

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

**Zur prognostischen Relevanz immunhistochemischer Parameter
bei invasiven Urothelkarzinomen der Harnblase**

Inauguraldissertation

**zur Erlangung der Doktorwürde
der Universität zu Lübeck
- aus der Medizinischen Fakultät -**

**vorgelegt von
Anne Mahnken
aus Oldenburg**

Lübeck 2007

1. Berichtstatter: Prof. Dr. med. Stefan Krüger

2. Berichtstatter: Priv.-Doz. Dr. med. Christian Doehn

3. Berichtstatter: Prof. Dr. med. J. Lüttges

Tag der mündlichen Prüfung: 16.01.2008

zum Druck genehmigt. Lübeck, den 16.01.2008

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1. Einleitung	1
1.1. Epidemiologie	1
1.2. Ätiologie	2
1.3. Etablierte Prognosefaktoren	3
1.3.1. Tumorstadium (pT-Status)	4
1.3.2. Lymphknotenstatus (pN-Status)	5
1.3.3. Histologischer Malignitätsgrad (Grading)	5
1.4. Genetische Veränderungen	7
1.5. Immunhistologie	8
1.5.1. Ki-67-Antigen	8
1.5.2. Topoisomerase 2 α (Top-2 α)	8
1.5.3. p53	9
1.5.4. p16	9
1.5.5. E-Cadherin	10
1.5.6. Clusterin	10
1.5.7. HER2	11
1.5.8. MDR	11
1.6. Fragestellung	12
2. Material und Methoden	14
2.1. Patientenkollektiv	14
2.1.1. Minimal-invasive Karzinome	14
2.1.2. Muskelinvasive Karzinome	15
2.2. Immunhistochemie	16
2.3. Statistische Analyse	24
3. Ergebnisse	26
3.1. Etablierte Prognosefaktoren und allgemeine Parameter	26
3.1.1. Lymphknotenstatus	26
3.1.2. Tumorstadium	26

3.1.3.	Substaging von pT1-Tumoren	27
3.1.4.	Histologischer Malignitätsgrad	31
3.1.5.	Multizentrität	32
3.1.6.	Patientenalter	32
3.1.7.	Geschlecht	32
3.1.8.	Chemotherapie-Status	34
3.2.	Immunhistochemische Parameter	34
3.2.1.	Ki-67-Expression	34
3.2.2.	Top-2 α -Expression	38
3.2.3.	p53-Expression	40
3.2.4.	p16-Expression	42
3.2.5.	E-Cadherin-Expression	43
3.2.6.	Clusterin-Expression	44
3.2.7.	HER2-Expression	45
3.2.8.	MDR-Expression	46
3.3.	Multivariate Analyse	47
3.4.	Beantwortung der unter 1.6. formulierten Fragestellung	49
4.	Diskussion	51
4.1.	Etablierte Prognosefaktoren und allgemeine Parameter	52
4.1.1.	Lymphknotenstatus (pN-Status)	52
4.1.2.	Tumorstadium (pT-Status)	53
4.1.3.	Tumorstadium-Subklassifikation (Substaging)	53
4.1.4.	Histologischer Malignitätsgrad (Grading)	54
4.1.5.	Multizentrität	55
4.1.6.	Patientenalter	55
4.1.7.	Geschlecht	56
4.2.	Immunhistochemische Parameter	56
4.2.1.	Ki-67-Expression	56
4.2.2.	Top-2 α -Expression	57
4.2.3.	p53-Expression	58
4.2.4.	p16-Expression	59

4.2.5.	E-Cadherin-Expression	60
4.2.6.	Clusterin-Expression	61
4.2.7.	HER2-Expression	63
4.2.8.	MDR-Expression	64
4.3.	Limitationen dieser Arbeit	65
4.4.	Ausblick	67
5.	Zusammenfassung	68
6.	Literaturverzeichnis	70
7.	Anhang	
7.1.	Studiengenehmigung durch die Ethikkommission	88
7.2	Danksagung	88
7.2.	Lebenslauf	89
7.3.	Publikationen	90

1. Einleitung

1.1. Epidemiologie

Die Diagnose „Harnblasenkrebs“ wird in Deutschland pro Jahr etwa 25.950 mal gestellt. Dabei sind Männer mit einer Inzidenzrate von 46,8 pro 100.000 Einwohner nahezu dreimal so häufig betroffen wie Frauen, die eine Rate von 16,9 pro 100.000 Einwohner aufweisen. Insgesamt machen Harnblasenkarzinome bei Männern etwa 8,6% und bei Frauen 3,5% aller bösartigen Neubildungen aus. Damit ist dieser Krebs in Deutschland und den USA hinter dem Prostata-, Lungen- und Dickdarmkrebs die vierthäufigste bösartige Erkrankung des Mannes. Bei der Frau nimmt er in dieser Hinsicht in Deutschland den achten und in den USA den zehnten Rang ein (Arbeitsgemeinschaft Bevölkerungsbezogener Krebsregister in Deutschland, 2006; Jemal et al., 2006).

Das mittlere Erkrankungsalter liegt für Männer bei 70 und für Frauen bei 73 Jahren. Bei den bösartigen Neubildungen der Harnblase handelt es sich größtenteils (zu 95%) um Urothelkarzinome, die synonym auch als Transitionalzellkarzinome oder Übergangszellkarzinome bezeichnet werden. Plattenepithel- (2%) oder Adenokarzinome (3%) kommen wesentlich seltener vor. Andere Formen wie kleinzellige, spindelzellige, lymphoepitheliomartige oder Urachuskarzinome werden als Raritäten beschrieben (Sökeland et al., 2004).

Bei der Erstdiagnose haben 70% der Patienten einen papillären oder flachen (in situ) Tumor (Ta, Tis, T1), bei 30% der Erkrankten ist der Tumor bereits in die Muskulatur vorgewachsen (T2-T4). Aufgrund der Tatsache, dass viele Tumoren in einem nicht-invasiven oder minimal-invasiven Stadium diagnostiziert und therapiert werden, ist die Prognose insgesamt relativ gut. Dies spiegelt sich auch in der Tatsache wider, dass die jährliche Mortalitätsrate, die bei Männern etwa 8,5 und bei Frauen etwa 4,8 pro 100.000 Einwohner beträgt, deutlich niedriger liegt als die Inzidenzrate.

