

AUS DER ABTEILUNG
FÜR PATHOLOGIE
PROF. DR. HOFSTÄDTER
DER MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

Untersuchung molekularer Prognosefaktoren beim Urothelkarzinom der
Harnblase mit Gewebemikroarrays

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Medizinischen Fakultät
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Elke Roßkopf

2010

AUS DER ABTEILUNG
FÜR PATHOLOGIE
PROF. DR. HOFSTÄDTER
DER MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

Untersuchung molekularer Prognosefaktoren beim Urothelkarzinom der
Harnblase mit Gewebemikroarrays

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Medizinischen Fakultät
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Elke Roßkopf

2010

Dekan:	Prof. Dr. med. Bernhard Weber
1. Berichterstatter:	Prof. Dr. med. Arndt Hartmann
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. med. Wolf Ferdinand Wieland
Tag der mündlichen Prüfung:	25.08.2011

Inhaltsverzeichnis:

1. Einleitung	1
1.1. Tumordefinition	1
1.2. Das Tumorzentrum Regensburg	1
1.3. Das Harnblasenkarzinom	1
1.3.1. Epidemiologie	1
1.3.2. Ätiologie	2
1.3.3. Klinik	4
1.3.4. Tumorausbreitung und –staging	4
1.3.5. Histopathologie	6
1.3.6. Genetik	6
1.3.7. Onkogene	7
1.3.8. Tumorsuppressorgene	8
1.3.9. prognostische und prädiktive Faktoren	9
1.4. Nicht-infiltrierende Läsionen der Harnblase	11
1.4.1. urotheliale Papillome	11
1.4.2. invertierte Papillome	12
1.4.3. Papilläre urotheliale Neoplasien von geringer maligner Potenz	12
1.4.4. Nicht-invasive papilläre Urothelkarzinome, niedriggradig	13
1.4.5. Nicht-invasive papilläre Urothelkarzinome, hochgradig	13
1.4.6. Urotheliales Carcinoma in situ	13
1.5. Genetische und prädiktive Faktoren	14
1.5.1. Chromosomale Abnormitäten	15
1.5.2. FGF Rezeptor 3	15
1.5.3. p53	15
1.5.4. Ki67	16
1.5.5. HER2 und EGFR	16
1.5.6. CK20	16
1.5.7. prognostische und prädiktive Faktoren	17
1.6. Der Gewebemikroarray	17
1.7. Fragestellung	18
2. Material und Methoden	19
2.1. Datenerhebung	19
2.2. Gewebemikroarray	21
2.3. Verwendete Materialien und Reagenzien	23
2.4. Immunhistochemie	25
2.5. FGFR3 Mutationsanalyse	27
2.6. Statistik	34
3. Ergebnisse	35
4. Diskussion	41
5. Zusammenfassung	46
6. Literaturverzeichnis	47
7. Eidesstattliche Erklärung	53

1. Einleitung:

1.1 Tumordefinition

Das Wort „Tumor“ ist die lateinische Bezeichnung für eine Geschwulst, eine örtlich umschriebene Volumenzunahme des Gewebes. Im engeren Sinn ist ein Tumor eine gewebliche Neubildung (Neoplasie) in Form eines spontanen, verschiedenartig enthemmten, autonomen und irreversiblen Überschußwachstums von körpereigenem Gewebe, das in der Regel mit unterschiedlich ausgeprägtem Verlust spezifischer Gewebs- und Zellfunktionen einhergeht [53]. Man unterscheidet benigne (gutartige) Tumore von malignen (bösartige) Tumore. Die Wichtigkeit in der Erfassung und Unterscheidung dieser Tumore liegt in den unterschiedlichen Therapiemöglichkeiten und Prognosefaktoren, die den Patienten entsprechend erwarten.

1.2 Das Tumorzentrum Regensburg

Das Tumorzentrum Regensburg e. V. besteht seit 12 Jahren und dokumentiert verlaufsbegleitend 350 niedergelassene Ärzte, vertreten durch die Kassenärztliche Vereinigung Bayern, 23 regionale Krankenhäuser und alle Abteilungen des Universitätsklinikums Regensburg. Seit 1991 sind über 48.000 Tumorpatientenverläufe von der Diagnose bis zur Nachsorge dokumentiert. Anhand der vorhandenen Daten werden Versorgungsanalysen für einzelne Tumorentitäten dargestellt und Rückmeldungen an die Ärzte, sowohl für die Versorgung der gesamten Oberpfalz, als auch für ihren eigenen Tätigkeitsbereich gesandt.

Seit 1998 werden auch Aufgaben eines epidemiologischen Krebsregisters übernommen; zunächst nur für die Oberpfalz, seit 2002 auch für Teile Nieder- und Oberbayerns. Weiterhin werden Studien und Forschungsprojekte durchgeführt [www.Tumorzentrum-Regensburg.de].

1.3 Das Harnblasenkarzinom

1.3.1 Epidemiologie

Das Harnblasen-Karzinom steht weltweit an siebter Stelle der malignen Tumoren, wobei jährlich 260.000 neue Fälle bei Männern und 76.000 bei Frauen geschätzt werden. Das sind ca. 3,2% aller Krebsfälle weltweit, wobei das Verhältnis zwischen betroffenen Männern und Frauen 3,5:1 beträgt und die Länder West-Europas, Nord-Amerikas und Australiens die

höchste Inzidenzrate aufweisen. Generell kann man sagen, dass das Harnblasenkarzinom in Industrie-Ländern annähernd sechsmal häufiger ist als in den sogenannten Entwicklungsländern. In Deutschland erkrankten nach Schätzungen des Robert-Koch-Institutes von 1998 jährlich ca. 10.546 Männer und 5190 Frauen am Harnblasenkarzinom, von denen die meisten in die Altersgruppe ab 75 Jahren fallen.

Das Urothelkarzinom ist der häufigste Subtyp des Harnblasenkarzinoms der Industrieländer mit mehr als 90% der Fälle in den USA, Frankreich und Italien. Es liegt laut der achten Ausgabe der „Cancer Incidence in Five Continents“ bei 84% der männlichen und bei 79% der weiblichen Betroffenen vor.

Weitere Subtypen des Harnblasenkarzinoms sind das Plattenepithelkarzinom und das Adenokarzinom, deren Häufigkeiten jedoch weit hinter dem des urothelialen Karzinoms liegen. Schätzungsweise 70-80% der Patienten mit neu diagnostiziertem Harnblasenkarzinom sind an einem nicht-invasiven oder früh-invasiven (Stadium pTa oder pT1) Urothelkarzinom erkrankt.

1.3.2 Ätiologie

Verschiedene Risikofaktoren haben sich herauskristallisiert, die zur Entstehung eines Harnblasenkarzinoms beitragen können [20]. Als wichtigste Risikofaktoren sollen hier das Rauchen von Zigaretten und die gelegentliche Exposition gegenüber aromatischen Aminen hervorgehoben werden:

1.3.2.1 Rauchen

Das Rauchen von Tabak stellt den größten Risikofaktor bei der Entstehung eines Harnblasenkarzinoms dar. Es steigert das Erkrankungsrisiko, welches auch abhängig von der Dauer und der Intensität des Nikotinabusus ist, um schätzungsweise 66% für Männer und 30% für Frauen. Raucher erkrankten 2-6-mal häufiger als Nicht-Raucher. So steigt das Harnblasenkarzinom-Risiko eines Patienten, der sehr lange (60 Jahre und mehr) geraucht hat bei Männern um das Sechsfache, bei Frauen um das Fünffache an. Die Intensität steigert das Risiko ähnlich, jedoch geschlechtsunabhängig. Das Risiko an einem Harnblasenkarzinom zu Erkranken stagniert nach Expositionsende und ist nach ca. 15 jährigem Belastungsstop wieder ungefähr so groß wie bei der nicht rauchenden Vergleichsgruppe.

1.3.2.2 Gelegentliche Belastungen

Bereits 1895 erkrankten Arbeiter in Anilin verarbeitenden Färbereien überdurchschnittlich häufig an Harnblasenkarzinom. Es wurde erforscht, dass die auslösenden Substanzen

aromatische Amin-Benzidine und 1-Naphtylamine sind und eine Belastung in einem Viertel aller Harnblasenkarzinome der Karzinomentstehung vorausgeht [21].

1.3.2.3 Medikamente

In einigen epidemiologischen Studien hat sich herausgestellt, dass das relative Harnblasenkarzinom-Risiko bei einem chronischen Missbrauch Phenacetin-haltiger Analgetika um ca. 2,4 bis 6-fach ansteigt. Das Zytostatikum Cyclophosphamid steigert nicht nur das Risiko für die Entwicklung von Leukämien und Lymphomen sondern auch von Plattenepithelkarzinomen und Sarkomen; besonders von Leiomyosarkomen [22]. Ähnlich verhält es sich auch mit einer Behandlung mit Chlornaphzin.

1.3.2.4 Chronische Infektionen

Chronische Zystitiden, Urogenitalinfektionen und Urogenitaltraktsteine irritieren das Blasenepithel mechanisch. Dies scheint das Risiko, an einem Urothel-Ca zu erkranken, zu erhöhen.

1.3.2.5 Arsen

Der Genuss von mit Arsen oder dessen Beiprodukten verseuchtem Trinkwasser erhöht das Harnblasenkarzinom-Risiko ebenfalls [23]. Dies wurde in epidemiologischen Studien in Chile und Taiwan, wo große Bevölkerungsgruppen arsenhaltigem Trinkwasser exponiert waren, bestätigt.

Tabelle 1.1: Alphabetische Auflistung von kanzerogenen Stoffen und Gemischen, die mit Harnblasen-Karzinomen in Verbindung gebracht werden

Aluminium Produktion
4-Aminobiphenyl
Analgetika, die Phenacetin enthalten
Arsen in Trinkwasser
Auramine Herstellung
Benzidine
Chlornaphzine
Coal gasification
Coal-tar pitch
Gummi-Industrie
Cyclophosphamide
Magenta Herstellung
2-Naphtylamine
Schistosoma haematobia (Infektionen)
Rauchen

1.3.3 Klinik

Obgleich Art und Schwere der klinischen Symptome des invasiven Harnblasenkarzinoms von Ausmaß und Lokalisation des Tumors abhängen, weisen die meisten Patienten zumindest eine Mikrohämaturie auf [24]. In 85% der Fälle liegt eine schmerzlose Makrohämaturie vor, der eine Gerinnung des Blutes und dann eine Dysurie folgen kann [25]. Die Blasenkapazität kann bei ausgedehnten Tumorbefunden eingeschränkt sein, was eine Erhöhung der Miktionsfrequenz zur Folge hat. Ebenso kann es zu lokalen Irritationen kommen, die von Tumor zu Tumor unterschiedlich sein können. Tumoren, welche die Urethraöffnung infiltrieren haben eine schlechte Prognose, da sie zu einer Hydronephrose führen können.

Bei sehr ausgedehnten Befunden kann der Tumor im Beckenbereich tastbar werden und zu Ödemen der unteren Extremitäten führen. Treten im fortgeschrittenen Verlauf der Krankheit Metastasen auf, führen diese häufig zu Gewichtsverlust und Knochenschmerzen.

Die durch Sonographie oder Computertomographie angenommene Verdachtsdiagnose eines Harnblasenkarzinoms wird durch eine Zystoskopie gesichert. Durch eine tief in der Muskularis propria durchgeführte Resektion erfolgt die histologische Diagnose. Während ein Teil der Patienten mit früh-invasiven Tumoren (im Stadium pT1) durch repetitive transurethrale Resektion und eine Installationstherapie mit BCG therapiert werden, erhalten Patienten mit ausgedehnteren Befunden (\geq pT2) meist eine Zystektomie. Bei der Zystektomie wird die Harnblase operativ entfernt. Man unterscheidet die totale von der erweiterten Zystektomie, wobei zum einen die gesamte Harnblase mit Umpflanzung der Ureteren in den Darm oder die Haut und bei der erweiterten Methode noch zusätzlich beim Mann die Prostata, die Bläschendrüsen und bei der Frau der Uterus, zwei Drittel der Urethra mit anliegendem Abschnitt der vorderen Vaginalwand entfernt werden.

1.3.4 Tumorausbreitung (Staging)

1.3.4.1 T-Kategorie (Ausbreitung des Primär-Tumors)

Während die Zystoskopie eine eher untergeordnete Rolle bei der Stadieneinteilung spielt [26], ist die transurethrale Resektion der Blase (TURB) von allen sichtbaren Läsionen eine exakte Möglichkeit zur Bestimmung der Tiefeninfiltration bei pT1 und pT2 Tumoren. Hierbei darf man Tumor infiltrierendes Muskelgewebe nicht mit einer Invasion der Muskularis propria gleichstellen, da in der Lamina propria regelmäßig feine Muskelstränge anwesend sind. Ebenso wenig ist Tumor-infiltriertes Fettgewebe nicht immer ein Zeichen für extravesikale Ausbreitung, da Fettgewebe in allen Schichten der Blasenwand vorhanden sein kann [27]. Bei

großen pTa und allen pT1 Tumoren werden ca. 6 Wochen nach der ersten Resektion Re-Biopsien durchgeführt.

Die Rolle der intravenösen Pyelographie zum Erfassen gleichzeitiger Tumoren des oberen Harntrakts und/oder der ureteralen Obstruktion wird kontrovers diskutiert. Die Genauigkeit der bildgebenden Verfahren (Computertomographie (CT), Magnetresonanztomographie (MRT), Positronenemissionstomographie) um das T-Stadium festzulegen ist limitiert [28, 29, 30].

1.3.4.2 N-Kategorie (Regionale Lymphknotenmetastasen)

Sensitivität und Spezifität von MRT und CT zur Stadieneinteilung ist begrenzt. Die Lymphknotenvergrößerung spielt weiterhin eine große prognostische Rolle bei der Vorhersage von Lymphknoten-Metastasen. Es gibt auch die Möglichkeit einer CT-gesteuerten Feinnadel-Biopsie von Lymphknoten. Bei Lymphknotenbefall ist die Becken-Lymphknotenentfernung bis zur Aortenbifurkation die Methode der Wahl [31], wobei deren Modifizierungen noch erprobt werden.

1.3.4.3 M-Kategorie (Fernmetastasen)

Metastasen in der Lunge werden durch Röntgen solche in der Leber durch Ultraschall, CT oder MRT und in Knochen bei symptomatischen Patienten anhand einer Skelettszintigraphie festgestellt. Vor einer Zystektomie bei pT1-Tumoren wird eine M-Stadieneinteilung empfohlen.

Tabelle 1.2 Klassifikation der Tumoren durch die Weltgesundheitsorganisation (WHO)

TNM-Klassifikation nach WHO (6. Auflage 2002)		
pT		Primärtumor
	X	Primärtumor kann nicht beurteilt werden
	0	Kein Primärtumor nachweisbar
	a	Nicht-invasiver papillärer Tumor
	Is	Carcinoma in situ
	1	Tumor infiltriert Lamina propria
	2	Tumor infiltriert Lamina mucosa
	2a	Infiltration des oberflächlichen Muskelschicht („innerer Anteil“)
	2b	Infiltration der tiefen Muskelschicht („äußerer Anteil“)
	3	Tumor infiltriert das perivesicale Gewebe
	3a	Mikroskopisch
	3b	Makroskopisch
	4	Infiltration eines/mehrerer folgender Organe: Prostata, Uterus, Vagina, Beckenwand, Bauchwand

	4a	Tumor infiltriert Prostata, Vagina oder Uterus
	4b	Tumor infiltriert Becken- oder Bauchwand
N		Regionale Lymphknoten
	X	Regionale Lymphknoten nicht beurteilbar
	0	Keine regionalen Lymphknoten-Metastasen
	1	< 2cm große Solitärmetastase
	2	< 5cm große Solitärmetastase oder multiple Metastasen (keine > 5cm)
	3	> 5cm große Lymphknotenmetastasen
M		Fernmetastasen
	X	Fernmetastasen nicht beurteilbar
	0	Keine Fernmetastasen
	1	Fernmetastasen vorhanden

1.3.5 Histopathologie

Es wird hierbei zwischen papillären und soliden Tumoren unterschieden. Die weitere Einstufung erfolgt als low oder high anhand der Anzahl nukleärer Anaplasien und architektonischer Anormalitäten [32], wobei auch eine relativ normale Zytologie vorliegen kann. Besonders wichtig ist auch die Kenntnis über Vorhandensein und Ausmaß der Invasion. Bei pT1 Tumoren werden invasive Zellen als Nester oder Einzelzellen innerhalb des papillären Stromas oder der Lamina propria beschrieben. Das Ausmaß der Invasion in die Lamina propria bei pT1 Tumoren sollte kategorisiert werden, da die Tiefe der Infiltration als prognostischer Marker beurteilt wird.

Probleme beim Erkennen der Invasion von Lamina und Muskularis propria können sich aus tangentialen Anschnitten im histologischen Präparat, thermalen und mechanischen Verletzungen, ausgeprägten entzündlichen Infiltraten oder ausgedehnt wachsenden Tumormassen ergeben.

