden der im Text enthaltenen Abbildungen und Tabellen erläutert sind, seien sie hier erklärt:

°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µL	Mikroliter
µm	Mikrometer
A	Adenin
A. H.	Prof. Dr. med. Arndt Hartmann
Abb.	Abbildung
Ag	Argentum (Silber)
Ala	Alanin
APS	Ammoniumpersulfat
Arg	Arginin
bp	Basenpaar(e)
BSA	Bovines Serum-Albumin (Rinderserum-Albumin)
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
c	concentration (Konzentration)
CA	California (Kalifornien)
Ca	Carcinom, Karzinom
ca.	circa, zirka
CGH	Comparative Genome Hybridization (vergleichende Genomhybridisierung)
CIS	Carcinoma in situ
CK20	Cytokeratin 20
cm	Zentimeter
CSS	cancer-specific survival (tumorspezifisches Überleben)
Cys	Cystein
d. h.	das heißt

dATP	2'-Desoxyadenosin-5'-Triphosphat
dCTP	2'-Desoxycytidin-5'-Triphosphat
ddNTP	Didesoxyribonukleosid-Triphosphat
dest.	destillata (destilliert)
dGTP	2'-Desoxyguanosin-5'-Triphosphat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	deoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)
dNTP	Desoxyribonukleosid-Triphosphat
dTTP	2'-Desoxythymidin-5'-Triphosphat
EDTA	Ethylendiamin-Tetraacetat
EDV	Elektronische Datenverarbeitung
EORTC	European Organisation for Research and Treatment of Cancer (Europäische Organisations für Krebserforschung und -behandlung)
et al.	et alteri (und andere)
evtl.	eventuell
F	forward (vorwärts)
Fa.	Firma
FISH	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung
FGFR3	Fibroblast Growth Factor Receptor 3 (Fibroblastenwachstumsfaktor-Rezeptor 3)
G (+Zahl)	Grading, histologisches
G (ohne Zahl)	Guanin
g	Gramm
G ₀ / G ₁ / G ₂	Ruhephase / postmitotische Wachstumsphase / prämitotische Wachstumsphase (im Zellzyklus)
Glu	Glutamat
Gly	Glycin
h	Stunde(n)
HCl	Salzsäure, Wasserstoffchlorid
H ₂ O	Wasser
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HE	Hämatoxylin-Eosin
His	Histidin
HNPCC	Hereditary non-polyposis colorectal cancer

	(erbliches nich-polypöses Kolorektalkarzinom)
Hrsg.	Herausgeber
IARC	International Agency for Research on Cancer (Internationale Agentur für Krebsforschung)
i. Br.	im Breisgau
IHC	Immunhistochemie
IL	Illinois
ISUP	International Society for Urothology (internationale Gesellschaft für Urothologie)
kb	Kilobasenpaar(e)
kD	Kilodalton
L	Liter
Leu	Leucin
LOH	Loss of Heterozygosity (Verlust der Heterozygotie)
Lys	Lysin
M	Mitosephase (im Zellzyklus)
M (nach Zahlen)	molar(e)
mA	Milliampere
MeOH	Methanol
Met	Methionin
mg	Milligramm
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
min	Minute(n)
mL	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimolar(e)
MS	Mississippi
MSI	Mikrosatelliteninstabilität
mut.	mutiert
n	Anzahl
N	Normalgewebe (bei der Silbergelauwertung)
NA	not available, nicht amplifizierbar
na	nicht auswertbar
NaCl	Natriumchlorid

Na ₂ CO ₃	Natriumcarbonat
NaOH	Natronlauge
NAT	N-Acetyltransferase
ng	Nanogramm
NI	nicht informativ
nm	Nanometer
NO	normales CK20-Färbemuster (nur die "umbrella cells" gefärbt)
NP40	Nonidet P40
Nr.	Nummer
NY	New York
o. g.	oben genannte/r/s
OT	Objektträger
p (= x)	Irrtumswahrscheinlichkeit (Statistik)
p (nach einer Zahl)	kurzer Chromosomenarm
p. a.	pro analysi (Reinheit entsprechend der Anforderung „zur Analyse“)
PAA	Polyacrylamid
PBS	phosphate buffered saline (Phosphat gepufferte Saline)
PCR	Polymerase Chain Reaction (Polymerasekettenreaktion)
PEG	Polyethylenglykol
PEP-PCR	Primer-Extensions-Präamplifikations-PCR
pH	pondus hydrogenii, (negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration)
Phe	Phenylalanin
pmol	Pikomol
Pro	Prolin
pT	pathologisch gesicherter Tumor
pT1-4	invasive Urothelkarzinome
pTa	papillär-oberflächliches Urothelkarzinom
PUC	Papillary Urothelial Carcinoma (papilläres Urothelkarzinom)
PUNLMP	Papillary Urothelial Neoplasm of Low Malignant Potential, (papilläre urotheliale Neoplasie mit niedrig malignem Potential)
q (nach einer Zahl)	langer Chromosomenarm
R	reverse (rückwärts)
RB	Retinoblastoma-Gen