Die 5-Jahres-Überlebensrate (5-JÜR) variiert stark und hängt vom Ausmaß der Tumorausbreitung bei Diagnosestellung ab. Wenn man alle Tumorstadien zusammen betrachtet, beträgt die 5-JÜR bei Männern etwa 78% und bei Frauen etwa 72%. Betrachtet man invasive Harnblasentumoren alleine, so beträgt die durchschnittliche 5-JÜR bei Männern 57% und bei Frauen 53% (Arbeitsgemeinschaft Bevölkerungsbezogener Krebsregister in Deutschland, 2006). Eine differenziertere Betrachtung der Prognose erfolgt im Zusammenhang mit den jeweiligen Prognosefaktoren.

1.2. Ätiologie

Bei der Entstehung von Blasenkrebs handelt es sich um ein multifaktorielles Geschehen (Brandau und Böhle, 2001). Dabei stellt der Nikotinabusus einen Hauptrisikofaktor dar: Etwa 50% der Harnblasenkarzinompatienten sind langjährige Raucher. Ein frühes Einstiegsalter und die Anzahl der konsumierten Zigaretten korrelieren dabei signifikant mit dem Erkrankungsrisiko. Insgesamt besitzen Raucher im Vergleich zu Nichtrauchern ein etwa 4-fach erhöhtes Risiko, an Blasenkrebs zu erkranken (Lopez-Abente et al., 1991). Hauptverantwortlich dafür sind vermutlich aromatische Amine, die im Zigarettenrauch nachgewiesen werden konnten (Patrianakos et al., 1979).

Neben dem Tabakkonsum gilt die Exposition gegenüber bestimmten Chemikalien als Risikofaktor. Gesteigerte Inzidenzen von Harnblasenkarzinomen fand man besonders bei Beschäftigten der Farbstoff-, Textil- und Leder, Druck- und Gummiindustrie, bei Friseuren, Schneidern und bei mit Teerprodukten in Kontakt stehenden Personen, was besonders auf die früher verwendeten Azofarbstoffe zurückzuführen ist. Diese Farbstoffe werden auf der Basis der aromatischen Amine Benzidin, 4-Aminophenyl, 2-Naphtylamin und 4-Chlor-o-Tolidin synthetisiert, Stoffe mit nachgewiesener Kanzerogenität. Harnblasenkrebs kann auch bei Expositionsdauern unter einem Jahr noch mit einer Latenz von durchschnittlich 20 bis 30 Jahren auftreten (Stasik, 1988). Die Exposition gegenüber bestimmten Halogenverbindungen (Trihalomethane THM), die bei zur Wasserdesinfektion durchgeführter Chlorierung entstehen, erhöht bei lang andauernder Aufnahme durch die Haut, durch Ingestion oder durch Inhalation das Risiko der Blasenkrebsentstehung (Villanueva et al., 2007).

Darüber hinaus ist eine chronische Arsenexposition, die die Inzidenzrate auf das 10- bis 20-fache erhöhen kann, als Risikofaktor bekannt (Bates et al., 1992). Gesichert ist auch die Kanzerogenität für das alkylierende Chemotherapeutikum Cyclophosphamid bzw. für dessen Metabolit Akrolein. Etwa 5% der so behandelten Patienten entwickeln mit einer Latenz von sieben bis acht Jahren ein Karzinom. Teilweise gelingt die Antagonisierung sowohl der Krebsinduktion als auch der häufig begleitend auftretenden hämorrhagischen Zystitis durch Verabreichung von Mercaptoethansulfonat (Schmähl et al., 1982). Ebenfalls aus dem arzneimittel-therapeutischen Bereich stammt das 1986 in Deutschland vom Markt genommene Schmerzmittel Phenazetin, das bei chronischer Einnahme bei ca. 10% der Patienten ein Harnblasenkarzinom verursachte (McCredie et al., 1983).

Wahrscheinlich, bisher jedoch nur im Tierexperiment sicher nachgewiesen, ist die krebsverursachende Wirkung von Nitrosaminen. Als Ursache wird dieses auch im Zusammenhang mit erhöhtem Risiko bei chronischen Harnwegsinfekten diskutiert, da Bakterienstämme wie *Escherichia coli* die Nitrosierung von Urinnitrat zu Nitrit katalysieren, die wiederum mit sekundären Aminen des Urins zu Nitrosaminen reagieren können. Ähnliche Überlegungen gibt es auch bei der Bilharziose (Häufung von Plattenepithelkarzinomen), da entsprechende Stoffe bei den Schistosomainfektionen ebenfalls im Urin nachgewiesen werden konnten (Calmels et al., 1985; Mostafa et al., 1994).

Strahlentherapie, besonders die Bestrahlung von Zervixkarzinomen, birgt ein erhebliches Risiko für Blasenkrebs. Allerdings hat es in diesem Bereich einige Weiterentwicklungen gegeben, so dass man zu den moderneren Verfahren noch keine genauen Aussagen machen kann (Arai et al., 1991).

Bei Nierentransplantierten und bei Patienten mit Balkan-Nephropathie ist das Risiko aus bisher nicht geklärter Ursache stark erhöht (Kälble et al., 1988; Huff, 1991).

Die Vermutung, dass auch die Süßstoffe Zyklamat und Saccharin sowie Kaffeekonsum Risikofaktoren für die Harnblasenkrebsentstehung darstellen, konnte mehreren Studien zufolge nicht bestätigt werden (Armstrong, 1985; Viscoli et al., 1993).