Spezielle histologische Merkmale gibt es beim infiltrativen Harnblasenkarzinom nicht. Es zeigen sich jedoch infiltrierende zusammenhaftende Zellnester mit mäßig bis reichlich amphophilem Zytoplasma und großen hyperchromatischen Zellkernen. Die Zellkerne sind typischerweise pleomorph, zeigen abnormale Konturen und vergrößerte Nukleolen [34]. Im Bereich des invasiven Tumors sieht man eine desmoplastische Reaktion des Stromas. Diese Entzündungsreaktion kann für gewöhnlich leicht und fokal begrenzt sein oder aber schwerwiegend, dicht und ausgedehnt ausfallen.

1.3.6 Genetik

Das Harnblasenkarzinom wird nicht als familiäre Erbkrankheit angesehen, obwohl des Öfteren von familiär gehäuftem Auftreten berichtet wurde [35]. Auf genetischer Basis

unterscheidet sich das invasive Urothelkarzinom (pT1-4) stark von den niedriggradigen nicht-invasiven papillären Tumoren (papilläre urotheliale Neoplasien niedriger maligner Potenz, nicht-invasives niedriggradiges papilläres Urothelkarzinom). Hierbei scheint das Harnblasenkarzinom-Risiko für Verwandte ersten Grades von Harnblasenkarzinom Patienten 1,5 bis 2fach zu steigen. Die in einem Patienten beschriebene Translokation t(5;20)(p15;q11) ist die bisher einzige nachgewiesene genetische Veränderung in einer Familie mit Urothelkarzinom. Für polymorphische Varianten einiger entgiftender Enzyme wurde ein geringfügig gesteigertes Harnblasenkarzinom-Risiko beschrieben.

Chromosomale Veränderungen

Charakteristisch für das invasive Harnblasenkarzinom ist die Existenz vieler chromosomaler Veränderungen an verschiedenen chromosomalen Regionen. In Studien zur vergleichenden genomischen Hybridisierung (CGH), wurde beschrieben, dass es hierbei im Durchschnitt 7-10 Veränderungen gibt, wobei hauptsächlich Verluste von 2q, 5q, 8p, 9p, 9q, 10q, 11p, 18q und des Y-Chromosoms sowie die Zunahme von 1q, 5p, 8q und 17q als zytogenetische Veränderungen beobachtet wurden [37].

Zur Entstehung und Progression eines Harnblasenkarzinoms tragen häufig eine Ko-Amplifikation und gleichzeitige Überexpression von Onkogenen einer Chromosomen-Region bei. Zum Beispiel findet sich bei einer Amplifikation von CCND1 auf 11q13 begleitend eine Amplifikation von FGFR3 in 88% und bei einer Amplifikation von MDM2 auf 12q15 eine Amplifikation von CDK4 in 11% der Fälle.

1.3.7 Onkogene

Der transmembranöse Tyrosinkinase-Rezeptor **Her2/neu** hat keinen bekannten Liganden. Er wird vielmehr durch eine Interaktion mit anderen EGFR-Gen-Familienmitgliedern aktiviert. Er ist bei der Brustkrebstherapie von Interesse und ist auch beim Harnblasenkarzinom in 10-20% amplifiziert und in 10-50% vermehrt exprimiert. Amplifikation oder Deletionen der benachbarten Topoisomerase 2 alpha (TOP2A), die von Anthrazyklinen angegriffen werden können, werden in ca. 23% der Fälle von HER2 amplifizierten Karzinomen beobachtet, weshalb durch die Ausprägung dieser Strukturen die Therapie beeinflusst werden kann [38] und können zu unterschiedlichen Therapieerfolgen bei der Behandlung mit Anthrazyklinen beitragen.

Das einzige zurzeit für das Harnblasenkarzinom bedeutungsvolle bekannte Mitglied der Ras-Gen-Familie ist das **H-ras**, dessen Mutationen fast gänzlich auf spezifische Alterationen der

Codons 12, 13 und 61 beschränkt ist, die jedoch in bis zu 45% aller Harnblasenkarzinome ohne Zusammenhang zwischen Mutation und Tumor-Stadium oder –Grading gefunden werden [39].

Ein weiteres Mitglied der Klasse II Rezeptor Familie ist der **EGFR**, der eine transmembranöse Tyrosinkinase ist. Liganden hierfür sind z.B. der EGF und TGF α . Der EGFR ist Ziel zahlreicher Medikamente, sowohl wie inhibitorischer Moleküle als auch Antikörper. Er ist in 3-5% der Harnblasenkarzinome amplifiziert und in 30-50% verstärkt exprimiert [40].

Wichtige Promotoren des Zellzyklus sind die Cyclin abhängigen Kinasen (CDKs) und ihre regulierenden Untereinheiten die **Cycline**, von denen das CCND1 am häufigsten amplifiziert (in 10-20% der Fälle) und verstärkt exprimiert (in 30-50% der Fälle) wird. Eine Korrelation zwischen Expression von CCND1 und Tumorentwicklung wird vermutet [41].

Das **MDM2 Gen** kodiert mehr als 40 verschiedene miteinander verbundene Subtypen, von denen nur zwei mit p53 interagieren und dadurch seine Fähigkeit, die Transkription zu aktivieren, inhibieren. Im Gegenzug dafür wird das MDM2 durch den p53 Wildtyp induziert. In normalen Zellen reguliert diese autoregulatorische Feedback-Schleife die Aktivität von p53 und MDM2. MDM2 fördert auch die Herabsetzung von p53, indem eine Expression von MDM2 für eine zeitweilige Inaktivierung von p53 sorgt. Eine MDM2 Amplifikation kommt nur in ca. 4-6% der invasiven Harnblasenkarzinome, eine Expression in 10-40% der Fälle vor [42].

1.3.8 Tumorsuppressorgene

Eine Inaktivierung von Tumorsuppressorgene führt in betroffenen Zellen zu einem Wachstumsvorteil.

Das p53 Gen kodiert ein 53kDa Protein, welches in zahlreichen zellulären Prozessen, wie Zellzyklus, Antwort auf DNS-Schäden, Zelltod und Neoangiogenese eine zentrale Rolle spielt. Mutationen des p53 Gens treten in bis zu 40-60% der Harnblasenkarzinomen auf und befinden sich meist im DNS-bindenden Teil des Gens. Obwohl es keine spezifischen Mutationsstellen gibt, werden mehr als 90% der Mutationen in Exon 4-9 gefunden. Viele p53 Mutationen führen zu einer Proteinstabilisierung. Dadurch kann mutiertes p53 immunhistochemisch nachgewiesen werden.

Das erste bei humanen Karzinomen entdeckte Tumorsuppressorgen war das Retinoblastomgen Gen RB1, welches eine entscheidende Rolle bei der Regulierung des

Zellzyklus spielt. Seine Inaktivierung kommt in 30-80% der Muskel-infiltrierenden Harnblasenkarzinome vor.

Veränderungen im Bereich der DNS-Reparaturgene sind wichtig für zahlreiche Karzinomtypen. Bei invasiven Harnblasenkarzinomen sind Veränderungen an Reparaturgenen jedoch selten.

1.3.9 Prognostische und prädiktive Faktoren

Allein aufgrund der Klinik können keine individuellen Vorhersagen über den Verlauf invasiver Harnblasenkarzinome gemacht werden, jedoch gelten multifokale Lokalisationen, eine Tumorgöße >3cm und begleitend auftretendes Carcinoma in situ (Cis) als Risikofaktoren für Rezidiv und Progression [43]. Ebenso sprechen eine klinisch fortgeschrittene Präsentation mit bimanueller Tastbarkeit, Infiltration der Harnleiteröffnung sowie Lymphknoten- bzw. Fernmetastasen für eine schlechte Prognose.

Die morphologischen Faktoren enthalten den Grad der Differenzierung, das Stadium und andere morphologische Kriterien.

Die Grundlage der pT-Klassifizierung ist die Tiefeninfiltration des Tumors und sie ist für die Prognose bedeutend, weshalb besonders die pT-1 Tumoren über das Ausmaß der Infiltration in die Lamina propria genauer eingeteilt werden sollen. So zeigt es sich, dass Tumoren, die über die Muskularis mucosae hinaus infiltrieren, ein höheres Progressionsrisiko haben. Daneben ist sowohl die oben besprochene Einteilung der histologischen Subtypen, als auch der Randstatus nach Zystektomie von prognostischer Bedeutung. Ebensolches gilt für das Wachstumsmuster. Papilläre Tumore bedeuten für die Patienten eine bessere Prognose.

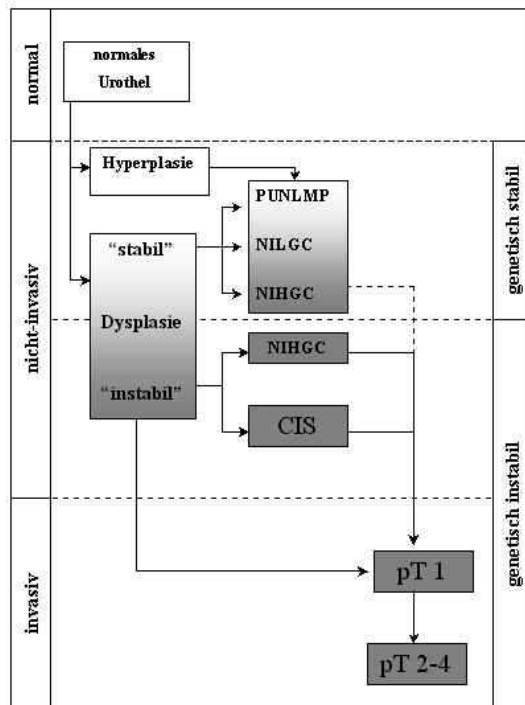


Abbildung 1.1 Putatives Modell der Entstehungswege und Unterteilung des Harnblasenkarzinoms auf genetischen Befunden basierend. Dicke Pfeile zeigen die häufigsten, gepunktete Pfeile zeigen die seltensten Entstehungswege. Die typischen genetischen Veränderungen werden im Text beschrieben. (Referenz: WHO 2004)

Im Gegensatz zu den auffallenden Differenzen hinsichtlich der Prognose bei pT1 und pT2 Tumoren, zeigen diese Tumore auf genetischer Ebene eine deutliche Ähnlichkeit, weshalb ähnliche genetische Veränderungen für alle Stadien eine prognostische Relevanz bedeuten könnten. Dennoch konnte bisher kein molekularer Parameter ausreichend validiert werden, dass er klinisch eingesetzt wird.

Am intensivsten wurden bisher Veränderungen am p53-Gen hinsichtlich seiner prognostischen Bedeutung erforscht. So ist es z.B. möglich, dass die unterschiedlichen Reaktionen der Tumoren auf spezifische Therapiekonzepte auf unterschiedliche Veränderungen von p53 zurückzuführen sind. In neueren umfangreichen Studien wurde eine zwar schwache aber doch signifikante Korrelation zwischen p53-positivem Tumor und schlechter Prognose gefunden werden. Diese prognostische Bedeutung scheint jedoch mehr für pT1 als für pT2 Tumoren zu gelten.

Das RB-Gen wird in 30-80% der Harnblasenkarzinome gefunden. Einige Studien haben eine Verbindung zwischen veränderter RB-Expression und reduzierten Überlebenszeiten bei Muskel-infiltrierenden Tumoren und mit Tumorprogression bei pT1 Tumoren gefunden, doch konnte dies nicht durch andere Studien belegt werden.

Eine verstärkte Expression von HER2 kommt in 30-70% von invasiven Harnblasenkarzinomen vor, wobei eine Forschungsgruppe einen Zusammenhang zwischen HER2 Expression und verbessertem Überleben nach Paclitaxel-basierter Chemotherapie gefunden hat. Die gleichzeitige Amplifizierung und Expression der benachbarten Topoisomerase 2 alpha könnte ebenfalls eine Rolle bei der veränderten Sensibilität von HER2 amplifizierenden Tumoren gegenüber Chemotherapie spielen.

In 30-50% des invasiven Harnblasenkarzinoms ist EGFR überexprimiert. Im Gegensatz zu frühen Berichten, die eine vermehrte Expression von EGFR mit einem erhöhten Risiko einer Rekurrenz des Tumors, einer Progression und einer verminderten Überlebenszeit verbunden sahen, konnten spätere Studien dies nicht belegen.

Es konnte sporadisch bestätigt werden, dass eine vermehrte Angiogenese, die anhand von Antikörpern gegen den Faktor VIII oder CD34 markierten Mikrogefäßen quantifiziert werden kann, als ein unabhängiger prognostischer Faktor anzusehen ist. Im Gegensatz dazu ist eine verminderte Expression von Thrombospondin (TSP-1), das durch eine Interaktion mit dem P53 Protein verstärkt wird und ein Inhibitor der Angiogenese ist, signifikant mit einer Rekurrenz, einer Progression der Erkrankung und einer verkürzten Überlebenszeit assoziiert. COX-2, ein Subtyp der Cyclooxygenase, welche Arachidonsäure in Prostaglandin H2 umwandelt, wird durch verschiedene Stimuli z.B. Entzündungen induziert und kommt bei verschiedenen Tumorarten vermehrt vor [45].

1.4 Nicht-infiltrierende Läsionen der Harnblase

1.4.1 Urotheliale Papillome

Urotheliale Papillome machen nur 1-4% der Harnblasenkarzinome aus und bestehen aus einem von Urothel umgebenen zarten fibrovaskulären Kern, so dass sie sich nicht von normalem Urothel unterscheiden. Es befällt mehr Männer als Frauen (1,9:1) und eher jüngere Menschen, teilweise sogar Kinder. Die Papillome sind vorwiegend solitär an hinterer und seitlicher Wand auch in Ureter-Öffnungsnähe sowie in der Urethra lokalisiert. Die Therapie der Wahl ist die komplette TUR. Es kommt nur selten zur Rekurrenz.

Wie durch molekulare und immunhistochemische Untersuchungen gezeigt wurde, sind die Läsionen diploid, Mitosen selten und die Proliferationsrate niedrig. Die Expression von CK20 entspricht der normalen Urothels. Es scheinen sich regelmäßig FGFR3 Mutationen (75%) zu finden, ähnlich der bei PUNLMP (85%) und dem niedriggradigen papillären Harnblasenkarzinom (88%). Veränderungen von p53 wurden nicht gefunden [46].

1.4.2 Invertierte Papillome

Dies sind benigne papilläre urotheliale Tumoren, die endophytisch in die Harnblasenwand einwachsen. Die neoplastischen Zellen zeigen normale bis gering veränderte zytologische Atypien.

Diese Variante kommt meist solitär und nur in 1% aller Fälle von Harnblasentumoren vor. Es werden mehr Männer als Frauen befallen (4,5:1). Das Erkrankungsalter schwankt zwischen 10 und 94 Jahren mit einem Maximum zwischen dem 60. und 70. Lebensjahr. Der Entstehungsmechanismus ist noch unbekannt. Die Hauptlokalisation (>70%) in der Harnblase liegt im Trigonum. Es können aber auch Ureter, Nierenbecken und Urethra betroffen sein.

Die klinischen Zeichen entsprechen der Lokalisation.

Makroskopisch erscheinen diese Papillome, die meist kleiner als 3 cm in ihrem größten Durchmesser sind und selten größer als 8cm werden, als gestielte oder sessile polypoide Läsionen mit glatter Oberfläche.

Histologisch wird die glatte Oberfläche von zytologisch normalem Urothel bedeckt. Die Basis der Läsion ist klar abgegrenzt, obgleich vereinzelt endophytische Schnüre von Urothelzellen in die benachbarte Lamina propria, jedoch nicht in die muskuläre Blasenwand, ziehen.

Man unterscheidet einen trabekulären, der sich aus interanastomosierenden Urothelblättern zusammensetzt, die auch zystische Anteile enthalten, von einem glandulären Subtyp, der Urothel mit (pseudo-) glandulären Differenzierungen enthält.

Die Prognose des invertierten Papilloms ist gut. Es treten in weniger als 1% der Fälle Rezidive auf, ebenso wird nur selten eine Progression beobachtet [47].

1.4.3 Papilläre urotheliale Neoplasien von geringer maligner Potenz (PUNLMP)

PUNLMP sind dem exophytischen Urothelpapillom ähnliche papilläre Urotheltumoren, die aber eine gesteigerte zelluläre Proliferation aufweisen, woraus eine Dickenzunahme des Urothels besteht. Es betrifft ca. 3:100.000 Patienten, wobei mehr Männer als Frauen (5:1) betroffen sind und das Durchschnittsalter bei 64 +/- 13,9 Jahren liegt. Sie sind hauptsächlich in der lateralen und posterioren Wand nahe der Harnleiteröffnung zu finden. Klinisch fallen die Patienten durch eine Hämaturie auf, wobei die Urin-Zytologie meist negativ bleibt. Bei der Zystoskopie findet sich meist ein 1-2cm großer Tumor, der mittels TUR entfernt wird.