RFLP	Restriktionsfragment-Längenpolyphormismus/-en
RFS	recurrence-free survival (rezidivfreies Überleben)
rpm	revolutions per minute (Umdrehungen pro Minute)
s	Sekunde
S	Synthesephase (im Zellzyklus)
S. B.	Dr. med. Simone Bertz
s. o.	siehe oben
s. u.	siehe unten
Ser	Serin
sog.	sogenannte/r/s
T	Thymidin; Thymin
Tab.	Tabelle
TAE	Tris/Acetat/EDTA
Taq	Thermus aquaticus
TBE	Tris/Borat/EDTA
TEMED	Tetramethyl-Ethylendiamin
Thr	Threonin
TMA	Tissue-Micro-Array (Block mit multiplen Gewebeproben)
TNM	Tumor, Nodus, Metastase; (Tumorgröße, Lymphknotenbefall, Metastasen)
Tris	Trishydroxymethyl-Aminomethan
Trp	Tryptophan
TUR-B	transurethrale Resektion von Blasengewebe
TX	Texas
Tyr	Tyrosin
U	Unit/s (Aktivitätseinheit/en)
u.	und
u. a.	unter anderem
u./o.	und / oder
USA	United States of America (Vereinigte Staaten von Amerika)
usw.	und so weiter
V	Volt
v. a.	vor allem
Val	Valin

vgl.	vergleiche
vs.	versus (gegen)
W	Watt
WA	Washington
WHO	World Health Organization (Weltgesundheitsorganisation)
WI	Wisconsin
wt	wildtyp
z. B.	zum Beispiel
z. T.	zum Teil

7.2 Danksagung

Herrn Prof. Dr. med. Ferdinand Hofstädter, dem Ordinarius des Instituts für Pathologie der Universität Regensburg, für die Überlassung der Räumlichkeiten und des Equipments.

Herrn Prof. Dr. med. Arndt Hartmann als Doktorvater für die Überlassung dieses Themas und die gute Betreuung trotz der neuen Stelle ab 2007 als Ordinarius am Institut für Pathologie der Universität Erlangen.

Herrn Dr. rer. nat. Robert Stöhr, der seit Herbst 2007 ebenfalls in Erlangen arbeitet, für die gute Betreuung und die unkomplizierte Telefonberatung aus Erlangen.

Den MTAs Monika Kerscher, Nina Nießl, Andrea Schneider, Anne Pietryga und Rudi Jung. Ein herzlicher Dank für das Erlernen der Techniken und die Einführung in die Methodik. Trotz des Routinelabors fanden sie Zeit, Hilfestellungen zu leisten.

Frau Dr. med. Simone Bertz vom Institut für Pathologie Regensburg, inzwischen am Institut für Pathologie Trier, für die gute Beratung und Hilfestellung bei der Erstellung der Immunhistochemie-Bilder.

Herrn PD Dr. med. Stefan Denzinger (Caritas-Krankenhaus St. Josef, Urologische Universitätsklinik) für das zur Verfügung Stellen der klinischen Follow-up-Daten der Patienten und die Einweisung in die Erstellung von Kaplan-Meier-Berechnungen in SPSS.

Herrn Dr. med. Peter Johannes Wild, der trotz der weiten Entfernung am Institut für Pathologie in Zürich schnell und kompetent meine Fragen beantwortete.

Herrn PD Dr. med. Jörg Marienhagen vom Institut für Nuklearmedizin der Universität Regensburg für die konstruktive kritische biostatistische Beratung in der neu eingerichteten „Biometrischen Promotionsprechstunde“. Diese Sprechstunde kann nur empfohlen werden.

Herrn Dr. Helge Knüttel für die Anregungen bei der Literaturrecherche.

Last, but not least, meiner Ehefrau Mirjam, der Familie und den Freunden, die mich die doch so lange Zeit hervorragend begleitet haben.

7.3 Lebenslauf

7.4 Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt wurde. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet.

Insbesondere habe ich nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- bzw. Beratungsdiensten (Promotionsberater oder andere Personen) in Anspruch genommen. Niemand hat von mir unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeit erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen.

Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Ort, Datum

Johann Lermer