1.3. Etablierte Prognosefaktoren

Bei der Diagnosestellung Harnblasenkrebs werden heute obligat die Angaben über den histologischen Malignitätsgrad (Grading), das Tumorstadium (pT-Status) und die Metastasierung (Lymphknotenmetastasen: pN-Status; Fernmetastasen M-Status) mit erhoben. Nähere Erläuterungen folgen unter 1.3.1. bis 1.3.3. Die genannten Parameter sind in zweierlei Hinsicht von Bedeutung: Einerseits sind es derzeit die wesentlichen Kriterien, an denen prognostische Einschätzungen abgegeben werden, andererseits richtet sich hiernach die jeweilige Therapie. Nach aktuellen Richtlinien sind für die einzelnen Tumorstadien und Malignitätsgrade folgende therapeutische Maßnahmen indiziert (modifiziert nach Sökeland et al., 2004):

- Ta, G1: Transurethrale Resektion (TUR)
- Ta, G2-3 bzw. Ta, G1-Rezidiv bzw. Carcinoma in situ (Cis) bzw. T1, G1-2: TUR und intravesikale Chemo- oder Immuntherapie

- T1, G3 bzw. T1, G2-3-Rezidiv bzw. Cis-Rezidiv bzw. T2-4/M0: radikale Zystektomie mit Lymphadenektomie (Radiotherapie und Radiochemotherapie bei Inoperabilität sind in Erprobung)
- M1: systemische Chemotherapie
- Inoperables Rezidiv oder Metastasierung: palliative Chemotherapie, evtl. kombiniert mit Radiotherapie

Neben den beschriebenen und in der Praxis verwendeten Prognosefaktoren gibt es noch einige weitere, allgemein anerkannte prognostische Parameter:

- Multizentrität (siehe Kapitel 3.1.5.), das heißt das multiple Auftreten von Harnblasentumoren
- Ploidiegrad, das heißt der durchflusszytometrisch ermittelte DNA-Gehalt pro Tumorzelle (Tachibana et al., 1991)

In dieser Arbeit wurde der Ploidiegrad nicht weiter untersucht, da sie nur auf die Untersuchung immunhistochemischer Parameter abzielte.

1.3.1. Tumorstadium (pT-Status)

Die gebräuchliche Einteilung der Tumorstadien richtet sich nach der Definition der „Union International contre le Cancer“ (UICC), dargestellt in folgender Tabelle 1.

Tabelle 1: Tumorstadien des Harnblasenkarzinoms (nach Hermanek et al., 1997)

Tumorstadium		Definition
pTis		Carcinoma in situ (nicht infiltrierender, epithelialer Tumor)
pTa		nicht-invasiver papillärer Tumor
pT1		Tumor infiltriert subepitheliales Bindegewebe/Submukosa
pT2	pT2a	Tumor infiltriert die innere Hälfte der Muscularis propria
	pT2b	Tumor infiltriert äußere Hälfte der Muscularis propria
pT3	pT3a	Tumor infiltriert perivesikales Fettgewebe mikroskopisch
	pT3b	Tumor infiltriert perivesikales Fettgewebe makroskopisch
pT4	pT4a	Tumor infiltriert Prostata, Vagina oder Uterus
	pT4b	Tumor infiltriert Becken- oder Bauchwand

Diese Stadieneinteilung ist von erheblicher prognostischer Relevanz, da die jeweiligen Stadien mit unterschiedlichen Krankheitsverläufen assoziiert sind und, wie oben geschildert, auch unterschiedliche Therapieformen erfordern.

Hinsichtlich des Tumorstadiums pT1 hat es Versuche gegeben, eine weitere Unterteilung vorzunehmen. So schlugen beispielsweise Cheng et al. (1999) eine Subklassifikation in Abhängigkeit von der am histologischen Schnittpräparat messbaren Infiltrationstiefe der Tumorzellen vor (≤ 1 mm: pT1a; 1-4 mm: pT1b; >4 mm: pT1c). In der vorliegenden Arbeit wurde diese Subklassifikation (Cheng et al., 1999) mitberücksichtigt, um ihre prognostische Relevanz zu erproben.

Bisherige Beobachtungen zeigten, dass bei den muskelinvasiven Harnblasenkarzinomen insbesondere die Unterscheidung zwischen den Stadien pT2 und pT ≥ 3 prognostisch wichtig ist: Die 5-JÜR der Patienten mit pT2 Tumoren beträgt durchschnittlich 63-83%, die der Patienten mit höherem Tumorstadium nur noch 15 bis 57% (Montie et al., 1984; Skinner und Lieskovsky, 1984; Pagano et al., 1991).

1.3.2. Lymphknotenstatus (pN-Status)

Die Metastasierung in regionale Lymphknoten (Lymphknotenstatus, pN-Status) wird im Allgemeinen gemäß den UICC-Richtlinien (Hermanek et al., 1997) eingeteilt. Demnach entspricht eine solitäre, maximal 2 cm große Lymphknotenmetastase dem Stadium pN1, solitäre oder multiple, maximal 5 cm große Lymphknotenmetastasen entsprechen dem Stadium pN2, und Lymphknotenmetastasen, die mehr als 5 cm groß sind, entsprechen dem Stadium pN3.

Der Lymphknotenstatus hat erheblichen Einfluss auf die Prognose: Patienten mit muskelinvasiven pT2-Tumoren, bei denen nach radikaler Zystektomie Lymphknotenmetastasen nachgewiesen wurden, haben eine durchschnittliche 5-JÜR von 5%, Patienten ohne Metastasen dagegen eine 5-JÜR von etwa 60% (Pagano et al., 1991). Hämatogene Fernmetastasen verschlechtern die Prognose noch einmal erheblich. Sie siedeln sich am häufigsten in Leber, Lunge und Knochenmark an.

1.3.3. Histologischer Malignitätsgrad (Grading)

Morphologische Kriterien zur Beurteilung des histologischen Malignitätsgrads sind der bei Entartung zunehmend auftretende Verlust der ursprünglichen Zellreihenstruktur, der Verlust der Umbrellazellen, das Vorkommen von Kernatypien und vermehrter mitotischer Aktivität sowie das invasive Wachstum in Nachbarstrukturen.

Urothelkarzinome der Harnblase wurden über mehrere Jahrzehnte hinweg nach der im Jahre 1973 publizierten Klassifikation der World Health Organization (WHO; Mostofi et al., 1973) in drei Malignitätsgrade (G1, G2 und G3) eingeteilt. In den letzten Jahren hat sich dagegen ein zweigleisiges Gradingssystem durchgesetzt, das 1998 von der WHO in Zusammenarbeit mit der „International Society of Urological Pathologists“ (ISUP) erstellt wurde (Epstein et al., 1998). Dieses System teilt Harnblasenkarzinome in „low grade“- und „high grade“-Karzinome ein. Darüber hinaus wurde in dieser Klassifikation für hochdifferenzierte papilläre Tumore mit allenfalls niedrigem biologischen Malignitätspotenzial, welche früher als „pTa, G1“-Karzinome bezeichnet worden waren, der Terminus „papilläre urotheliale Neoplasie mit niedrigem (*low*) Malignitäts-Potenzial“ (PUNLMP) eingeführt. In der Literatur wurde die Meinung geäußert, dass PUNLMP-Tumoren im Wesentlichen den G1-Karzinomen, die „low grade“-Karzinome im Wesentlichen den G2-Karzinomen und die „high grade“-Karzinome im Wesentlichen den G3-Karzinomen der herkömmlichen Klassifikation von 1973 entsprechen (Oyasu, 2000).