Histopathologisch sind die Papillen der PUNLMP schlank, diskret, verschmelzen nicht und werden von vielschichtigem Urothel, welches minimale oder keine Atypien aufweist, bedeckt, wobei auch die Zelldichte erhöht zu sein scheint. Die Nuklei sind geringfügig vergrößert. Mitosen werden, wenn vorhanden, eher basal angetroffen.

Da nur selten Progression oder Rezidive beobachtet werden, haben die PUNLMP eine sehr gute Prognose [48].

1.4.4 Nicht-invasive papilläre Urothelkarzinome, niedriggradig

Dies sind Neoplasien, die aus von urotheliale Belag bedeckten papillären Strukturen bestehen, die ein überwiegend normales Urothel mit Variationen bei architektonischen und zytologischen Merkmalen aufweisen. Es trifft jährlich ca. 5:100.000, wobei mehr Männer als Frauen (2,9:1) mit durchschnittlich 69,2 +/- 11,7 Jahren bei einer Zeitspanne von 28-90 Jahren erkranken. Die Neoplasie findet sich meist (70%) an der lateralen oder posterioren Wand nahe der Harnleiteröffnung, wobei 78% der Patienten einen solitären und 22% zwei oder mehr Tumoren aufweisen. Klinisch findet man eine Hämaturie. Das zystoskopische Bild ähnelt dem des PUNLMP.

Histologisch imponieren schlanke, Papillen, die sich regelmäßig verzweigen und minimal fusionieren. Immunhistologisch lassen sich vermehrte Expressionen von CK20, CD44, p53 und p63 darstellen. Die Tumoren sind gewöhnlich diploid.

Die Prognose ist gut: es kommt nur in 5% der Fälle zu einer Progression oder Versterben an der Erkrankung. Allerdings findet sich in 48-71% Rezidive [48].

1.4.5 Nicht-invasive papilläre Urothelkarzinome, hochgradig

Dies sind Neoplasien von urothelialen papillären Strukturen, welche ein ungeordnetes Muster mit moderaten bis starken architektonischen und zytologischen Atypien haben und einzeln oder multipel auftreten können. Klinisch fällt meist eine Hämaturie auf. Endoskopisch unterscheidet man papilläre und noduläre/solide Läsionen. Histologisch kennzeichnen teils zarte papilläre Strukturen den Tumor, die sich oft verzweigen. Die Zellkerne zeigen oft einen Pleomorphismus mit moderaten bis prominent ausgeprägten Variationen der nukleären Polarität, Größe und Chromatinverteilung, wobei auch die Nukleoli prominent erscheinen können. Die Dicke der Urothelschicht kann erheblich verbreitert sein. Immunhistochemisch lassen sich CK20, p53 und p63 häufiger als in niedriggradigen Tumoren anfärben [49]. Die Tumoren sind für gewöhnlich aneuploid.

1.4.6 Urotheliales Carcinoma in situ (Cis)

Das Carcinoma in situ ist eine nicht-papilläre Läsion, die zytologisch maligne Zellen in ihrer oberflächlichen Schicht enthält. Das Cis macht mit ca. 1-3% der urothelialen Neoplasien einen eher geringen Teil aus, wobei es jedoch bei 45-65% der invasiven Harnblasenkarzinome

und 7-15% der papillären Neoplasien in Urothel in der Umgebung des Tumors gefunden wird. Das Erkrankungsalter liegt bei 50 – 60 Jahren. Histopathologisch zeigen urotheliale Cis nukleäre Anaplasien mit vergrößerten Zellkerne, die regelmäßig pleomorph und hyperchromatisch sind und eine grobe oder kondensierte Chromatinverteilung zeigen. Häufig geht die Zellpolarität mit dem irregulären nukleären Wachstum verloren.

Immunhistochemisch können CK20 und p53 verstärkt und RB vermindert exprimiert sein und mit der Progression des Cis in Verbindung gebracht werden. Die DNS-Analyse zeigt eine aneuploide Zellpopulation.

Es scheint als hätten de novo Cis eine geringere Tendenz zur Progression als sekundäre Cis Läsionen (bei zusätzlichem invasiven Tumor), bei denen die Mortalität bei 45-65% der Fälle liegt. Ist der zusätzliche Tumor nicht-invasiv liegt die Mortalität bei 7-15%.

1.5 Genetische und prädiktive Faktoren

Heute wird in Studien die WHO-Klassifikation von Tumoren des Harntrakts in ihrer neuen Auflage von 2004 angewendet. Man kann anhand ihrer genetischen Stabilität zwei Subtypen unterscheiden: zum einen die genetisch stabile Form, die die niedriggradigen nicht-invasiven papillären Tumoren (früher pTa G1-2) enthält, die nur wenige genetische Aberrationen haben. Hierbei sind Verluste des Chromosoms 9 und Mutationen von FGFR3 am häufigsten; Gen-Amplifikationen und p53 Mutationen sind eher seltener vorkommende Veränderungen. Zum anderen gibt es die genetisch instabile Kategorie, die die hochgradigen (pTa G3 und Cis) und invasiv wachsenden Karzinome (pT1-4) umfasst. Hierbei treten viele verschiedene chromosomale Veränderungen in Vorschein. Es kommt häufig zu hohen Amplifikationsraten, p53 Mutationen und DNS-Aneuploidie. Die genetischen Unterschiede zwischen minimal (pT1) und ausgeprägt (pT2-4) invasiven Karzinomen ist jedoch nur gering. Diese Daten zeigen eine große Ähnlichkeit zwischen nicht-invasiven hochgradigen und invasiven Tumoren, was ein Hinweis auf ihre Rolle in der Entwicklung invasiver Harnblasenkarzinome sein kann.

Bei hochgradigen oder invasiven Tumoren kommen viel häufiger genetische Veränderungen vor als bei pTa G1-2 Neoplasien, so dass es unwahrscheinlich scheint, dass ein relevanter Anteil invasiver Karzinome aus nicht-invasiven niedriggradigen Tumoren hervorgegangen ist. Im gleichen Zug zeigten klinische Beobachtungen, dass nur wenigen invasiven Harnblasenkarzinom ein pTa G1/G2 Tumor vorausgegangen war. [51]

Bei Harnblasenkarzinom Patienten können chromosomale Aberrationen auch in histologisch unauffälligem Urothel gefunden werden, so dass genetische Analysen der histologischen Begutachtung bei der Diagnose der frühen Neoplasien überlegen zu sein scheinen.

1.5.1 Chromosomale Abnormitäten

Da nicht-invasive, papilläre niedriggradige Neoplasien (pTa, G1-2) nur wenige zytogenetische Veränderungen haben, werden sie als genetisch stabil eingestuft. Die häufigste Veränderung beim Harnblasenkarzinom unabhängig vom Stadium ist der komplette oder partielle Verlust des Chromosoms 9 (mehr als 50% der Fälle). Ebenso gilt bei dieser Tumorentität der Verlust des Y-Chromosoms als bedeutend. Er kommt jedoch auch bei Gesunden vor.

Im Gegensatz dazu stehen die hochgradigen nicht-invasiven Neoplasien, die zytogenetisch eher den invasiv wachsenden Harnblasenkarzinom ähneln und viele verschiedene genetische Aberrationen haben. Die dominierenden Deletionen findet man bei 2q, 5q, 10q und 18q, die häufigsten Zugewinne bei 5p und 20q. Ebenso kommen häufig Veränderungen des zellulären DNA-Inhaltes bei Harnblasenkarzinom vor. Besonders starke Gegensätze zeigen sich, die Aneuploidie betreffend, zwischen pTa und pT1 Tumoren. [52]

1.5.2 FGF Rezeptor 3 (FGFR3)

Vor kurzem wurden Mutationen der Gene auf Chromosom 4p16.3 als für pTa Tumoren charakteristische Veränderungen erkannt. So wurde gefunden, dass 74% der pTa Tumoren FGFR3 Mutationen im Vergleich zu nur 16% der T2-4 Tumore aufweisen. Diese Mutationen sind verantwortlich für eine konstitutionelle Aktivierung der Rezeptoren. So scheint es, als würde das Rezidivrisiko bei Vorhandensein der Mutation sinken. In einer neueren Studie wurden vergleichbare FGFR3 Mutationsraten in 9 von 12 Papillomen (75%), 53 von 62 Tumoren mit niedrigem malignem Potential (85%) und 15 von 17 niedriggradigen papillären Karzinomen (88%) nachgewiesen. Diese Daten unterstützen die Idee, dass diese Kategorien, Variationen einer Tumorentität (nicht-invasive niedriggradige papilläre Tumoren; genetisch stabil) repräsentieren.

1.5.3 P53

P53 ist ein Tumorsuppressorgen, das auf dem kurzen Arm des Chromosoms 17 kodiert ist. Dies ist ein häufiger Ort für Genmutationen beim Menschen. Es wurde gezeigt, dass das Wildtyp-Protein Zellproliferation und –transformation unterdrücken und Apoptose induzieren

kann. p53 kann Zellen in der G1 Phase des Zellzyklus aufhalten, damit Reparationen an der DNA durchgeführt werden können, oder es induziert bei irreversiblen Schaden die Apoptose. Dadurch schützt es die Zellen vor einer Anhäufung von Mutationen durch Sicherung der genomischen Stabilität. Im Vergleich zum Wildtyp-Protein haben mutierte p53 Genprodukte eine verlängerte Halbwertszeit und können so mittels immunhistochemischer Methoden nachgewiesen werden. Ebenso zeigen Studien, dass die prozentuale Expression von p53 mit dem Tumorstadium und dem histologischen Malignitätsgrad des Tumors korreliert, auch wenn innerhalb des Tumors die Intensität der immunhistochemischen Anfärbung von p53 variiert.

1.5.4 Ki67

Ki67 ist einer der am häufigsten angewandten prognostischen Marker zum Nachweis einer erhöhten Proliferation beim Harnblasenkarzinom. Das Ki67 Protein ist in ruhenden Zellen nicht vorhanden, der monoklonale Antikörper Ki67 reagiert ausschließlich mit den Zellkernen proliferierender Zellen. Tsuji et al. zeigten, dass ein hoher Ki67 Index mit verstärkter Akkumulation von p53 in Zellen bei Harnblasenkarzinomen einhergeht und ein prognostischer Faktor für Rekurrenz und Progredienz bei oberflächlichen Urothelkarzinomen ist. Dennoch ist Ki67 unabhängig von p53.

1.5.5 HER2 und EGFR

In Studien wurden bei Cis und pTa G3 vergleichbare Frequenzen von p53 Veränderungen (50-70%), HER2 Überexpression (50-75%) oder EGFR Überexpression (45-75%) und Verlust von p21 (50-70%) oder p27 (50%) wie schon bei den invasiven Karzinomen beschrieben.

1.5.6 CK20

Cytokeratine sind eine Familie von Polypeptiden, die in epithelialen Zellen vorhanden sind. Die Expression des Isotyp CK20 ist begrenzt auf das Urothel, gastrisches und intestinales Epithel, sowie Merkel-Zellen. Beim Urothel wird CK20 mit Differenzierung assoziiert, wobei es auf oberflächliche Deckzellen und gelegentlich Zwischenzellen beschränkt bleibt. Bei allen Graden von Dysplasien jedoch wird CK20 bis zur Basalmembran hin stark positiv exprimiert, in manchen Studien in bis zu 89% der Fälle, ohne Änderungen der Expression in den Kontrollbiopsien. So scheint es, dass immunhistochemische Untersuchungen von CK20 zur

Identifikation einer Differenzierung des Urothels der Harnblase geeignet sind, selbst wenn die morphologische Diagnostik schwierig ist.

1.5.6 Prognostische und prädiktive Faktoren

Es gibt keine klinisch sicheren Symptome zur Früherkennung eines Harnblasenkarzinoms. Im Gegensatz dazu ist das histologische Grading ein wirkungsvoller prognostischer Faktor in Bezug auf Rekurrenz und Progression bei nicht-invasiven urothelialen Tumoren. Im Vergleich zu urothelialen Papillomen haben PUNLMP ein höheres Risiko zur Rekurrenz (bis zu 35% der Fälle); eine Progression zeigt sich selten. Die Lebenserwartung ist bei beiden Tumorentitäten fast nicht beeinträchtigt. Die nicht-invasiven niedriggradigen Tumoren rezidivieren häufig (bis 70% der Fälle), bei einer Progressionsrate von 12%, während die hochgradigen Tumoren eine regelmäßige Progression und eine erhöhte Mortalität (in 65% der Fälle) bedingen. Ebenso findet sich eine Steigerung des Progressions-, Rekurrenz- und Mortalitätsrisikos bei multifokalen Tumoren der Harnblase. Ähnlich verhält es sich bei Cis und großen Tumoren (>5cm).

Hierbei kann gesagt werden, dass die Rekurrenzrate abhängig ist von der Anzahl und den biologischen Eigenschaften der nach einer kompletten Resektion verbleibenden Tumorzellen. Molekulare Veränderungen, die mit einem erhöhtem Proliferationsrisiko oder Potential zur multizentrischen Ausbreitung einhergehen, erweisen sich als beste Marker zur Vorhersage von Rezidiven. Beispiele für solche Veränderungen sind verändertes CK20 Expressionsmuster, FGFR3 Mutationen, aber gesteigerte Ki67 Proliferationsfraktion.

Wenn man das Progressionsrisiko betrachtet, können molekulare Veränderungen zu einer Senkung der genetischen Stabilität führen und bedeuten somit eine Verschlechterung der Prognose, da sich bei einer großen Anzahl solcher Veränderungen aus einer nicht-invasiven niedriggradigen Neoplasie ein invasives Karzinom bilden kann. Da es aber nur selten Progressionen bei Patienten mit nicht-invasiven niedriggradigen Neoplasien der Harnblase gibt, gibt es nur wenige Daten über die prognostische Bedeutung genetischer Veränderungen für eine Progression.

1.6 Der Gewebemikroarray

Dieses Verfahren ermöglicht die simultane Untersuchung vieler verschiedener Gewebeproben in einem Multiblock und spart sowohl Reagenzien als auch Zeit. Als weiterer wesentlicher Vorteil werden dabei alle Gewebe unter völlig identischen Bedingungen gefärbt - in der

Immunhistochemie, bei in-situ Hybridisierungen oder der Fluoreszenz in situ Hybridisierung. Bei der Untersuchung großer Fallkollektive werden somit Tagesschwankungen im Labor weitgehend ausgeschlossen. Darüber hinaus kann zur Qualitätssicherung in jedem Multiblock eine entsprechende Positiv- und Negativkontrolle von vornherein mit eingebracht werden. Auch die anschließende Auswertung der Reaktionsergebnisse wird durch den Multiblock erheblich beschleunigt [www.ZytoMed-systems.de].

1.7 Fragestellung

Bei den meisten Patienten mit Harnblasenkarzinomen ist der Tumor bei Erstdiagnose nicht Muskel-invasiv; d.h. im Stadium pTa oder pT1. Diese Patienten müssen engmaschig kontrolliert werden, weil sie ein hohes Rezidiv- und Progressionsrisiko haben. Fibroblast Growth Factor Receptor 3 (*FGFR3*) Mutationen wurden in hohen Raten bei Patienten mit nicht Muskel-invasiven Harnblasenkarzinomen gefunden. Im Rahmen dieser Arbeit sollte die Beziehungen zwischen *FGFR3* Veränderungen und drei bekannten molekularen Markern (CK20 Expressionsmuster, P53 Expression und Ki-67 Proliferationsfraktion) an einem großen Kollektiv von Harnblasenkarzinomen (n=255) untersucht werden, um alternative genetische Entstehungswege bei der Pathogenese des Harnblasenkarzinoms zu charakterisieren.

2. Material und Methoden:

2.1 Datenerhebung

Zunächst wurden im Archiv des Institutes für Pathologie der Universität Regensburg alle Patienten ermittelt, die zwischen 1989 und 2003 wegen eines Urothelkarzinoms der Harnblase in der Abteilung für Urologie der Universität Regensburg behandelt wurden und deren Präparate am Institut für Pathologie der Universität Regensburg histologisch untersucht wurden. Im Institut für Pathologie der Universität Regensburg existiert ein Patienten-Auskunft-System (PAS), in dem seit 1989 alle histologischen Gutachten mittels elektronischer Datenverarbeitung (EDV) archiviert werden. Von diesen Fällen wählte man all jene aus, welche einen Primärtumor aufwiesen. Es wurde also selektiv nach Patienten gesucht, bei denen erstmals ein Harnblasenkarzinom diagnostiziert wurde.

Im nächsten Schritt überprüfte man alle anhand des pathologischen Archivs ermittelten Patienten mit Hilfe einer zweiten Datenbank, die vom Tumorzentrum Regensburg e.V. zur Verfügung gestellt wurde. Das Tumorzentrum Regensburg e.V. erfüllt neben der Aufgabe eines epidemiologischen Krebsregisters auch die Aufgabe eines klinischen Krebsregisters und ermöglicht so die Dokumentation von Tumordiagnosen, -therapien und Krankheitsverläufen. Berücksichtigt werden alle Aufzeichnungen bis Ende März 2004. Eine weitere Kontrolle des Rezidiv-Status erfolgte mit Hilfe des Instituts für Pathologie. Über das Befundsystem (PAS) wurde nach bereits diagnostizierten Rezidiven gesucht. Der mediane Nachbeobachtungszeitraum für alle Tumorpatienten betrug 75 Monate (Spannweite 0-149 Monate). Insgesamt konnten somit 255 Patienten mit primären Harnblasenkarzinomen identifiziert werden.

Jeder Patient war am Ende des Auswahlprozesses durch bestimmte Variablen definiert. Im Einzelnen sind dies: der Name, das Geschlecht und Geburtsdatum des Patienten, außerdem Histo-Nummer, Histo-Jahr der Gewebeprobe, sowie Alter bei Diagnosestellung. Als Verlaufsdaten wurden innerhalb des Nachbeobachtungszeitraumes das Alter bei Erstdiagnose, das rezidiv-freie Überleben (RFS) und das Gesamtüberleben (OS) in Monaten errechnet. Eine monatgenaue Angabe der Zeitintervalle war möglich. Tabelle 1 fasst die klinisch-pathologischen Charakteristika zusammen.

Tabelle 2.1 Patienten, Tumoreigenschaften und Ergebnisse der molekularen und immunohistochemischen Analysen

Variable	Kategorisierung	Patienten	
		n	%
Alter bei Diagnosestellung			
	<70 Jahre	141	55
	≥70 Jahre	114	45
Geschlecht			
	weiblich	64	25
	männlich	191	75
Tumor Stadium ^a			
	pTa	146	57
	pT1	48	19
	pT2	56	22
	pT3	2	1
	pT4	3	1
Histologischer Grad ^a			
	G1	81	32
	G2	69	27
	G3	105	41
Benachbartes carcinoma in situ			
	Nein	222	87
	Ja	33	13
Multifokalität			
	unifokaler Tumor	53	21
	multifokaler Tumor	202	79
Wachstumsmuster			
	papillär	61	56
	solid	47	44
FGFR3			
	Wild Typ	110	53
	Mutant	98	47
Ki-67 IHC			
	≤25%	168	71
	>25%	68	29
P53 IHC			
	≤10%	179	73
	>10%	66	27
CK20 IHC ^c			
	normal	49	20
	abnormal	192	80

^a Stadium und Grad nach der WHO Klassifikation von 1973^b pT1-4 ausschließlich^c CK20 IHC Färbungsmuster nach Harnden *et al.* Lancet 1999;353:974-7.

Die Hämatoxylin-Eosin-gefärbten Schnitte von allen Tumoren wurden von einem einzigen Pathologen (A.H.) erneut ausgewertet. Tumor Stadium und Grad wurden nach Kriterien der Union Internationale Contre le Cancer (UICC) und Weltgesundheitsorganisation (WHO) bewertet. Das Wachstumsmuster wurde für alle invasiven Tumoren (≥ pT1) bestimmt. Ein

papilläres Wachstumsmuster war durch das Vorhandensein papillären Tumorkomponenten in $\geq 20\%$ definiert. Alle anderen Tumoren wurden als solide Tumore berücksichtigt. Rezidive wurden als zystoskopisch sichtbare Tumore mit histologischer Verifizierung definiert. Daten bezüglich des progressionsfreien Überlebens waren nicht verfügbar.

Jeder mit Hilfe der Datenbank ermittelte und kontrollierte Patientenfall war durch eine formalinfixierte, in Paraffin gebettete Gewebeprobe, sowie einem von diesem angefertigten Hämatoxylin-Eosin-Schnitt (HE-Schnitt) repräsentiert und im Institut für Pathologie der Universität Regensburg archiviert.

2.2 Gewebemikroarray

2.2.1 Auswählen und Markieren der Gewebeareale

Auf den HE-Schnitten wurden die relevanten Gewebeareale lichtmikroskopisch identifiziert und mit Markerstift angezeichnet (Abbildung 2.1). Dabei wurde bei den jeweiligen Patienten das Tumorareal mit dem jeweils höchsten Staging und Grading markiert.

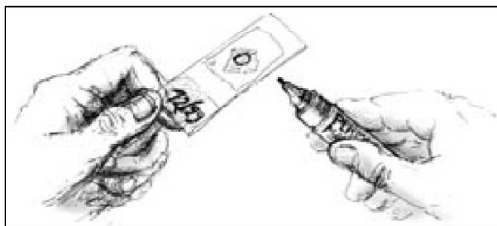


Abbildung 2.1: Markierung der Gewebeareale

Diese Markierung übertrug man auf die Schnittflächen der zugehörigen Paraffinblöcke, indem mit wasserfestem Markerstift flächenhaft das entsprechende Areal eingefärbt wurde (Abbildung 2.2).

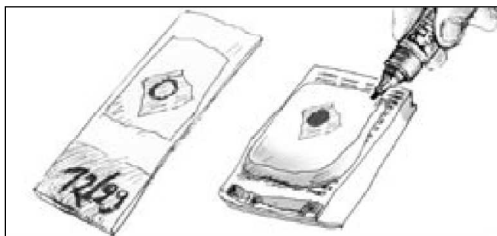


Abbildung 2.2: Markierungsübertragung auf Paraffinblock

2.2.2 Herstellung der Gewebestanzen

Mit einer Handstanze (Durchmesser 1,4-1,5 mm), bei der es sich um eine geschliffene Hohnadel handelt, in der ein Stempel steckt, wurde unter sanftem Druck senkrecht in die farbig markierten Areale des Paraffinblocks ca. 5 mm tief gestochen. Um den Gewebestanzzylinder in der Nadel vom Boden des Blocks abzulösen drehte man die Handstanze mehrfach leicht hin und her und zog dann die Nadel wieder senkrecht heraus (Abbildung 2.3).

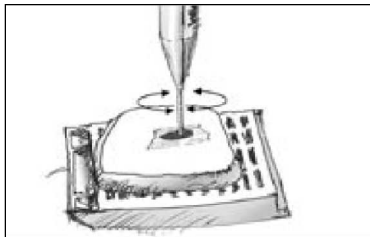


Abbildung 2.3: Gewinnung der Gewebestanzen

Durch Druck auf den Stanzstempel wurde die gewonnene Gewebestanze heraus geschoben und in ein nummeriertes Transportröhrchen vorsichtig abgestreift (Abbildung 2.4).

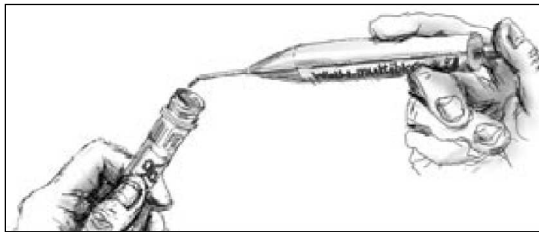


Abbildung 2.4: Befüllen der Transportröhrchen

2.2.3 Zuordnung und Archivierung

Unmittelbar nach dem Befüllen eines Transportröhrchens erfolgte der Eintrag wichtiger den entsprechenden Patientenfall betreffender Daten in eine Tabelle, um eine eindeutige Zuordnung von Gewebeprobe und klinischem Patientenfall zu gewährleisten. Im Einzelnen wurden folgende Daten dokumentiert: interne Fallnummer, Histologie-Nummer des Instituts für Pathologie der Universität Regensburg und Jahr der Einsendung. Die Transportröhrchen wurden in Boxen verstaut und gemeinsam mit den Tabellen an die Firma ZYTOMED GmbH versendet. Hier erfolgte die Herstellung des Multiblocks aus den einzelnen Stanzen. Dabei entstanden TMAs mit 255 Tumorproben.

Von den vorliegenden Multiblöcken wurden jeweils 4 µm dicke Schnitte angefertigt und mit Hämatoxylin-Eosin gefärbt, um die Position der Tumorproben zu verifizieren.

2.3 Verwendete Materialien und Reagenzien

2.3.1 Materialien

Schlittenmikrotom (Mikrom, Heidelberg)

Objektträger 25 x 75 x 1,0 mm Super Frost® Plus (Mezel-Gläser, Braunschweig)

Metallständer (Wagner & Munz, München)

Brutschrank B6060 (Heraeus Sepatech, Osterode)

Glasküvette (Dako Diagnostika, Hamburg)

Heizplatte (Ika Labortechnik, Staufen in Br.)

Deckgläser 24 x 50 mm (Engelbercht GmbH, Edermünde)

Proteinase-K

Fixogumm

Entellan (Merck, Darmstadt)

2.3.2 Verwendete Reagenzien

Phosphatgepufferte Salzlösung

8,00 g NaCl

1,44 g Na₂PO₄

0,20 g KCl

0,24 g KH₂PO₄

ad 1,00 l Millipor-Wasser

20 x SSC-Lösung

175,32 g NaCl

88,24 g Natriumcitrat- Dihydrat

ad 1,00 l Millipor-Wasser

pH-Werteinstellung auf 5,3 mit konzentrierter Salzsäure (HCl)

2 x SCC-Lösung

5,00 ml 20 x SSC-Lösung mit pH 5,3

ad 45,00 ml Millipor-Wasser

pH-Werteinstellung auf 7,1 mit 1N Natriumhydroxid (NaOH)

NP40-Lösung

Nicht-Phenylpolyethylen-haltige Glycollösung

2 x SSC / 0,3 NP40-Lösung

100 ml 20 x SSC mit pH=5,3

897 ml Millipor-Wasser

3 ml NP40

pH- Werteinstellung auf 7,1 mit 1N Natriumhydroxid (NaOH)

Citratpuffer

Lösung 1: 29,41 g Natriumcitrat in 1 l Aqua dest. gelöst

Lösung 2: 21,01 g Zitronensäure in 1 l Aqua dest. gelöst

Puffermischung (pH=7,3): 1 ml Lösung 1 mit 49 ml Lösung 2 in 450 ml Aqua dest.

2.3.3 Antikörper für Immunhistochemie

Folgende Antikörper wurden verwendet:

	Firma:	Bestellnr.:	AK-Verdünnung:
• Anti-p53:	Santa Cruz	p53 SL-263	1:1.000
• Anti-MIB-1:	Dako	M 7240	1:10
• Anti-CK20:	Pro Gen	61026	1:10

2.3.4 Geräte für histologische Begutachtung und Dokumentation

Mikroskop der Firma Leica, Objektive von Olympus Optical; Bilddokumentation mit Kamera und Software der Firma Visitron Systems (Puchheim, RT Color Diagnostics)

2.3.5 Primer für die FGFR3-Mutationanalyse

Primer	Sequence	Strand	Primer extension		Concentration (pmol/ml)
			Wild-Type	Mutant	
R248C	5V-T46CGTCATCTGCCCCACAGAG-3V	sense	C	T	2.0
S249C	5V-T36TCTGCCCCACAGAGCGCT-3V	sense	C	G	1.2
S249C	5V-T28TCTGCCCCACAGAGCGCT-3V	sense	C	G	1.2
G372C	5V-T29GGTGGAGGCTGACGAGGCG-3V	sense	G	T	0.4

Y375C	5V-T43ACGAGGCGGGCAGTGTGT-3V	sense	A	G	0.6
A393E	5V-T34CCTGTTCATCCTGGTGGTGG-3V	sense	C	A	2.4
K652E/Q	5V-T50GCACAACCTCGACTACTACAAG-3V	sense	A	G/C	1.2
K652M/T	5V-T20CACAACCTCGACTACTACAAGA-3V	sense	A	T/C	0.8

Tabelle 2.2 SNaPshotprimer für die FGFR3 Mutationsdetektion.

2.4 Immunhistochemie

2.4.1 Prinzip der Immunhistochemie

Die Immunhistochemie lokalisiert Epitope bestimmter Antigene, indem sie die Spezifität und Affinität immunologischer Reaktionen nutzt, also die Eigenschaft, dass Antikörper spezifisch und mit hoher Affinität an ihr passendes Antigen binden. Die nicht bindende Seite des Antikörpers kann wiederum als Bindungsstelle für einen weiteren Antikörper genutzt werden, der mit Substanzen konjugiert ist, die man zur Detektion verwenden kann. Es existiert eine Reihe von Verfahren, die sich hinsichtlich der Detektionsreagenzien und der Anzahl an Detektionsschritten (direkte oder indirekte Methode) unterscheiden. In dieser Arbeit kam die sogenannte Avidin-Biotin-Methode an in Paraffin eingebettetem Material zum Einsatz.

Zuerst musste das Gewebe entparaffiniert werden, um die Antigene (P53, MIB1 und CK20) durch geeignete Verfahren freizulegen. Dann wurde ein erster Antikörper, auch Primärantikörper genannt, mit dem Gewebe inkubiert, der spezifisch an das zu untersuchende Antigen bindet (Anti-P53, Anti-MIB1 und Anti-CK20). Im Folgenden wird ein zweiter Antikörper, der auch Sekundärantikörper genannt wird, zugegeben, der seinerseits spezifisch gegen den Primärantikörper gerichtet ist und mit Biotin (Vitamin H) konjugiert ist. Biotin wird sehr spezifisch von dem Glykoprotein Avidin gebunden, das pro Molekül je vier Mal Avidin binden kann. Zuletzt fügt man einen Avidin-Biotin-Komplex hinzu, der zum einen mit Peroxidase (Enzym, das aus sauerstoffhaltigen Molekülen Sauerstoff freisetzt) konjugiert ist und zum anderen noch freie Biotin-Bindungsstellen aufweist. Diese können das mit dem Sekundärantikörper verbundene Biotin binden. Nun lässt man die Peroxidase mit einem passenden Chromogen (hier: Diaminobenzidintetrahydrochlorid) reagieren, um diesen Antikörperkomplex sichtbar zu machen (Abb. 2.5). Daraus resultieren sehr spezifische Färbeergebnisse, da die Affinität des Avidins zu Biotin extrem hoch ist. Nach Abschluß dieser Reaktion färbt man die Präparate kurz mit Hämalaun gegen, damit nicht nur die Antikörperkomplexe, sondern auch die histologischen Strukturen erkennbar werden.

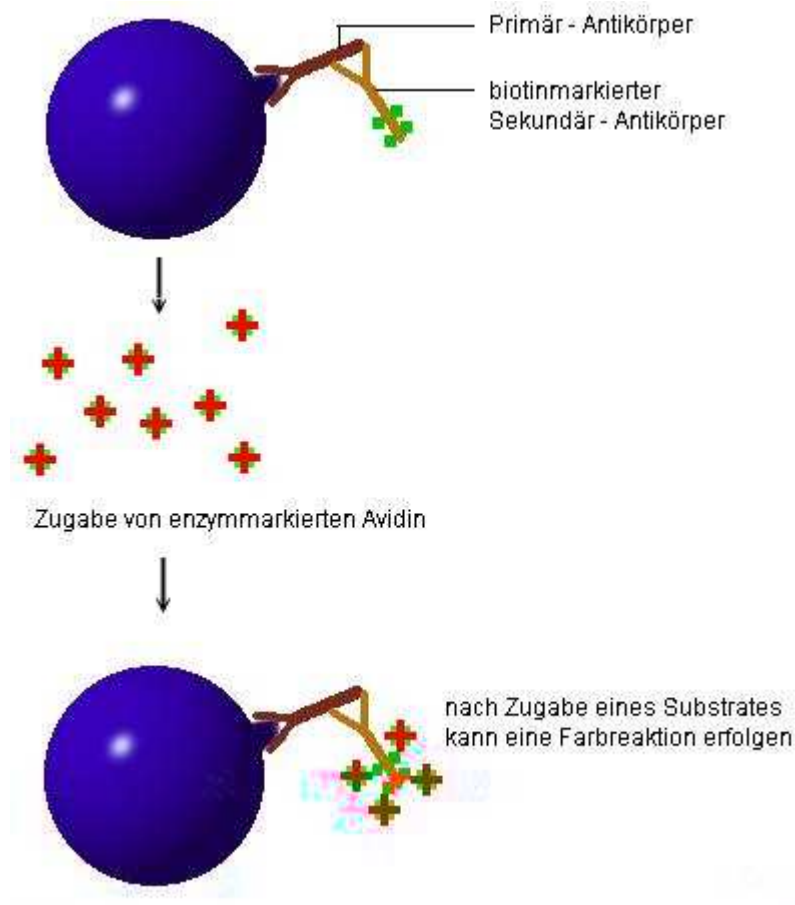


Abb.2.5: Prinzip der Avidin-Biotin-Methode.

2.4.2 Gewebepräparation und Antigendarstellung

Demaskierung

Die Objektträger wurden zur Demaskierung der Primärantikörper-Bindungsstellen in Zitratpuffer mit einem pH-Wert von 7,1 für 4 min (bis Lösung kocht) in einer Mikrowelle bei maximaler Leistung erhitzt. Darin wird der Schnitt für 30 min inkubiert.

Entparaffinisierung

- Waschen der Objektträger für zehn min in frischer Xylol-Lösung
- Waschen in Alkohollösungen absteigender Konzentration für je eine min: zweimal Ethanol 100%, zweimal Ethanol 96% und einmal Ethanol 70%
- Anschließend mehrmaliges Waschen in Aqua dest.