In einer 1999 von der WHO herausgegebenen, erweiterten Klassifikation wurde vorgeschlagen, die „high grade“-Karzinome weiter in HG-2 und HG-3 Tumore zu unterteilen. In der letzten WHO-Veröffentlichung zu diesem Thema aus dem Jahre 2004 (Lopez-Beltran et al., 2004b) wird jedoch wieder nur noch eine zweigleisige Unterteilung in „low-grade“- und „high-grade“-Karzinome in Anlehnung an das 1998 eingeführte WHO/ISUP-System empfohlen. Dieses zweigleisige Gradingssystem wurde auch in der vorliegenden Arbeit angewendet. Allerdings nehmen viele Autoren noch Bezug auf die ältere Einteilung, so dass - um eine Vergleichbarkeit verschiedener Studien herstellen zu können - häufig auf die von Oyasu (2000) postulierte Kongruenz der Klassifikationssysteme von 1973 und 1998 zurückgegriffen werden muss.

In prognostischer Hinsicht ist dieses Gradingssystem insbesondere bei niedrigen Tumorstadien von hoher Relevanz: Für das Tumorstadium pTa und auch für das in dieser Arbeit untersuchte Tumorstadium pT1 werden Rezidivraten von 25-35% bei G1-, 48-72% bei G2- und 73% bei G3-Tumoren angegeben. Hinsichtlich des Progressionsverhaltens zeigen bei „oberflächlichen“ Harnblasenkarzinomen 0-5% der G1-, 7-14% der G2 und 23-34% der G3-Tumoren eine Progression in ein muskelinvasives Stadium. Bei muskelinvasiven Urothelkarzinomen (Stadium $pT \geq 2$) konnte für das Grading dagegen keine signifikante prognostische Relevanz nachgewiesen werden (Holmäng et al., 1995; Jimenez et al., 2000a; Witjes et al., 2000; Holmäng et al., 2001). Auch in der aktuellen WHO-Publikation von 2004 wurde die prognostische Bedeutung des Gradings für muskelinvasive Tumoren als „fraglich“ bezeichnet (Lopez-Beltran et al., 2004b).

1.4. Genetische Veränderungen

Genetische Veränderungen treten bei Urothelkarzinomen der Harnblase in großer Anzahl und Mannigfaltigkeit auf. Sie werden seit mehreren Jahren intensiv erforscht und sind häufig noch nicht im Detail verstanden. Es ist allerdings bekannt, dass die Entstehung von Urothelkarzinomen in einem hohen Prozentsatz mit spezifischen genetischen Alterationen assoziiert ist.

So liegt beispielsweise beim urothelialen Carcinoma in situ (CIS) häufig eine Mutation des Tumorsuppressorgens p53, das auf Chromosom 17p lokalisiert ist, vor. Für das nicht-invasive papilläre Karzinom (pTa, G1) ist ein Verlust eines auf Chromosom 9p lokalisierten Tumorsuppressorgens (p16, auch INK4a genannt) typisch. Bei der Progression des Gradings zu einem G3-Tumor, die bei etwa 16-20% der Tumoren beobachtet wird, kommt häufig noch ein Defekt auf den Chromosomen 8p und 11p hinzu (Prout et al., 1992).

Bei der Umwandlung von einem pTa-Tumor in ein minimal-invasives Karzinom (pT1) werden in der Regel noch weitere Alterationen beobachtet: Betroffen sind insbesondere das auf Chromosom 13q lokalisierte Retinoblastoma-Tumorsuppressorgen (Rb) sowie das auf Chromosom 18q lokalisierte DCC-Gen (*deleted in colorectal cancer*). Etwa 7-11 % der pTa-Tumoren und 20-30 % der pT1-Tumoren erfahren eine weitere Progression in ein muskelinvasives Karzinom (pT \geq 2) (Chen et al., 1996; Holmäng et al., 1995; Sauter und Mihatsch, 1998). Im Zuge dieser Tumorprogression treten als typische Veränderungen noch Mutationen von anderen Protoonkogenen bzw. Onkogenen auf. Einige dieser Mutationen führen zu einer vermehrten Expression von Wachstumsfaktoren (z.B. bFGF oder EGF), Wachstumsfaktorrezeptoren (z.B. HER2) oder G-Proteinen (ras) (Riede et al. 1999/2001; Lee und Droller, 2000; Knowles, 1995; Mitra et al. 2006).

Viele molekulargenetische Studien an Harnblasenkarzinomen haben die Zielsetzung, molekularpathologische Parameter zu identifizieren, mit denen sich das biologische Verhalten der Tumoren besser vorhersagen lässt. Solche Parameter könnten auch einer Optimierung der individuellen Therapie dienen. Auch der vorliegenden Arbeit liegt ein derartiger Ansatz zugrunde.

1.5. Immunhistologie

1.5.1. Ki-67 Antigen

Das Ki-67 Antigen ist einer der am weitesten verbreiteten Marker und gibt vor allem Aufschluss über die Proliferationsaktivität von Zellen. Das pKi-67 Gen befindet sich auf dem langen Arm des Chromosom 10 (10q25qter) (Fonatsch et al., 1991) und kodiert für zwei Isoformen, die beide das FKEL-Epitop als Bindungsstelle für die bei den immunhistochemischen Färbungen verwendeten Antikörper (z.B. MIB-1) besitzen. Das Ki-67 Antigen ist mit 320 bis 359 kDa ein relativ großes Protein und ist in den Nuklei aller proliferierenden Zellen nachweisbar. Im Laufe des Zellzyklus nimmt die Konzentration von der G1- über die S- und G2-Phase stark zu und fällt zum Ende der Mitose schnell ab. Die Funktion dieses Antigens besteht in der Regulation des Zellzyklus. Es wurden zahlreiche Interaktionen mit anderen Proteinen des Zyklus, der Signaltransduktion sowie Ribosomen und DNA-Helikasen nachgewiesen (Schmidt et al., 2003). In der G0-Phase lässt sich das Ki-67 Antigen nicht nachweisen (Gerdes et al., 1984). Da es zudem noch eine relativ kurze Halbwertszeit von etwa 90 Minuten besitzt, wird es nur von aktuell wachsenden Zellen exprimiert (Heidebrecht et al., 1996).