Färben der Gewebeproben

- Inkubation für 60 min mit den jeweiligen primären Antikörpern in den oben genannten Verdünnungen

- Reinigen mit Waschpuffer (Ventana) für fünf min
- Inkubation für zehn min mit biotinyliertem Sekundärantikörper
- Blockade unspezifischer Bindungsstellen mittels Peroxidase für 2 min
- Reinigen mit Waschpuffer für fünf min
- Inkubation für zehn min mit Enzymkonjugat HRP-Streptavidin
- Reinigen mit Waschpuffer für fünf min
- Inkubation mit dem Chromogen DAB in einer Verdünnung von 1:50 für fünf min

Konservieren der Präparate

- Auswaschen mit Aqua dest. für fünf min
- Gegenfärbung mit Hämalaun für eine min
- Reinigen für zehn min unter fließendem Leitungswasser
- Weiteres Waschen der Präparate in absteigender Alkoholreihe von Xylol
- Konservieren der Präparate mittels Entellan und Deckgläsern

2.4.3 Evaluation der immunhistochemischen Färbung

Die Gewebeproben wurden von einem Pathologen (Prof. Dr. med. Arndt Hartmann) unter dem Lichtmikroskop hinsichtlich Färbung und Expressionsmuster ausgewertet. Für P53 und MIB1 erfolgte die Angabe in Prozent gefärbter Zellkerne; bei mindestens 10% (P53) bzw. 25% (MIB1) gefärbter Zellkerne wurde die Expression als abnormal erhöht definiert. Die Evaluation des CK20 Färbemusters erfolgte in Anlehnung an Harnden et al. Dabei galt ein oberflächliches Färbemuster des Urothels (<10% der Zellen) als normal, während ein vollständiges Fehlen oder eine Färbung von mehr als 10% der Epithelzellen als abnormal bezeichnet wurde.

2.5 *FGFR3 Mutationsanalyse*

SNaPshot Sequenzierung

Paraffinschnitte

Eingesandte Präparate am pathologischen Institut der Universität Regensburg werden nach dem Zuschnitt für einige Stunden in 4% Formalinlösung fixiert und anschließend in Paraffinblöcke gegossen und archiviert. Wenn die Fixationszeit 24 Stunden überschreitet, sinken die Erfolgsraten für nachfolgende PCR-Reaktionen signifikant. Die Isolierung von

DNS aus archivierten Paraffinblöcken ermöglicht Untersuchungen an einem großen Patientenkollektiv ohne Zeitverlust durch das warten auf eintreffende Frischpräparate.

Mit dem Schlittenmikrotom werden 4 bis 8 Schnitte pro selektierten Paraffinblock mit einer Schichtdicke von 10 µm und ein Schnitt mit 2 µm Dicke produziert. Die Schnitte werden in ein Wasserbad von 35°C gelegt und dann auf mit Alkohol gereinigte Objektträger platziert. Die Objektträger werden mit der Nummer des Paraffinblocks beschriftet damit sie eindeutig identifizierbar sind und anschließend im Brutschrank bei 42-45°C getrocknet.

DNS Isolierung aus paraffineingebettetem Gewebe

2.5.2.1 Entparaffinierung

Vor der HE-Färbung wird das Material von Paraffin wie folgt gereinigt. Die trockenen Schnitte werden für 15-30min bei 72°C inkubiert um eine bessere Haftung der Schnitte auf dem Objektträger zu erreichen. Die Entparaffinierung erfolgt in Xylol für 2-5 min und anschließend werden die Schnitte, bevor sie in wässrige Farblösungen kommen, in einer absteigenden Alkoholreihe von 100-bis 60% ausgewaschen.

2.5.2.2 Hämatoxilin-Eosin Färbung

Zur histologischen Beurteilung werden die 2 µm dicken Schnitte mit HE gefärbt. Bei der HE-Färbung wird Hämatoxylin zu Hämatein oxidiert, welches mit Aluminium-Ionen einen positiv geladenen Komplex bildet. Dieser blaue Komplex färbt die basophilen Zell- und Gewebestrukturen wie das Chromatin des Zellkerns an. Die azidophilen Zellbestandteile wie das Zytoplasma werden vom Eosin rot gefärbt. Die HE-Schnitte dienen als Referenz bei der Mikrodissektion.

Färbung der Gewebeschnitte auf Objektträger:

1. 10 min in Xylol (unter Abzugshaube)
2. in absteigender Alkoholreihe (100%, 96%, 80%, 60%)
3. 1 min in destilliertes Wasser
4. 10 min in Hämatoxylin
5. 25 min in warmes Leitungswasser bläuen
6. wenige Sekunden in Eosin
7. 2 Mal in kaltes Leitungswasser spülen
8. in aufsteigende Alkoholreihe (60%, 80%, 96%, 100%)

9. Xylol
10. Eindeckeln mit Entellan und Deckglas

2.5.2.3 DNS-Isolation aus Stenzen

Das Vorgehen zur Gewinnung einer Gewebestanze aus den 10 µm dicken Paraffinschnitten wurde im Abschnitt 2.2.1 und 2.2.2 aufgeführt. Hiernach folgt schematisch:

1. Gewebestanze (<25mg) in einen 1,5ml Eppendorf-Cup geben
2. 1200 µl Xylol zugeben
3. Im Vortex gut mischen (ca. 2 min)
4. Zentrifugieren bei Raumtemperatur (5 min, „full speed“)
5. Mit Pipette den Überstand vorsichtig entfernen
6. 1200 µl 100% Ethanol zum Pellet geben
7. Im Vortex gut mischen
8. Zentrifugieren bei Raumtemperatur (5 min, „full speed“)
9. Mit Pipette den Überstand vorsichtig entfernen
10. 1200 µl 100% Ethanol zum Pellet geben
11. Im Vortex gut mischen
12. Zentrifugieren bei Raumtemperatur (5 min, „full speed“)
13. Mit Pipette den Überstand vorsichtig entfernen
14. ca. 30 min Speed Vac bis Ethanol vollständig verdampft ist
15. 80 µl Puffer T und 20 µl Proteinase K vom Magna Pure DNA-Isolationskit dazu pipettieren und das Pellet resuspendieren
16. Inkubation über Nacht bei 55°C.

Der Verdau der Proteinanteile und die Extraktion der DNS wurden nach einem modifizierten Protokoll von Magna Pure durchgeführt. Der Kit gewährleistete den vollständigen Verdau von Proteinen und damit von DNS degradierender DNSasen/Enzyme. Die Salze und Proteindegradationsprodukte im Zell-Lysat die die nachfolgende PCR hemmen könnten, wurden auch vollständig ausgewaschen. Die Histonproteine die durch Assoziation mit der DNS die kondensierte Form, das Chromatin, bilden wurden durch das Kit abgebaut.

Zu dem Gewebe in Lysepuffer wurde 20 µl Proteinase K gegeben. Die Suspension wird gut durchmischt, abzentrifugiert und bei 55°C unter leichtem Schütteln über Nacht im Thermoblock inkubiert. Die Lösung wird durch den Verdau homogen und klar ohne sichtbare Partikel.

Die DNS wurde auf vier oder acht beschriftete Eppendorf-Cups mit einem Fasungsvermögen von 0,5 ml aufgeteilt und bei -20°C eingefroren.

2.5.2.4 DNS Qualitätskontrolle durch Agarose Gelelektrophorese

Die isolierte DNS wurde mit Hilfe einer PCR amplifiziert und auf ein Agarose-Gel aufgetragen. Da die Gelelektrophorese nur dazu diente die Qualität und Quantität der DNS zu verifizieren, war die Wahl des Primers D2S123 beliebig gewesen.

In einem Erlenmeyerkolben wurden 2,5 mg Agarose mit 1x TAE auf 100 ml aufgefüllt und in der Mikrowelle bei 1000W erhitzt, bis eine durchsichtige Lösung ohne größere Schlieren entstand. Das verdampfte Volumen wurde durch destilliertes Wasser wieder aufgefüllt. Nachdem die Lösung etwas abgekühlt war, wurde sie in die vorbereitete Gelform gegossen. Zwei Kämme mit jeweils 24 Einkerbungen wurden eingesetzt. Das Gel benötigt ca. 30 min bis es Fest wird.

Die Proben bestehen aus jeweils 3 µl PCR-Produkt und Stopppuffer die geschüttelt und kurz abzentrifugiert werden. Die Kämme werden von der Gelform entfernt und das Gel horizontal in die Gelkammer gelegt, welche mit 1xTAE als Laufpuffer gefüllt war. Jeweils 6 µl Probenlösung wurden in die Einkerbungen pipettiert. Als Längenstandard dienten 1,5 µl Hind-III-Marker.

Die Laufzeit betrug 30 min bei 110 V. Die Gele wurden anschließend in einer 0,04%igen Ethidiumbromidlösung gefärbt. Der Fluoreszenzfarbstoff Ethidiumbromid interkaliert mit der DNS. Nach einem kurzen Wasserbad wurde das Gel unverzüglich auf einen UV-Leuchtschirm gelegt und mit Belichtungszeiten von 1-2 Sekunden fotografiert, wodurch die DNS in Form weißer Banden sichtbar wurde.

2.5.2.5 FGFR3 Mutationsanalyse mittels SNaPshot-Sequenzierung

Die Methode der SNaPshot-Sequenzierung wurde am Institut für Pathologie in Rotterdam, Niederlande durch van Oers und Mitarbeiter durchgeführt.

Drei Regionen des FGFR3 Gens, die alle FGFR3 Mutationen bei Harnblasenkarzinome beinhalten, wurden simultan mittels einer multiplex PCR-Reaktion amplifiziert. Mutationen des FGFR3-Gens wurden bisher in 3 Regionen gefunden: R248C und S249C liegen in Region I (Exon 7 des Chromosoms 4). Exon 7 ist zwischen der 2. und der 3. „immunglobulin-like“ Domäne gelegen. Die Mutationen G372C, A393E und Y375C liegen in Region II (Exon 10). Exon 10 liegt in der Nähe der transmembranen Domäne. Die Mutationen K652Q/E und

K652M/T liegen in Region III (Exon 15). Exon 15 ist im 2. Teil der Kinase-Domäne gelegen. Die Struktur des FGF-Rezeptors ist in Abbildung 2.6 ersichtlich.

Nach Entfernen der Excess Primer und dNTPs wurden acht SNaPshot Primer, welche neun FGFR3 Mutationen nachweisen, zu dem PCR Produkt hinzugefügt und mit einem markierten Dideoxynukleotid erweitert. Diese erweiterten Primer wurden mittels eines automatischen Sequenzer analysiert, wobei die Markierung auf dem inkorporierten Nukleotid das Vorhandensein oder Fehlen einer Mutation anzeigte. Alle Mutationen wurden durch eine zweite und unabhängige SNaPshot Analyse verifiziert.

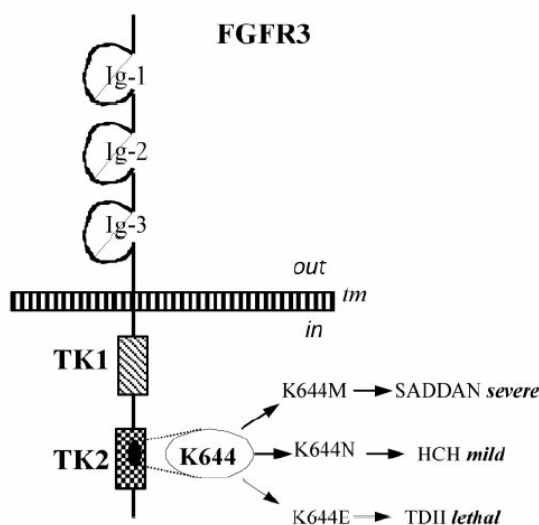


Abbildung 2.6: Struktur des FGF-Rezeptors mit 3 „immunglobulin-like“ Domänen, einer Transmembrandomäne und zwei Tyrosinkinasedomänen. Eingezeichnet sind als Beispiel die Mutationen, die zur Achondroplasie führen.

Jede DNA-Probe wurde auf alle sieben Mutationen untersucht. Dazu wurden alle drei Regionen mit Hilfe einer PCR amplifiziert. Die Primer-Sequenzen sind in Tabelle 2.3 gezeigt. Alle PCR-Produkte wurden auf Agarose-Gelen getestet. Außerdem wurden die PCR-Produkte mit Shrimp Alkaline Phosphatase (SAP) und Exol behandelt, um überschüssige dNTPs und Primer zu entfernen.

Region	Exon	Forward primer (5'-3')	Reverse primer (5'-3')
I	7	AGTGGCGGTGGTGGT-GAGGGAG	TGTGCGTCACTGTA-CACCTTGCAG
II	10	CAACGCCCATGTCTTTG-CAG	CGGGAAGCGGGA-GATCTTG
III	15	GACCGAGGACAACGT-GATG	GTGTGGGAAGGCGGTGTTG

Tab. 2.3: Die Primersequenzen für die Amplifikation von den FGFR-3-Regionen I, II und III

Für jede der sieben Mutationen wurde ein eigener Primer entwickelt, der genau angrenzend zu der potentiell mutierten Base bindet. Zuerst wurden mit Hilfe einer ersten PCR alle drei Regionen, die Mutationen enthalten können, amplifiziert. Nach der Behandlung mit SAP und Exol wurden die PCR-Produkte mit den SNaPshot-Primern inkubiert. Während der zweiten PCR wurden gekennzeichnete ddNTPs dazugegeben. Wenn ein ddNTP an der potentiellen Punktmutation in den DNA-Strang eingebaut wurde, wurde das mit einem Laserstrahl detektiert.

Für jede Probe wurde eine SNaPshot Reaktion („multiplex SNaPshot reaction“) durchgeführt. Am Ende wurden die PCR-Produkte der drei Regionen mit acht SNaPshot-Primern kombiniert (zwei Primer für die S249C Mutation).

Die Primersequenzen sind in der Tabelle 2.2 dargestellt.

Wenn das Ergebnis von einer Probe nicht eindeutig war, ist die SNaPshot Reaktion mit getrennten PCR-Fragmenten für nur eine Region („singleplex region I SNaPshot reaction“) wiederholt worden. Auch alle Tumoren, die keine Mutation im ersten Durchgang gezeigt haben, wurden erneut mit der „singleplex region I SNaPshot reaction“ untersucht. Die SNaPshot-Sequenzierung ist mit dem SNaPshot™ Multiplex Kit (Applied Biosystems, Foster City, USA) nach dem entsprechenden Protokoll durchgeführt worden. Die Analysen wurden am automatischen Sequenzer (ABI PRISM® 3100 Genetic Analyzer, Applied Biosystems, Foster City, USA) durchgeführt.

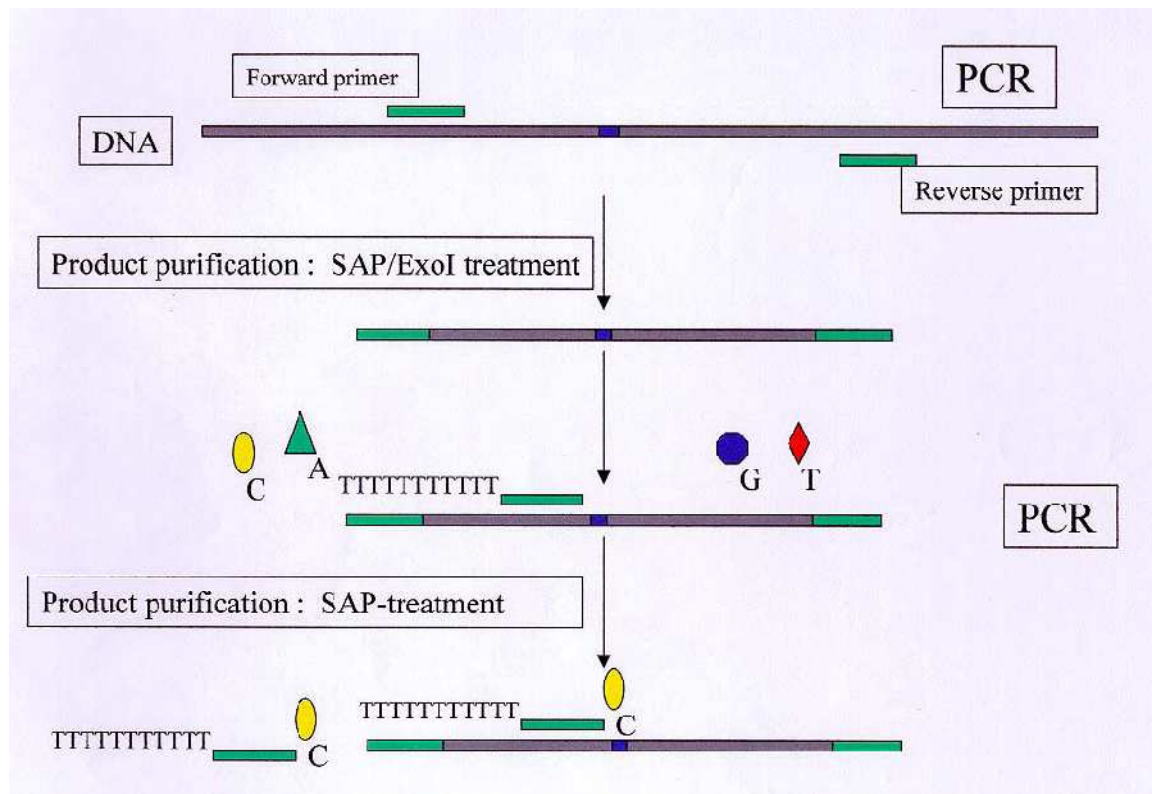


Abb. 2.7: Methode der SNaPshot-Sequenzierung. Die drei Regionen des FGFR3-Gens, die Punktmutationen enthalten können, werden in der ersten PCR-Reaktion amplifiziert. Nach der Behandlung mit SAP und ExoI werden die PCR-Produkte mit den SNaPshot-Primern inkubiert und ein ddNTP wird während der zweiten PCR an der potentiellen Punktmutation in den DNA-Srang eingebaut. Alle ddNTPs sind unterschiedlich gekennzeichnet, was durch einen Laserstrahl detektiert werden kann und in ein Signal transformiert werden kann.