Aufgrund der genannten Eigenschaften ist das Ki-67 Antigen ein weit verbreitetes immunhistochemisches Zielprotein, um die Wachstumsfraktion einer Gewebeprobe zu ermitteln. Darüber hinaus gilt der Ki-67 Index bei nicht-invasiven Harnblasenkarzinomen als einer der besten unabhängigen, prognostischen Marker hinsichtlich der Beurteilung von Rezidivverhalten und Überleben (Korkolopoulou et al., 1997; Liukkonen et al., 1999; Oosterhuis et al., 2000; Wu et al., 2000; Sgambato et al., 2002).

1.5.2. Topoisomerase 2 α (Top-2 α)

Das 170 kDa große Top-2 α -Protein wird von einem Gen (Top-2 α -Gen) kodiert, das sich auf dem langen Arm des Chromosom 17 (17q21-q22) befindet. Top-2 α ist ein nukleäres Enzym, das bei der Transkription, der Umschreibung von DNA in RNA, eine Rolle spielt. Im Zusammenhang mit der DNA-Replikation, die jeder Zellteilung vorausgeht, katalysiert es die Entwindung der beiden DNA-Stränge. Darüber hinaus spielt es eine Rolle bei der mitotischen Chromosomenkondensation und Chromatidseparation.

Bei der zytostatischen Therapie verschiedener maligner Tumoren stellt das Top-2 α -Gen den Angriffspunkt einiger Chemotherapeutika dar. Ein Versagen der Chemotherapie wird häufig

mit Mutationen in diesem Genabschnitt erklärt. Beim Mammakarzinom wurde herausgefunden, dass das Top-2 α -Gen und das in unmittelbarer Nachbarschaft auf demselben Chromosomarm gelegene HER2-Gen häufig eine Koamplifikation aufweisen (Järvinen et al., 2000).

1.5.3. p53

p53 ist ein 53 kDa großes Kernprotein, das von dem Tumorsuppressorgen p53 auf dem kurzen Arm des Chromosoms 17 (17p13.1) kodiert wird. Das Protein wird bei DNA-Schädigung exprimiert und dient als Transkriptionsfaktor, als „Schlüsselenzym“, in einer Genaktivierungskaskade, die letztendlich zu einem Proliferationsstopp in der G1-Phase des Zellzyklus mit nachfolgender DNA-Reparatur führt. Bei irreparablen DNA-Schäden wird die Apoptose eingeleitet.

Aufgrund seiner kurzen Halbwertszeit von 5 bis maximal 45 Minuten lässt sich p53 in gesundem Gewebe kaum nachweisen. Ist es hingegen mutiert (meistens Punktmutation innerhalb der Exone 5 bis 8 des Genlokus 17p13.1), so verlängert sich die Halbwertszeit, und es ist im Tumorgewebe immunhistochemisch nachweisbar (Friedrich et al., 2001). Mutationen des p53-Tumorsuppressorgens kommen bei ca. 50% aller malignen menschlichen Krebserkrankungen vor (Poremba et al., 1996).

Die Assoziation zwischen einer erhöhten immunhistochemischen p53-Expression und dem klinischen Verlauf von Urothelkarzinomen ist umstritten. Der prognostische Stellenwert von p53 beim Harnblasenkrebs ist derzeit Gegenstand der Forschung (Stein et al., 1998; Grossmann und Dinney, 2000; Schmitz-Dräger et al., 2000a und 2000b).

1.5.4. p16

Das p16-Tumorsuppressorprotein ist ein 16 kDa großes Protein, dessen kodierendes Gen sich auf dem kurzen Arm des Chromosom 9 befindet (9p21). Dieses Gen wird synonym auch als MTS-1-, CDKN2- oder INK4a-Gen bezeichnet. P16 beeinflusst die Tumorentstehung negativ, indem es regulierende und kontrollierende Funktion während des Zellzyklus durch Hemmung der zyklinabhängigen Kinasen 2A, 4 und 6 ausübt. Weiterhin wirkt es stabilisierend auf das p53-Protein. Der Verlust der p16-Expression wird meistens durch Deletion oder Methylierung des Gens verursacht (Orlow et al., 1999) und begünstigt bei verschiedenen Krebsarten die Tumorentstehung schon in einer frühen Phase des Zellzyklus (Rocco et al., 2001; Williamson et al., 1995; Reznikoff et al., 2000).

Auch beim Harnblasenkarzinom ist eine bedeutende kanzerogenetische Rolle von p16 belegt. Eine differenzierte Betrachtung hinsichtlich der prognostischen Relevanz von p16 liegt bisher nur in geringerem Umfang vor (Hitchings et al., 2004; Shariat et al., 2004).

1.5.5. E-Cadherin

E-Cadherin, auch als CDH1 bezeichnet, ist ein kalziumabhängiges, zelluläres Adhäsionsmolekül, das von einem Gen auf dem langen Arm des Chromosoms 16 (16q22.1) kodiert wird. E-Cadherin gehört als epitheliales Protein zu der Familie der Cadherine, einer Gruppe von Transmembran-Glykoproteinen, die entscheidend für die Stabilität und den Zusammenhalt von Zellverbänden sind (Takeichi, 1991).

Bisherige Untersuchungen zeigten, dass E-Cadherin in Tumorzellen häufig verändert oder vermindert vorkommt, so dass man dem Protein eine tumorsupprimierende Funktion zuschreibt (Frixen et al., 1991). Beim Harnblasenkrebs ist die Rolle von E-Cadherin als prognostischer Marker umstritten. Diese Frage ist unter anderem Gegenstand dieser Arbeit.

1.5.6. Clusterin

Clusterin, ein von einem auf Chromosom 3 lokalisierten Gen kodiertes Protein, wird synonym auch als Apolipoprotein J, Complement lysis inhibitor, Glycoprotein 2, Sulfated GlykoProtein-2 (SGP-2), SP 40-40, gp80, Testosterone-Repressed Prostate Message 2 (TRPM2) oder T54 bezeichnet. Es hat eine Größe von 80 kDa und beeinflusst, wie die Synonyme bereits andeuten, vielfältige Funktionen: Lipidtransport, Regulation der Komplementkaskade, Spermienreifung, Immunregulationen, Apoptose, Recycling von Membranbestandteilen, Zelladhäsion, epitheliale Zelldifferenzierung, Transformation und Tumorentstehung (Jenne et al., 1992; Jordan-Stark et al., 1992; Fritz et al., 1993; May PC, 1993; Witte et al., 1994; Calvo et al., 1998; Correa-Rotter et al., 1998; Wunsche et al., 1998; O'Sullivan et al., 2003). An Prostatakarzinomzellen wurden bereits anti-apoptotische Eigenschaften des Clusterins nachgewiesen, die den Tumorzellen einen gewissen Überlebensvorteil zu verleihen scheinen (Sensibar et al., 1995; Wu et al., 2002).

Eine Studie beschreibt bei Urothelkarzinompatienten eine mittels ELISA gemessene erhöhte Clusterinkonzentration im Serum und Urin, was zukünftig möglicherweise als Tumormarker hinzugezogen werden könnte (Stejskal et al., 2006).

Bezüglich des Harnblasenkarzinoms hat man auch herausgefunden, dass die Clusterin-Expression bei einer Chemotherapie mit Cisplatin stark ansteigt. Darüber hinaus wurde eine Korrelation zwischen der Clusterin-Expression und dem Tumorstadium sowie dem Malignitätsgrad beschrieben (Miyake et al., 2001; Miyake et al., 2002). Inwieweit Clusterin bei dieser Erkrankung eine prognostische Aussagekraft besitzt, wurde bisher noch nicht untersucht.

1.5.7. HER2

Das HER2-Protein wird von dem *c-erb-B2*-Gen, einem auf Chromosom 17q lokalisierten Protoonkogen, kodiert. Als Wachstumsfaktorrezeptor aus der Familie der EGF (epidermal-growth-factor)-Rezeptoren ist das HER2-Protein an der äußeren Zellmembran lokalisiert. Die Aktivierung des Protoonkogens, zum Beispiel durch Genamplifikation, bewirkt eine vermehrte Synthese des Onkoproteins, was wiederum durch eine autokrine Stimulation zur Dauerproliferation der Zellen führt.

Das HER2-Protein ist insbesondere bei Mammakarzinomen eingehend untersucht worden. Bei dieser Erkrankung wird heutzutage der an das Rezeptorprotein bindende, monoklonale Antikörper Trastuzumab (Herceptin®) mit Erfolg therapeutisch eingesetzt.

Die Datenlage zur HER2-Expression bei Harnblasentumoren ist relativ umfangreich, aber sehr uneinheitlich (Zhau et al., 1990; Moriyama et al., 1991; Wood et al., 1991; Wright et al., 1991; Lipponen et al., 1991; Sato et al., 1992; Coombs et al., 1993; Fossa et al., 1993; Sauter et al., 1993; Gorgoulis et al., 1995; Underwood et al., 1995; Mellon et al., 1996; Ravery et al., 1997; Korkolopoulou et al., 1997; Vollmer et al., 1998; Ioachim et al., 2000; Jiminez et al., 2001; Krüger et al. 2002; Krüger et al., 2005). Es gibt Hinweise darauf, dass eine HER2-Überexpression mit einem ungünstigen klinischen Verlauf im Zusammenhang steht. Weiterhin ist bekannt, dass die HER2-Überexpression bei Harnblasenkarzinomen als Fehlsteuerung in der Tumorgenese häufiger vorkommt als die HER2-Genamplifikation (Underwood et al., 1995).

1.5.8. MDR

Das „multi-drug resistance“-Protein (MDR1-Protein), wird von einem Gen kodiert, das sich auf dem langen Arm des Chromosom 7 (7q21.1) befindet. Es handelt sich um ein 170kD schweres Membranprotein, das so genannte P(Permeabilität)-Glykoprotein P170. Dieses hat die Funktion eines ATP-abhängigen Chloridkanals. P170 gehört zu einer Superfamilie

von mehr als 50 verschiedenen unidirektionalen Transportproteinen, der so genannten „ATP-binding cassette“. Es kommt auch physiologisch in gesundem Gewebe vor, besonders in Zellen mit sekretorischer und exkretorischer Funktion (z.B. den proximalen Tubuluszellen der Niere, Leber, Nebennierenrinden-, Darm-, Gallengangs- und Pankreasepithelien). Weiterhin findet man es gehäuft bei einigen Leukozyten und bei Zellen mit Blut-Gewebs-Schrankenfunktion, wie z.B. bei Endothelzellen des Hodens. P170 übt dabei vermutlich eine Schutzfunktion auf das Gewebe aus, das in besonderem Maße endogenen toxischen Substanzen, potenziellen Mutagenen und Zellabfallsprodukten ausgesetzt ist, indem es die entsprechenden Substanzen wieder aus der Zelle befördert (van der Valk et al., 1990; Sugawara, 1990). Der assoziierte Chloridkanal hat vermutlich nur Zellvolumen regulierende Funktion (Hardy et al., 1995).

Eine erhöhte P170-Expression, die bei verschiedenen Tumorarten in unterschiedlichem Ausmaß beobachtet wird, führt zu dem „Multidrug-Resistance-Phänotyp“. Die Auswärtspumpe befördert eine Vielzahl von therapeutisch eingesetzten Chemotherapeutika (u.a. Anthrazykline, Aktinomycin D, Epipodophyllotoxine, Taxane, Colchizin), die als gemeinsames Charakteristikum einen planar Benzolring aufweisen, wieder aus der Tumorzelle hinaus und bewirkt so eine Chemoresistenz (Gottesman und Pastan, 1993). *In-vitro*-Versuche haben gezeigt, dass das Schleifendiuretikum Furosemid das MDR-Phänomen bei Blasenkarzinomzellen umkehren kann und möglicherweise die Sensibilität für das Chemotherapeutikum Epirubicin steigert (Speers et al., 2006).