Auswertung der Daten

Die Auswertung der Daten erfolgt mit Hilfe des automatischen Sequencers (ABI PRISM® 3100 Genetic Analyzer, Applied Biosystems, Foster City, USA). Ein Beispiel eines Ausdrucks zeigt die Abbildung 2.8.

Jedes ddNTP ist mit einer eigenen Farbe gekennzeichnet und kodiert. A ergibt ein grünes Signal, G ein blaues, T ein rotes und C ein schwarzes. Graue Signale bedeuten Standardsignale.

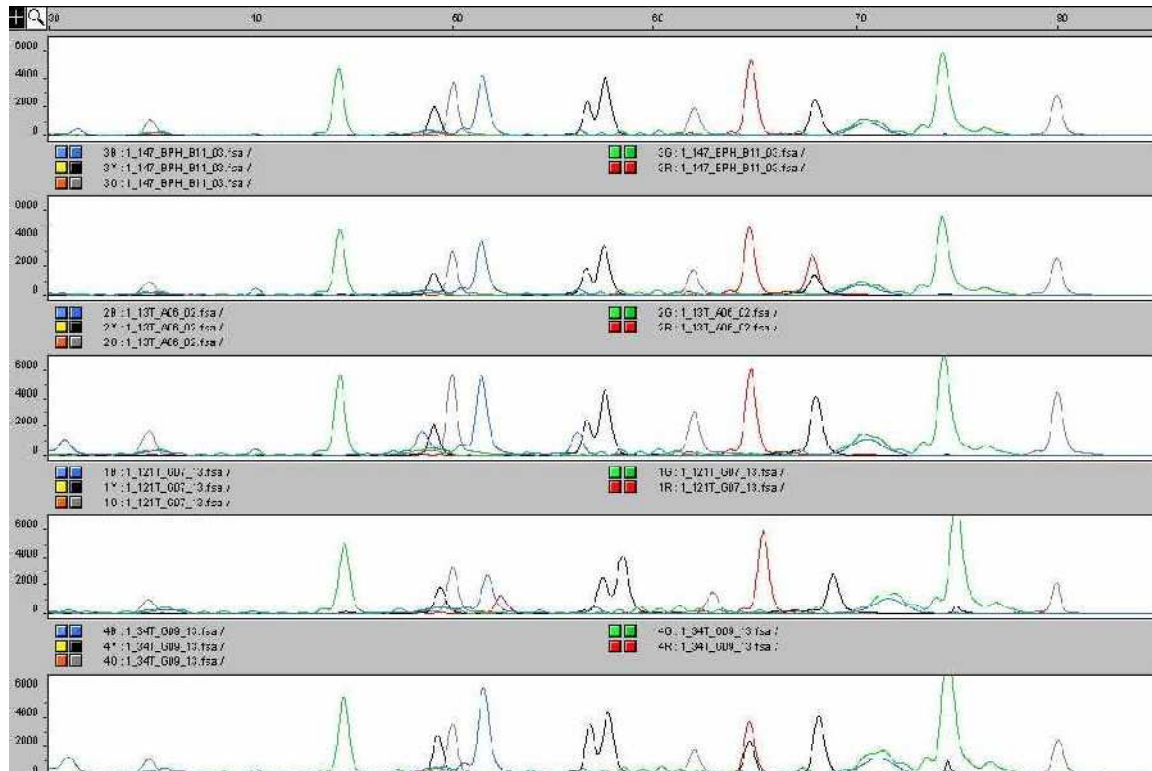


Abb. 2.8: Auswertung der Daten mit Hilfe des automatischen Sequencer (ABI PRISM® 3100 Genetic Analyzer, Applied Biosystems, Foster City, USA) . Wildtypsignale sind von links nach rechts: K652 (grün), S249 (schwarz), G372 (blau), S249 (schwarz), A393 (schwarz), Y375 (rot), R248 (schwarz) und K652 (grün). Von oben nach unten: Wildtyp (BPH-Kontrolle), R248C Mutation (C ist durch T ersetzt), S249C Mutation (C ist durch G ersetzt), G372C Mutation (G ist durch T ersetzt) und Y375C Mutation (A ist durch G ersetzt) (hier sieht man allerdings das Gegenteil, weil der Reverseprimer auf dem komplementären Strang benutzt wurde).

2.6 Statistik

Die statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe der Software SPSS in der Version 10.0 (SPSS, Chicago, IL, USA). Es wurden sämtliche Gewebeproben der TMAs voneinander unabhängig betrachtet. Ein statistischer Zusammenhang zwischen klinisch-pathologischen, immunhistochemischen und molekularen Daten wurde mit Kontingenztabellenanalyse und zweiseitigen exakten Tests nach Fisher untersucht. Die Überlebenskurven für Gesamtüberleben und rezidivfreies Überleben wurden nach Kaplan und Meier berechnet, wobei eine Abschätzung des statistischen Unterschieds mit zweiseitigem Log Rank-Test erfolgte. Als signifikant galt ein p-Wert von $<0,05$. Um die unabhängige Relevanz der molekularen Marker (CK20, MIB1, p53, FGFR3) als Prognosefaktoren zu zeigen, wurde ein COX-Regressionsmodell angepasst. Die Überprüfung proportionaler Hazards erfolgte mit log-negativ-log Plots.

3. Ergebnisse:

3.1 Molekulare Marker und Histopathologie:

In dieser Studie waren 263 Patienten mit primärem Harnblasenkarzinom eingeschlossen. An diesen Tumoren wurden drei immunhistochemische Marker (CK 20, p53, Ki-67) und der FGFR3 Mutationsstatus (Tabelle 2.1) untersucht.

Das Durchschnittsalter der betroffenen Patienten betrug 68 Jahre mit einer Spannweite von 34 – 94 Jahren. 149 Patienten (56,7%) hatten einen nicht-invasiven papillären Tumor (pTa), 50 (19%) einen pT1, 59 (22,4%) einen pT2, zwei (0,8%) einen pT3 und drei (1,1%) einen pT4 Tumor. 83 der Tumoren waren gut (G1), 69 nur mäßig (G2) und 111 wenig (G3) differenziert. Bei 36 Tumoren (13,7%) fand sich ein benachbartes Carcinoma in situ. In der Mehrzahl der Fälle (86,3%) war jedoch kein zusätzliches Carcinoma in situ nachweisbar. 208 Patienten (79,1%) wiesen multifokale Tumoren auf. 54,5% der pT1-pT4 Tumoren zeigten ein papilläres Wachstumsmuster auf, die restlichen Tumoren wuchsen solide (45,5%).

Molekular war bei 59,9% der pTa und pT1 Tumoren (n=94) eine FGFR3 Mutation nachweisbar. Die Minderheit zeigte also den genetischen Wildtyp von FGFR3.

Immunhistochemisch war der Ki-67 Proliferationsfraktion (bei einer Grenze von 25%) in 74,4% der Fälle erhöht. Die p53 Immunhistochemie war in 32% der Fälle positiv (Grenze 10%).

Das immunhistochemische Färbemuster von CK20 in den pTa und pT1 Tumoren war lediglich in 26,7% der Fälle normal. 99,3% der Fälle zeigten hierbei eine Immunreaktivität von 10% und mehr.

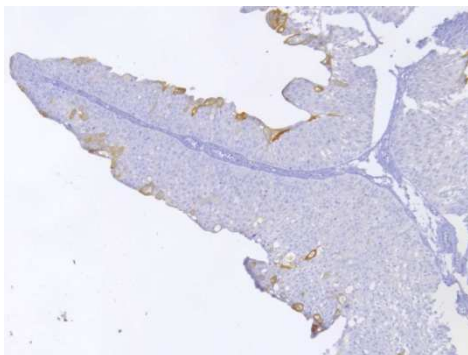


Abb. 3.1 Immunhistochemische Färbung mit CK20: normales Färbungsmuster, bei dem nur die Deckzellen gefärbt werden

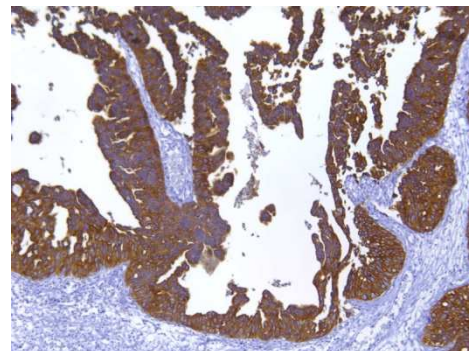


Abb. 3.2 Immunhistochemische Färbung mit CK20: abnormes Färbungsmuster mit CK20 Expressionen in allen Zellschichten

FGFR3 Mutationen wurden vor allem bei gut bis mäßig differenzierten Tumoren (G1-G2) sowie bei nicht-invasiven (pTa) und nicht-muskelinvasiven Tumoren ($p < 0.001$) gefunden. Eine p53 Überexpression war hingegen an unterschiedliche pathologische Parameter ($p < 0.001$) gekoppelt. FGFR3 Mutation und p53 Überexpression waren exklusive Ereignisse ($p < 0.001$) bei pTa und pT1 Harnblasenkarzinomen, mit einer Koinzidenz in nur 2% der Fälle (3/151). Interessanterweise zeigten pT1 und pTa Tumoren mit benachbartem pTis signifikant weniger FGFR3 Mutationen ($p < 0.001$). Tabelle 3.1 zeigt die Kreuztabellen zum Vergleich von FGFR3 Mutationsstatus mit pathologischen Parametern.

Des Weiteren untersuchten wir das CK20 Expressionsmuster in Verbindung mit histopathologischen Kriterien. Beispiele für normale und abnormale CK20 Expression finden sich in den Abbildungen 3.1 und 3.2. Eine abnorme CK20 Expression war signifikant mit höherem Malignitätsgrad und Tumorstadium assoziiert ($p < 0.001$). Jedoch zeigten 64% (94/143) der Harnblasenkarzinome im Stadium pTa ein abnormes CK20 Muster. Die histologische Untergruppe der PUNLMP zeigte sogar eine abnorme Expression des Dedifferenzierungsmarkers CK20 in 52% (11/21) der Fälle. In der Gruppe der pTa und pT1 Tumoren mit normalem CK20 Muster war in 88% (32/36) der Fälle das FGFR3 Gen mutiert, während bei abnormer CK20 Expression ($p < 0.001$) nur in 50% (57/58) der Fälle eine FGFR3

Tabelle 3.4 Vergleich zwischen *FGFR3* Status und CK20 IHC mit Tumorstadium und Malignitätsgrad

Variable	Kategorisierung	Stadium			Malignitätsgrad			Total
		pTa	pT1	≥ pT2	G1	G2	G3	
FGFR3/CK20								
	FGFR3 mut, CK20 normal	32	0	0	17	15	0	32
	FGFR3 mut, CK20 abnormal	50	7	4	29	23	9	61
	FGFR3 wt, CK20 normal	3	1	0	2	1	1	4
	FGFR3 wt, CK20 abnormal	28	27	47	9	19	74	102
	Total	113	35	51	57	58	84	199

Gen Mutation gefunden wurde.

Bei 92 von 141 pTa Tumoren fand sich ein abnormes Färbungsmuster der Urothelzellen für CK20, im Vergleich zu 45 von 46 pT1 Tumoren ($p < 0,001$). Auch der Grad der Differenzierung spielte eine Rolle in der Ausprägung der Immunaktivität von CK20 ($p < 0,001$), d.h. der Malignitätsgrad und die CK20 Immunreaktivität waren direkt korreliert. Je höher das Grading desto stärker war die Immunreaktivität. Bei G1 Tumoren fand sich eine abnorme Aktivität bei 45 von 76 Fällen (59,21%), bei G2 Tumoren bei 49 von 67 (73,12%) und bei G3 Tumoren sogar bei 43 von 44 (97,72%).

Das Wachstumsmuster ($p=1,0$), ein benachbartes Carcinoma in situ ($p=0,3$) und Multifokalität ($p=1,0$) wiesen keinen signifikanten Zusammenhang mit dem Ausprägungsmuster der CK20 Färbung auf.

Bei Vorliegen des FGFR3 Wildtyps fand sich in 58 von 62 Fällen (93,54%) eine abnorme Ausprägung der CK20 Immunreaktivität. Im Falle eines mutierten FGFR3 Typs lag in 57 von 89 Fällen (64,04%) eine CK20 Abnormität vor.

In dieser Studie konnte kein Zusammenhang zwischen der Ausprägung von CK20 und der Proliferation (Ki67) ($p=1,0$) gefunden werden.

Bei p53 Überexpression ($>10\%$) fand sich in 39 von 42 Fällen (92,85%) eine abnorme Immunreaktivität von CK20. Im Falle einer fehlenden p53 Überexpression war auch die Abnormität der CK20 Färbung weniger häufig (95/142, 66,9%).

Tabelle 3.2 *FGFR3* Mutationsstatus verbunden mit anderen molekularen Markern

<i>Variable</i>	<i>Kategorie</i>	Wildtyp	Mutant	p^a
Ki-67 IHC	$\leq 25\%$	54	84	<0.001
	$>25\%$	48	10	
p53 IHC	$\leq 10\%$	59	91	<0.001
	$>10\%$	48	5	
CK20 IHC	normal	4	32	<0.001
	abnormal	102	61	

^a Fisher's exakt Test, zweiseitig

3.2 Molekulare Marker und Krankheitsverlauf:

Endpunkte dieser Studie waren Rezidiv-freies Überleben (RFS) und Tumor-bedingtes Überleben. Leider waren keine klinischen Daten bezüglich des Progress-freien Überlebens für die in dieser Studie betrachteten Patienten vorhanden. Die korrespondierenden Kaplan-Meier Kurve zum Tumor-spezifischen Überleben sind in den Abbildungen 3.3 bis 3.6 für alle vier Marker dargestellt und zeigen, dass Patienten mit einem Harnblasenkarzinom und FGFR3 Mutation ein signifikant längeres Überleben aufweisen als Patienten ohne Mutation (Abb. 3.3). Im Gegensatz dazu hatten Patienten mit stark proliferierenden p53 positiven Tumoren sowie abnormer CK20 ein signifikant schlechteres Überleben (Abb. 3.4-3.6). Keiner der Parameter wies eine signifikante Assoziation mit einem Tumorrezidiv auf.

An der Tumorerkrankung starben insgesamt 41 von 261 Patienten ($p=0,0002$). Der Anteil des Tumor-assoziierten Todes (OS) aller Tumorstadien lag bei älteren Patienten (> 70 Jahre)

höher (29/117, 23,07%) als bei jüngeren (< 70 Jahre) (12/144, 8,33%). Der Tumor-assoziierte Tod trat signifikant häufiger bei Patienten mit einem Tumorstadium pT2 und höher auf ($p < 0,0001$). Auch bei höherem Malignitätsgrad (ab G2) trat der Tumor-bedingte Tod früher auf ($p < 0,0001$). Bei G1 Tumoren fand sich ein solches Ereignis in 2 von 82 Fällen (2,43%), bei G2 Tumoren in 3 von 69 Fällen (4,34%), bei G3 Tumoren sogar in 36 von 110 Fällen (32,72%). Bei benachbarten Carcinoma in situ, trat Tumor-assoziierte Tod ebenfalls früher auf (11/36, 30,55%) als ohne das Vorhandensein eines solchen. Auch bei Vorliegen eines multifokalen Tumors war die Zeit bis zum Tod im Vergleich zu unifokalen Tumoren kürzer ($p = 0,0008$). Auch das Wachstumsmuster war von Bedeutung für das Überleben: nur 9 von 61 (14,75%) Patienten mit papillären pT1-pT4 Tumoren starben. Im Gegensatz dazu starben 50% (25/50) der Patienten mit soliden Tumoren.