In der vorliegenden Arbeit wurden nur die muskelinvasiven Harnblasentumoren hinsichtlich ihrer MDR-Expression untersucht, da – im Gegensatz zu den minimal-invasiven Tumoren des Stadiums pT1 – vor allem in dieser Gruppe die Frage einer potenziellen Chemoresistenz eine Relevanz besitzt.

1.6. Fragestellung

Beobachtungen der letzten Jahrzehnte in der Entwicklung von Harnblasentumoren haben gezeigt, dass die drei bislang etablierten prognostischen Parameter Tumorstadium, Lymphknotenstatus und Grading in vielen Fällen nicht ausreichend sind, um den genauen Krankheitsverlauf vorherzusagen (Stein et al., 1998). Eine sichere Einschätzung des biologischen Verhaltens der Tumoren ist jedoch eine entscheidende Voraussetzung für eine optimale Therapie. Daher besteht klinischerseits nach wie vor ein sehr großes Interesse an der Weiterentwicklung prognostischer Faktoren des Harnblasenkrebses.

Durch die mittlerweile fortgeschrittene Erforschung der Tumorentstehung im molekularbiologischen Bereich hat sich eine große Anzahl von neuen Parametern aufgetan, die mit relativ einfachen immunhistochemischen Methoden dargestellt werden können. Einige dieser Parameter gelten als viel versprechende Kandidaten für neue Prognosefaktoren.

In der vorliegenden Arbeit wurden einige dieser Kandidaten an einem großen Kollektiv minimal-invasiver (pT1) und muskelinvasiver (pT \geq 2) Urothelkarzinome hinsichtlich ihrer prognostischen Relevanz untersucht. Bei den pT1-Tumoren dienten als klinische Verlaufsgrößen das rezidivfreie und das progressionsfreie Überleben, bei den pT \geq 2-Tumoren das krankheitsbezogene Gesamtüberleben.

Zusammenfassend dient die vorliegende Arbeit der Beantwortung der nachstehenden Fragen:

A. Kann die prognostische Aussagekraft etablierter Prognosefaktoren (Tumorstadium, Lymphknotenstadium, Malignitätsgrad) am vorliegenden Kollektiv bestätigt werden? Welche prognostische Bedeutung besitzen andere „konventionelle“ Parameter wie T1-Substaging, Multizentrität, Alter und Geschlecht?

B. Welcher prognostische Stellenwert kommt der immunhistochemischen Ki-67-, Top-2 α -, p53-, p16-, E-Cadherin-, Clusterin-, HER2- und MDR-Expression im Logrank-Test und in der univariaten Cox-Regressionsanalyse zu?

C. Welcher dieser Parameter erlangt in der multivariaten Analyse eine unabhängige prognostische Bedeutung?

D. Ist die Multitissue-Array-Technik für eine immunhistochemische Studie wie die vorliegende geeignet?

2. Material und Methoden

2.1. Patientenkollektiv

Die vorliegende Arbeit wurde von der Ethik-Kommission der Universität zu Lübeck hinsichtlich ethischer, medizinisch-wissenschaftlicher und berufsrechtlicher Gesichtspunkte genehmigt (Titel des Ethikantrages: „Prognostische Bedeutung immunohistochemischer Parameter bei Harnblasenkarzinomen“; Aktenzeichen: 06-134; Datum der Genehmigung: 12.09.2006). Die Arbeit behandelt sowohl Patienten mit minimal-invasiven (pT1) als auch solche mit muskelinvasiven Harnblasenkarzinomen (pT \geq 2). Da zu diesen beiden Patientengruppen jeweils unterschiedliche Beobachtungsparameter (pT1-Tumoren: rezidiv- und progressionsfreies Überleben; pT \geq 2-Tumoren: krankheitsbezogenes Gesamtüberleben) vorliegen, werden diese beiden Gruppen im Folgenden getrennt besprochen.

2.1.1. Minimal-invasive Karzinome

Diese Arbeit untersucht Tumorgewebsproben von insgesamt 73 Patienten (60 Männer, 13 Frauen; Geschlechterverhältnis 4,6 : 1) mit papillären Harnblasenkarzinomen, die in der Urologischen Klinik der Universität zu Lübeck (Direktor: Prof. Dr. med. D. Jocham) im Zeitraum von 1987 bis 1999 erstmals diagnostiziert wurden. Das Patientenalter betrug zwischen 37 und 85 Jahren, der Altersmedian lag bei 68 Jahren. In 46 Fällen wurde ein multifokales Auftreten in Form von mehreren Tumorherden festgestellt.

Einschlusskriterien zur Aufnahme in das untersuchte Patientenkollektiv waren: (a) eine aus endoskopischer Sicht vollständige transurethrale Resektion (TUR) des Tumors, (b) der histologische Nachweis eines papillären Urothelkarzinoms (Stadium pT1), (c) regelmäßige Nachkontrollen inklusive Urinzytologie, Sonographie der Nieren, Harnblase und Restharnbestimmung, Zystoskopie sowie ggf. Urographie (Kontrollintervalle in den ersten beiden Jahren nach Erstdiagnose: alle 3 Monate; im dritten und vierten Jahr: mindestens alle 6 Monate; danach jährlich), (d) ein bekanntes Follow-up über einen Zeitraum von mindestens zwei Jahren, und (e) das Vorhandensein von mindestens einem Paraffinblock, auf dem eine ausreichende Menge (mindestens 0,5 cm²) von repräsentativem Tumorgewebe enthalten war.

Alle Patienten erhielten eine intravesikale *Bacillus Calmette-Guérin* (BCG)-Therapie, die 2-4 Wochen nach der Erstdiagnose begann und eine einmalige wöchentliche Applikationen von

$2-5 \times 10^8$ „colony forming units“ (CFU) über einen Zeitraum von sechs Wochen beinhaltete. Im Falle eines Tumorrezidivs erfolgte gemäß damaliger Therapierichtlinien eine erneute Tumoresektion mittels TUR, der sich ebenfalls eine erneute BCG-Therapie anschloss. Sowohl Tumorrezidive als auch eine Tumorprogression wurden in allen Fällen auf histologischem Wege gesichert.