Bezüglich des Auftretens von Mutationen des FGFR3 Gens und dem Tumor-assoziierten Tod fand sich kein signifikanter Zusammenhang, ebenso bei CK20. Bei starker Anfärbung des Ki-67 (>10%) fand sich jedoch in 36 von 188 Fällen ein Tumor-bedingten Todesereignis, bei geringerer Anfärbung (<10%) nur in 5 von 64 Fällen (insgesamt $p = 0,03$). Bei der p53 IHC fand sich ein signifikanter Zusammenhang mit dem Auftreten eines Tumor-assoziierten Todes ($p = 0,04$).

In einer multivariaten Cox Regressions Analyse (Tumorstadium, Malignitätsgrad, benachbartes Carcinoma in situ, Multifokalität, FGFR3 Status, CK20 IHC, p53 IHC und Ki-67 IHC) fand sich kein unabhängiger Prognosefaktor für einen tumorbedingten Tod.

Tabelle 3.3 Univariate Cox Regressions Analyse für Tumor-spezifisches Überleben

Variable	Kategorie	n	Ereignis	5-Jahres-Überlebensrate	p ^a	HR	95% CI	p ^b
FGFR3	mutation	98	7	93%	0.002	1	[1.4-7.4]	0.008
	wild type	110	24	78%		3.2		
p53 IHC	≤10%	179	24	87%	0.03	1	[1.1-4.1]	0.02
	>10%	66	16	76%		2.2		
Ki-67 IHC	≤25%	168	14	92%	<0.001	1	[2.7-10.1]	<0.001
	>25%	68	25	63%		5.2		
CK20 IHC	normal	49	2	96%	0.01	1	[1.2-20.6]	0.03
	abnormal	192	37	81%		5.0		

^a Log Rank Test

^b Cox regression

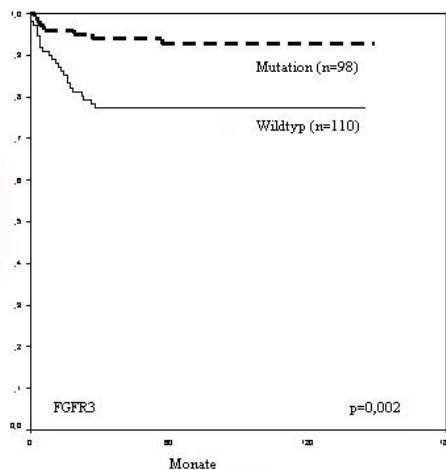
Des Weiteren erforschten wir die Kombination FGFR3 Status/Ki-67 IHC zusammen mit allen anderen möglichen Kombinationen molekularer Marker (FGFR3/CK20, FGFR3/p53,

CK20/Ki-67, CK20/p53, K-i67/p53) in unterschiedlichen Cox Regressionsmodellen. Keine dieser Kombinationen von molekularen Markern war ein unabhängiger Prognosefaktor für ein Rezidiv-freies und Tumor-spezifisches Überleben.

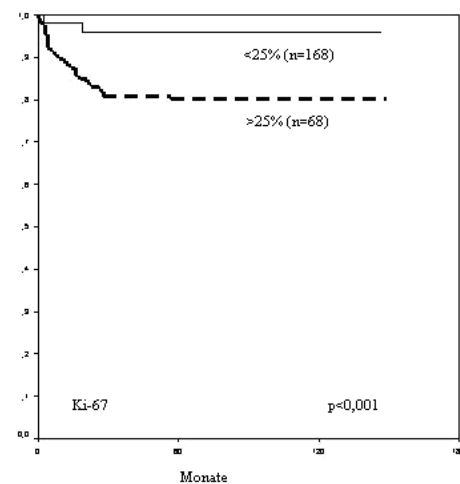
Abbildungen 3.3 -3.6

Kaplan-Meier Analyse zum Tumor-spezifischen Überleben. 3.3: FGFR3 Mutationsstatus (wt: Wildtyp, mut Mutant), 3.4: CK20 Färbungsmuster (normal: oberflächliches Färbungsmuster, abnormal: negativ oder >10% Färbung), 3.5: p53 Färbung (niedrig: <10% p53 positive Zellen, hoch: >10% positive Zellen), 3.6: Ki-67 Färbung (niedrig: <25% Ki-67 positive Zellen, hoch: >25% Ki-67 positive Zellen).

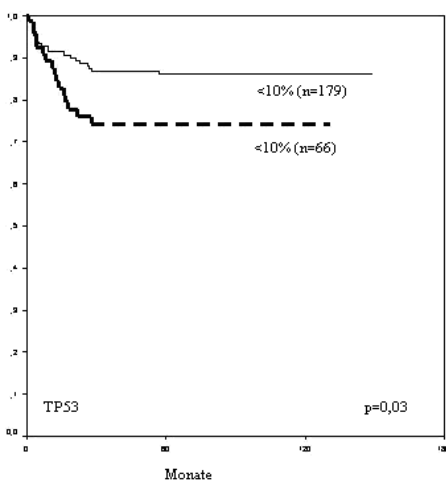
3.3



3.4



3.5



3.6

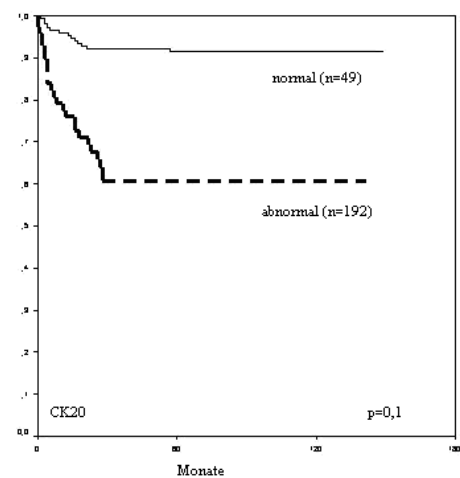


Tabelle 3.1 Vergleich der vier molekularen Marker mit traditionellen pathologischen Parametern

Variable	Kategorisierung	FGFR3 Mutationen			Ki-67 Expression			p53 Expression			CK20 Färbungsmuster		
		wt	mut	p ^a	≤25%	>25%	p ^a	≤10%	>10%	p ^a	normal	abnormal	p ^a
Tumorstadium													
	pTa	31	85		127	9		130	10		48	90	
	pT1	29	9		24	19		20	26		1	44	
	pT2	46	3	<0.001	16	36	<0.001	26	28	<0.001	0	53	<0.001
	pT3	2	0		1	1		0	2		0	2	
	pT4	2	1		0	3		3	0		0	3	
Histologischer Malignitätsgrad													
	G1	11	49		71	1		73	2		30	44	
	G2	20	38	<0.001	61	7	<0.001	58	10	<0.001	18	50	<0.001
	G3	79	11		36	60		48	54		1	98	
benachbartes Carcinoma <i>in situ</i>													
	no	81	95		155	51		165	48		48	164	
	yes	29	3	<0.001	13	17	0.001	14	18	<0.001	1	28	0.013
Multifokalität													
	unifokaler Tumor	25	14		30	18		33	19		10	40	
	multifokaler Tumor	85	84	0.2	138	50	1.0	146	47	0.1	39	152	1.0

^a Fisher's exakt Test, zweiseitig; fett gedruckte Werte repräsentieren p-Werte <0.05.

4. Diskussion

In der vorliegenden Studie wurde die Beziehung zwischen FGFR3 und drei molekularen Markern (CK20, p53 und Ki-67) untersucht, um alternative genetische Entstehungswege bei der Pathogenese der Harnblasenkarzinome zu charakterisieren.

Das Ziel dieser Studie war es, die vier etablierten molekularen Marker FGFR3, CK20, Ki-67 und p53 mit prognostischem Potential für Harnblasentumoren in einer großen Patientengruppe mit klinischen Nachsorgeuntersuchungen näher zu prüfen. Der Mutationsstatus von FGFR3 wurde bereits in vorangegangenen Studien als robuster Marker für die Prognose bei Patienten mit Harnblasenkarzinomen bewiesen [4,10].

Wir konnten bestätigen, dass eine Korrelation zwischen FGFR3 Mutation mit Tumoren von niedrigem Stage und Grade [2,4] und ein gegenseitiger Ausschluss von FGFR3 Mutation und p53 Überexpression [9,10] besteht. Des Weiteren belegt diese Studie, dass der FGFR3 Mutationsstatus kein unabhängiger Marker ist, aber dass er von den pathologischen Parametern Stage und Grade zur Vorhersage des Krankheitsverlaufs beeinflusst wird, sodass Stage und Grade immer noch bessere Prediktoren sind als FGFR3. Unabhängig davon ist FGFR3 dennoch ein nützlicher Marker, um oberflächliche Tumoren mit niedrigem malignem Potenzial zu identifizieren, da Mutationsanalysen zuverlässiger sind (100% Reproduzierbarkeit) als Stage und Grade (hohe untersucherabhängige Variabilität) [4]. Eine wichtige Limitierung in dieser Studie ist, dass der klinisch wichtigste Endpunkt für Harnblasenkarzinome, das Progressions-freie Überleben, in dieser Patienten-Kohorte nicht festgesetzt werden konnte.

Die Kombination FGFR3/Ki-67 war in unserer Studie kein unabhängiger Faktor zur Vorhersage von Tumor-spezifischem Überleben. Widersprüchliche Ergebnisse aus unterschiedlichen Studien, welche die molekularen Marker CK20, Ki-67 und p53 betrachten, meinen, dass dieses an inkonsistenten immunhistochemischen Färbungen und betrachtungsabhängiger Variabilität liegen kann, und weisen darauf hin, dass immunhistochemische Färbungen kein robustes Mittel sein könnten, um Vorhersagen über Krankheitsverläufe treffen zu können.

Man kann davon ausgehen, dass Veränderungen von FGFR3 und p53 zwei alternative genetische Entstehungswege bei der urothelialen Karzinogenese darstellen. FGFR3 Mutationen werden bei „low-stage/-grade“ Tumoren gefunden. p53 Alterationen sind an unterschiedliche pathologische Faktoren gekoppelt. So sind Veränderungen beider Parameter zeitgleich ein exklusives Ereignis bei pTa und pT1 Tumoren. Auch FGFR3 Mutationen und

ein Carcinoma in situ sind sich gegenseitig ausschließende Ereignisse (Übereinstimmung in nur 1% der Tumoren).

In einer anderen Studie wurde das molekulare Grading mit FGFR3 und MIB-1 gegenüber dem pathologischen Grading als Prädiktionsfaktor für das klinische Outcome beim urothelialen Karzinom als überlegen eingestuft [3]. Hier fand sich in ca. 88% der G1 Tumoren eine FGFR3 Mutation, bei G3 Tumoren war dieser Anteil wesentlich geringer (16%). Bei Betrachtung von p53 war das Ergebnis umgekehrt: nur 2% aller G1 Tumoren, aber 60% der G3 Tumoren wiesen eine Überexpression auf. Die molekularen Variablen waren besser reproduzierbar als das pathologische Grading [8]. Die vorhandene FGFR3 Mutation wurde bei besserem klinischem Outcome als positiver prognostischer Faktor angesehen. Zudem wurde hier ein Vorschlag zum molekularen Grading als neues, einfaches und leicht reproduzierbares Hilfsmittel zur Prognosestellung bei Urothelkarzinomen unterbreitet [11]. In wiederum einer anderen Arbeit findet sich die FGFR3 Mutation als sicherer Indikator für ein oberflächliches Harnblasenkarzinom mit einer niedrigen Rezidivrate, aufgrund deren Vorliegen die Häufigkeit zytoskopischer Kontrolluntersuchungen herabgesetzt werden kann [12]. Hier waren bei 14 von 23 Tumoren (60,9%) mit dem FGFR3 Wildtyp Rezidive aufgetreten; bei denen mit FGFR3 Mutation kam es bei 7 von 34 Tumoren (20,6%) zu einem Rezidiv.

Die Beobachtung, dass FGFR3 Mutationen nur sehr selten bei Patienten mit benachbartem Carcinoma in situ auftreten, wurde bereits beschrieben [4]. Die Assoziation zwischen FGFR3 und Carcinoma in situ wurde bereits von anderen Autoren betrachtet: Dyrskjot et al. erforschten zwei Gruppen von oberflächlichen Harnblasentumoren mit und ohne umgebendes Carcinoma in situ nach Genexpressionsmustern und fanden heraus, dass die Expression von FGFR3 bei Tumoren mit umgebendem Carcinoma in situ oft verstärkt ist [17]. In einer zweiten Studie entdeckten sie, dass eine signifikante Korrelation zwischen den Tumoren mit FGFR3 Mutation und den als nicht Carcinoma in situ klassifizierten Tumoren besteht [6]. Wir können diese Assoziation bestätigen. FGFR3 Mutationen bei Tumoren mit benachbartem Carcinoma in situ fehlten in unserer Studie generell. Das bedeutet, dass das Vorliegen einer FGFR3 Mutation Patienten ohne ein Carcinoma in situ identifizieren kann, was das Konzept, dass FGFR3 ein wichtiger Nachsorgemarker bei Patienten mit Harnblasenkarzinom ist, festigt.

Ein weiterer objektiver positiver Marker für das urotheliale Karzinom ist die Expression von Cytokeratin 20. Es kann hierbei für gewöhnlich in allen Schichten des Harntrakts nachgewiesen werden. CK20 ist ein exzellenter Marker für urotheliale Differenzierungen bei

Harnblasentumoren. Die Beobachtung, dass 65% der pTa Tumoren ein abnormales CK20 Muster besitzen, lassen darauf schließen, dass die CK20 Dysregulierung ein frühes Ereignis bei der Entwicklung eines papillären Harnblasenkarzinoms ist. Die Ergebnisse zur Vorhersage des Krankheitsverlaufs sind jedoch inkonsistent. Harnden et. al. zeigten, dass Tumoren mit normaler CK20 Expression weniger häufig rezidierten [7,13], während andere Autoren keine signifikante Korrelation zwischen CK20 Expression und Rezidivhäufigkeit fanden [14]. Es findet sich in der vorliegenden Studie bei 92 von 141 pTa Tumoren und bei 45 von 46 pT1 Tumoren eine erhöhte CK20 Immunreaktivität. Die abnorme Ck20 Expression scheint sich später als die FGFR3 Mutation zu ereignen; bei 43 von 44 G3 Tumoren zeigt sich in dieser Studie eine abnorme CK20 Aktivität, während es bei G1 Tumoren 45 von 75 und bei G2 Tumoren 49 von 67 sind. Auch scheint die Rezidivrate eines Tumors bei abnormer CK20 Expression erhöht zu sein, wie in einer Versuchsreihe gezeigt wurde, bei der es bei 30 von 41 Tumoren mit abnormer Expression erneut zu einem Tumoraufreten kam [7]. In derselben Studie wurde nur in 10 von 58 Fällen mit normaler CK20 Expression ein Tumorrezidiv nachgewiesen. In unserer Studie korrelierte die CK20 Expression nicht signifikant mit einem Rezidiv-freien Überleben. CK20 stellt damit besonders bei der Unterscheidung eines neoplastischen oder reaktiven Prozesses einen wertvollen Marker dar, der besonders in Fällen mit nicht eindeutiger Histologie wertvoll sein kann.

Zahlreiche Studien untersuchten den Nutzen der Ki-67 Expression als Prognosefaktor, welche ein Marker für die Zellproliferation ist. Die p53 Expression stellt hingegen einen Marker für die Progression von Urothel-Ca dar. Die meisten Studien scheiterten daran, unabhängige prognostische Signifikanz für beide Marker zu demonstrieren, auch wenn kürzlich Quintero et al. zeigten, dass Ki-67 ein unabhängiger Prognosefaktor für das Progression-freie und Gesamtüberleben bei niedriggradigen Harnblasenkarzinomen ist [15]. In unserer Studie waren Ki-67 und p53 mit dem Tumor-spezifischen Überleben stark assoziiert, sie waren jedoch keine unabhängigen Prädiktoren.

Bei der Betrachtung der Methode stellt sich zunächst die Frage der Repräsentativität der TMAs im Vergleich zu kompletten histologischen Schnittpräparaten. Hierzu gibt es zahlreiche Untersuchungen, in denen nachgewiesen wurde, dass die TMA-Methode den Schnittpräparaten in nichts nachsteht. So beschreibt Nielsen in einem Versuch bei dem TMA-Präparate und Sektionen mit unterschiedlichen Markern (u.a. CK20, p53) gefärbt wurden, dass die Ergebnisse des Versuchs mit bereits veröffentlichten Ergebnissen von Untersuchungen am Großflächenschnitt deutlich kompatibel waren [1]. Der Vorteil der TMA-Methode ist, dass lokale Unterschiede bei der Gewebefixation, -bearbeitung und -färbung

berücksichtigt werden. Dadurch können kostengünstig Variablen zwischen unterschiedlichen Laboratorien in Bezug auf immunhistochemische Färbungen ausgeschaltet werden [1]. Auch van Rijn et al. beschreiben, dass die TMA Technik eine effektive Möglichkeit darstellt, im Verlauf Untersuchungen auszudehnen und zu validieren, deren Ergebnisse man in der Phase der vorausgehenden Untersuchungsphase erhalten hat [3]. Darüber hinaus ist die TMA Technik eine gute Methode zur Qualitätssicherung bei immunhistochemischen Färbungen und in situ Hybridisierungen.

Unter Zusammenschau der oben genannten Aspekte scheint also von den vier molekularen Markern (FGFR3, CK20, p53, Ki-67), FGFR3 die beste Voraussage über das erkrankungsspezifische Überleben bei papillären nicht-invasiven Harnblasenkarzinomen zu erlauben.

In den letzten Jahren wurde deutlich, dass FGFR3 Mutationen eine prognostisch günstige molekulare Veränderung bei Harnblasentumoren sind, was durch die Korrelation zwischen FGFR3 Mutation mit normalem CK20 Muster konsolidiert wird. Dies zeigten wir hier zum ersten Mal. Harnden et al. zeigten, dass Veränderungen der urothelialen Differenzierung über das Expressionsmuster von CK20 überwacht werden können und dass die Retention eines normalen Musters ein guter Indikator für eine normale Differenzierung ist [7,16]. Wir finden, dass die Präsenz eines normalen CK20 Musters und einer Mutation im FGFR3 Gen mit der Gruppe der pTa G1/2 Tumoren korreliert. Dies suggeriert, dass die Kombination dieser beider Marker besser in der Lage ist, die Gruppe der niedrig-gradigen nicht-invasiven papillären Tumoren zu definieren (wie vorgeschlagen in dem zwei-Entwicklungswege-Modell der urothelialen Tumorgenese [19]) als die Betrachtung der FGFR3 Mutation alleine. Die FGFR3 mutierten Tumoren mit einem abnormalen CK20 Expressionsmuster sind weniger differenziert und zeigen höheres Staging (18%) und Grading (15%). Die Kombination aus FGFR3 und CK20 stellt damit einen sehr guten prognostischen Marker für oberflächliche Harnblasentumore dar.

Prospektive Studien, welche sich mit dem Progressions-freien Überleben beschäftigen, sollten dies näher untersuchen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die vier molekularen Marker FGFR3, p53, Ki-67 und CK20 signifikante Marker für das Tumor-spezifische Überleben von Harnblasenkarzinom Patienten sind, obgleich sie keine unabhängigen Marker sind. FGFR3 Mutationen finden zeitlich früher als CK20 Expressionsdysregulationen statt und die Korrelation von FGFR3 Mutationen mit einem normalem CK20 Färbungsmuster weist auf eine Assoziation dieser genetischen Veränderung mit gut differenzierten Tumoren hin. Es können zwei alternative

Entstehungswege für Harnblasenkarzinome unterschieden werden: zum einen FGFR3 Mutationen und normale Ck20 Muster, zum anderen p53 Alterationen, hohe Proliferationsfraktion und Vorhandensein eines Carcinoma in situ.

5. Zusammenfassung

Molekulare Marker werden zusätzlich zu konventionellen klinisch-pathologischen Parameter benötigt, um den Krankheitsverlauf bei Patienten mit Harnblasenkarzinom vorherzusagen. In dieser Studie untersuchten wir vier dieser Marker (Ki-67, p53, CK20, FGFR3) bei 255 primären urothelialen Harnblasenkarzinomen und verglichen sie mit traditionellen klinisch-pathologischen Eigenschaften (Stage, Grade, Multifokalität, benachbartes Carcinoma in situ). Es wurden TMAs benutzt, um die CK20-, p53- und Ki-67 Expression bei 255 unselektierten Patienten immunhistochemisch zu untersuchen. Das Expressionsverhalten von CK20 wurde als normal (oberflächliche Färbung der Deckzellen) oder abnormal (negative Expression oder $\geq 10\%$ positive Zellen) bewertet. FGFR3 Mutationen wurden mittels SNaPshot Analysen ermittelt.

FGFR3 Mutationen wurden häufig bei low-stage/-grade Tumoren gefunden, während p53 Mutationen und eine erhöhte Proliferationsfraktion (Ki-67) ungünstige Prognosefaktoren waren. FGFR3 Mutationen und p53 Überexpressionen waren exklusive Ereignisse ($p < 0.001$), die nur in 2% der Fälle zusammen auftraten (5/209). Interessanterweise zeigten pT1 und pTa Tumoren mit benachbartem pTis signifikant weniger FGFR3 Mutationen ($p < 0.001$). Abnormale CK20 Expression war stark mit höherem Tumorgrad und Tumorstadium ($p < 0.001$) verbunden. Allerdings zeigten 65% (92/141) der pTa Tumoren ebenfalls ein abnormales CK20 Muster. In der Gruppe der Harnblasentumoren mit normalem CK20 Muster fanden sich in 89% (32/36) Mutationen des FGFR3 Gens, während ein mutiertes FGFR3 Gen in nur 37% (61/163) der Fälle mit einer abnormalen CK20 Expression ($p < 0.001$) nachgewiesen wurde. Alle vier Marker waren univariat mit tumorspezifischem Überleben assoziiert. In den multivariablen Analysen waren sie jedoch nicht unabhängig von klassischen pathologischen Parametern. Keiner der molekularen Marker war signifikant mit einem Tumorrezidiv verbunden.

Wir schlussfolgern, dass die Dysregulation der CK20 Expression ein frühes Ereignis in der Karzinogenese von papillären nicht-invasiven Harnblasenkarzinomen darstellt, sich aber später ereignet als FGFR3 Mutationen. Die Gruppe der low-grade nicht-invasiven papillären Tumoren ist durch das Vorkommen einer FGFR3 Mutation und einem normalen CK20 Expressionsmuster definiert.

6. Literaturverzeichnis

- 1) HSU FD, Nielsen TO, Alkushi A, Dupuis B, Huntsman D, Liu CL, van de Rijn M, Gilks CB. Tissue microarrays are an effective quality assurance tool for diagnostic immunohistochemistry. *Mod Pathol*. 2002 Dec; 15(12):1374-80.
- 2) 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 Jun;158(6):1955-9.
- 3) M van Rijn, C B Gilks. Applications of microarrays to histopathology. *Histopathology* 2004, 44, 97-108.
- 4) Van Rhijn BWG, Vis AN, Van der Kwast ThH, Kirkels WJ, Radvanyi F, Ooms ECM, 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(10):1912-21.
- 5) P Harnden, I Eardly, A D Joyce, J Southgate. Cytokeratin 20 as an objective marker of urothelial dysplasia. *British Journal of Urology* (1996), 78, 80-875.
- 6) Zieger K, Dyrskjot L, Wiuf C, Jensen JL, Andersen CL, Jensen KM, Orntoft TF. Role of activating fibroblast growth factor receptor 3 mutations in the development of bladder tumors. *Clin Cancer Res* 2005 Nov 1;11(21):7709-19.
- 7) P Harnden, N Mahmood, J Southgate. Expression of cytokeratin 20 redefines urothelial papillomas of the bladder. *Lancet* 1999, 353, 974-77
- 8) Zivko Popov, Andras Hoznek, Marc Colombel, Sylvie Bastuyi-Garin, Marie-Aude Lefrere-Belda, Jacqueline Bellot, Claude C Abbou, Catherine Mazerolles, Dominique K Chopin. The prognostic value of p53 nuclear overexpression and MIB-1 as a proliferative marker in transitional cell carcinoma of the bladder

-
- 9) Bakkar AA, Wallerand H, Radvanyi F, Lahaye JB, Pissard S, Lecerf L, Kouyoumdjian JC, Abbou CC, Pairen 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 Dec 1;63(23):8108-12.
- 10) Van Rhijn BWG, van der Kwast TH, Vis AN, Kirkels WJ, Boeve ER, Jobsis AC, Zwarthoff EC. FGFR3 and P53 characterize alternative genetic pathways in the pathogenesis of urothelial cell carcinoma. *Cancer Res* 2004 Mar 15;64(6):1911-4.
- 11) Van Rijn BWG, Vis AN, van der Kwast TH, Kirkels WJ, Radvanyi F, Ooms EMC, 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 pathologic grade for the prediction of clinical outcome. *J Clin Oncol*, Vol 21, No 10, 2003, pp 1912-1921
- 12) VanRijn 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 research* 61, 1265-8, February 15, 2001.
- 13) Harnden P, Allam A, Joyce AD, Patel A, Selby P, Southgate J. Cytokeratin 20 expression by non-invasive transitional cell carcinomas: potential for distinguishing recurrent from non-recurrent disease. *Histopathology* 1995;27:169-74.
- 14) Alsheikh A, Mohamedali Z, Jones E, Masterson J, Gilks CB. Comparison of the WHO/ISUP classification and cytokeratin 20 expression in predicting the behavior of low-grade papillary urothelial tumors. *Mod Pathol* 2001;14(4):267-72.
- 15) 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(1):83-8.
- 16) Mhawech-Fauceglia P, Cheney RT, Fischer G, Beck A, Herrmann FR. FGFR3 and p53 protein expressions in patients with pTa and pT1 urothelial bladder cancer. *Eur J Surg Oncol* 2006;32(2):231-7.

-
- 17) Dyrskjød L, Kruhøffer M, Thykjaer T, Marcussen N, Jensen JL, Møller K, Ørntoft TF. Gene expression in the urinary bladder: a common carcinoma in situ gene expression signature exists disregarding histopathological classification. *Cancer Res* 2004;64:4040-8.
- 18) Harnden P, Eardley I, Joyce AD, Southgate J. Cytokeratin 20 as an objective marker of urothelial dysplasia. *Br J Urol*. 1996;78(6):870-5.
- 19) Wu XR, Urothelial tumorigenesis: a tale of divergent pathways. *Nat Rev Cancer* 2005;5(9):713-25.
- 20) Negri CP, La Vecchia C (2001). Epidemiology and prevention of bladder cancer. *Eur J Cancer Prev* 10:7-14.
- 21) Pashos CL, Botteman MF, LAskin BL, Redaelli A (2002). Bladder cancer: epidemiology, diagnosis, and management. *Cancer Pract* 10: 311-322.
- 22) Tanguay C, Harvey I, Houde M, Srigley JR, Tetu B (2003). Leiomyosarcoma of urinary bladder following cyclophosphamide therapy: report of two cases. *Mod Pathol* 16: 512-514.
- 23) Smith AH, Goycolea M, Haque R, Biggs ML (1998). Marked increase in bladder and lung cancer mortality in a region of Northern Chile due to arsenic in drinking water. *Am J Epidemiol* 147: 660-669.
- 24) Messing EM, Vaillancourt A (1990). Hematuria screening for bladder cancer. *J Occup Med* 32: 838, 845.
- 25) Varkarakis MJ, Gaeta J, Moore RH, Murphy GP (1974). Superficial bladder tumor. Aspects of clinical progression. *Urology* 4: 414-420.
- 26) Satho E, Miyao N, Tachiki H, Fujisawa Y (2002). Prediction of muscle invasion of bladder cancer by cystoscopy. *Eur Urol* 41: 178-181.

-
- 27) Philip AT, Amin MB, Tamboli P, Lee TJ, Hill CE, Ro JY (2000). Intravesical adipose tissue: a quantitative study of its presence and location with implications for therapy and prognosis. *Am J Surg Pathol* 24: 1286-1290.
- 28) Paik K, Sakaguchi N, Resnick MI (2000). Limitations of computerized tomography in staging invasive bladder cancer before radical cystectomy. *J Urol* 163: 1693-1696.
- 29) Shvarts O, Han KR, Seltzer M, Pantuck AJ, Beldegrun AS (2002). Positron emission tomography in urologic oncology. *Cancer Control* 9: 335-342.
- 30) Tsuda K, Narumi Y, Nakamura H, Nonomura I, Okuyama A (2000). Staging urinary bladder cancer with dynamic MR imaging. *Hinyokika* 46: 835-839.
- 31) Vieweg J, Gschwend JE, Herr HW, Fair WR (1999). Pelvic lymph node dissection can be curative in patients with node positive bladder cancer. *J Urol* 161: 449-454.
- 32) Lopez-Beltran A, Croghan GA, Croghan I, Matilla A, Gaeta JF (1994). Prognostic factors in bladder cancer. A pathologic, immunohistochemical, and DNA flow-cytometric study. *Am J Clin Pathol* 102: 109-114.
- 33) Pycha A, Mian C, Posch B, Haitel A, Mokhtar AA, el Baz M, Ghonheim MA, Marberger M (1999). Numerical chromosomal aberrations in muscle invasive squamous cell and transitional cell cancer of the urinary bladder: an alternative to classic prognostic indicators? *Urology* 53: 1005-1010.
- 34) Lopez-Beltran A, Pacelli A, Rothenberg HJ, Wollan PC, Zincke H, Blute ML, Bostwick DG (1998). Carcino-sarcoma and sarcomatoid carcinoma of the bladder: clinicopathological study of 41 cases. *J Urol* 159: 1497-1503.
- 35) McCullough DL, Lamma DL, McLaughlin AP3rd, Gittes RF (1975). Familial transitional cell carcinoma of the bladder. *J Urol* 113: 629-635.

-
- 36) Schoenberg M, Kiemeny L, Walsh PC, Griffin CA, Sidransky D (1996). Germline translocation t(5;20)(p15;q11) and familial transitional cell carcinoma. *J Urol* 155: 1035-1036.
- 37) Richter J, Beffa L, Wagner U, Schraml P, Gasser TC, Moch H, Mihatsch MJ, Sauter G (1998). Patterns of chromosomal imbalances in advanced urinary bladder cancer detected by comparative genomic hybridization. *Am J Pathol* 153: 1615-1621.
- 38) Ravery V, Grignon DJ, Angulo J, Pontes E, Montie J, Crissman J, Chopin D (1997). Evaluation of epidermal growth factor receptor, transforming growth factor alpha, epidermal growth factor and c.erbB2 in the progression of invasive bladder cancer. *Urol Res* 25: 9-17.
- 39) Orntoft TF, Wolf H (1998). Molecular alterations in bladder cancer. *Urol Res* 26: 223-233.
- 40) Nguyen PL, Swanson PE, Jaszcz W, Aeppli DM, Zhang G, Singleton TP, Waard S, Dykoski D, Harvey J, Niehans GA (1994). Expression of epidermal growth factor receptor in invasive transitional cell carcinoma of the urinary bladder. A multivariate survival analysis. *Am J Clin Pathol* 101: 166-176.
- 41) Shin KY, Kong G, Kim WS, Lee TY, Woo YN, Lee JD (1997). Overexpression of cyclin D1 correlates with early recurrence in superficial bladder cancers. *Br J Cancer* 75: 1788-1792.
- 42) Shiina H, Igawa M, Shigeno K, Yamasaki Y, Urakami S, Yoneda T, Wada Y, Honda S, Nagasaki M (1999). Clinical significance of mdm2 and p53 expression in bladder cancer. A comparison with cell proliferation and apoptosis. *Oncology* 56: 239-247.
- 43) Rodriguez-Alonso A, Pita-Fernandez S, Gonzalez-Carrero J, Nogueira-March JL (2000). Multivariate analysis of survival, recurrence, progression and development of metastasis in T1 and T2a transitional cell bladder carcinoma. *Cancer* 94: 1677-1684.
- 44) Lapham RL, Grignon DJ, Ro JY (1997). Pathologic prognostic parameters in bladder urothelial biopsy, transurethral resection, and cystectomy specimens. *Semin Diagn Pathol* 14: 109-122.

-
- 45) Tiguert R, Lessard A, So A, Fradel Y (2002). Prognostic markers in muscle invasive bladder cancer. *World J Urol* 20: 190-195.
- 46) Van Rhijn BW, Montironi R, Zwartoff EC, Jobsis AC, Van der Kwast TH (2002). Frequent FGFR3 mutations in urothelial papilloma. *J Pathol* 198: 245-251.
- 47) Murphy WM (1989). *Urologic Pathology*. WB Saunders: Philadelphia.
- 48) Malmstrom HM, King ME, de Luca FR, Navarro J, Talerman A, Young RH (1991). Giant multilocular prostatic cystadenoma: a distinctive lesion of the retroperitoneum in men. A report of two cases. *Am J Surg Pathol* 15: 131-135.
- 49) PichA, Chiusa L, Formiconi A, Galliano D, Navone R (2001). Biologic differences between noninvasive papillary urothelial neoplasms of low malignant potential and low-grade (grade 1) papillary carcinomas of the bladder. *Am J Surg Pathol* 25: 1528-1533.
- 50) Orozco RE, vander Zwaag R, Murphy WM (1993). The pagetoid variant of the urothelial carcinoma in situ. *Hum Pathol* 24: 1199-1202.
- 51) Simon R, Burger H, Semjonow A, Hertle L, Terpe HJ, Bocker W (2000). Patterns of chromosomal imbalances in muscle invasive bladder cancer. *Int J Oncol* 17: 1025-1029.
- 52) Steidl C, Simon R, Burger H, Brinkschmidt C, Hertle L, Bocker W, Terpe HJ (2002). Patterns of chromosomal aberrations in urinary bladder tumours and adjacent urothelium. *J Pathol* 198: 115-120.

7. 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 die 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

Elke Roßkopf