Alle mit Hämatoxylin und Eosin (HE) gefärbten Originalschnittpräparate der Tumoren wurden vor Studienbeginn zunächst noch einmal hinsichtlich des richtigen Tumorstadiums (pT1) und hinsichtlich des histopathologischen Malignitätsgrades reevaluiert, wobei das Klassifikationssystem der World Health Organization / International Society of Urological Pathology (WHO / ISUP; Epstein et al., 1998) zugrunde gelegt wurde. Demnach wurde bei 33 Patienten ein niedriger Malignitätsgrad („low grade“) und bei 44 ein hoher Malignitätsgrad („high grade“) festgestellt.

Weiterhin wurde eine zusätzliche Subklassifikation des Tumorstadiums vorgenommen, wie sie von Cheng et al. (1999) vorgeschlagen wurde. Dabei wurden innerhalb des Stadiums pT1 die Substadien pT1a (bei einer Infiltrationstiefe von maximal 1,5 mm), pT1b (bei einer Infiltrationstiefe von mehr als 1,5, aber maximal 4,0 mm) und pT1c (bei einer Infiltrationstiefe von mehr als 4,0 mm) unterschieden. Die Messungen erfolgten unter Verwendung einer digitalen Mikroskopkamera und der zugehörigen Auswertungssoftware (Kamera: AxioCam HR; Software: Axiovision 4.0; jeweils von der Firma Carl Zeiss, Göttingen). Die Infiltrationstiefe wurde dabei jeweils in Bezug auf die Basalmembran des oberflächlichen neoplastischen oder nicht-neoplastischen Epithels gemessen. In den wenigen Fällen, bei denen in Nachbarschaft des invasiven Tumors keine Basalmembran als Bezugspunkt vorhanden war, wurde – gemäß den Empfehlungen von Cheng und Mitarbeitern (1999) – lediglich die kleinste Dimension des größten invasiven Tumorzellkomplexes als maximale Infiltrationstiefe angesehen.

2.1.2. Muskelinvasive Karzinome

Es wurden Tumorgewebsproben von 132 Patienten mit muskelinvasiven Urothelkarzinomen der Harnblase untersucht, die in dem Zeitraum zwischen 1989 und 2000 in der Urologischen Klinik der Universität zu Lübeck mittels radikaler Zystektomie behandelt wurden. Zusätzlich zu der bei allen Patienten erfolgten radikalen Zystektomie und regionären Lymphonodektomie wurde bei 30 Patienten (darunter alle von Lymphknotenmetastasen betroffenen Patienten) eine Chemotherapie nach dem MVAC-Schema (Methotrexat, Vinblastin, Doxorubicin und Cisplatin) durchgeführt.

Einschlusskriterien waren: (a) eine aus operativer Sicht vollständige Entfernung des Tumors (R0-Resektion), (b) der histologische Nachweis eines muskelinvasiven Urothelkarzinoms (Stadium $pT \geq 2$), (c) regelmäßige Nachkontrollen mit Thorax-Röntgenaufnahme, Blutuntersuchung (Kreatinin, Blutbild, Blutgasanalyse, Elektrolyte), Beckensonographie, Urogramm, evtl. Computertomographie des Beckens (Kontrollintervalle in den ersten beiden postoperativen Jahren: alle 3 Monate; im dritten und vierten Jahr: alle 6 Monate, danach: mindestens alle 12 Monate), (d) ein bekanntes Follow-up über einen Zeitraum von mindestens sechs Monaten, und (e) das Vorhandensein von mindestens einem Paraffinblock, auf dem eine ausreichende Menge (mindestens $0,5 \text{ cm}^2$) von repräsentativem Tumorgewebe enthalten war.

Unter den 132 Patienten befanden sich 103 Männer und 29 Frauen, entsprechend einem Geschlechterverhältnis von 3,6 : 1. Das mediane Patientenalter lag bei 64 Jahren (Spannweite 29 bis 78 Jahre). Bei der Mehrzahl der Erkrankten (54%, $n=71$) war der Tumor auf die Muscularis propria der Harnblase begrenzt, was dem Stadium $pT2$ gemäß der Klassifikation der International Union against Cancer (UICC) entsprach (Hermanek et al., 1997). Das Stadium $pT3$ (Tumorausbreitung in das perivesikale Fettgewebe) wurde in 36% ($n=48$) und das Stadium $pT4$ (Tumorinfiltration in angrenzende Organe) in 10% ($n=13$) der Fälle erhoben. Bei 26 Patienten (20%) lagen histologisch nachgewiesene Lymphknotenmetastasen vor. Hinsichtlich des Gradings, das gemäß der WHO-Klassifikation von 1973 (Mostofi et al., 1973) vorgenommen wurde, war lediglich in 6 Fällen (5%) ein niedrig-malignes („low grade“) und in den übrigen Fällen (95%) ein hoch-malignes („high grade“) Urothelkarzinom festzustellen.

2.2. Immunhistochemie

Die immunhistochemischen Färbungen erfolgten auf Multitissue Arrays (Biochips). Ein Biochip repräsentierte dabei einen Objektträger, auf dem maximal 96 $2 \times 2 \text{ mm}$ große Ausschnitte mit repräsentativem Tumorgewebe enthalten waren (vgl. Abb. 1). Mit Hilfe dieser Technik konnte bei einem einzigen Färbegang eine große Anzahl von Schnitten gleichzeitig immunhistochemisch gefärbt werden. Hergestellt wurden die Multitissue Arrays von der Firma Euroimmun Diagnostica (Groß Grönuau) nach einem patentierten Verfahren (Thorns et al., 2004). Die immunhistochemischen Färbungen wurden nach einer allgemein üblichen Immunperoxidase-Technik, der sogenannten ABC-Methode ((Strept)avidin-biotin-enzyme complex-Methode), durchgeführt (Hsu et al., 1981). Als Farbstoff diente jeweils 3,3'-Diaminobenzidin (DAB).



Abb. 1:

Ausschnitt aus einem Biochip®, auf dem die jeweils 2x2 mm großen Ausschnitte mit repräsentativem Tumorgewebe in Reihen auf dem Objektträger angeordnet sind

Zunächst erfolgte die Entparaffinierung der Biochips und der mitgeführten Kontrollen in Xylol (30 min.) bei Raumtemperatur. Anschließend wurden die Schnittpräparate in einer absteigenden Alkoholreihe (2x 100%, 1x 96%, 1x 70%) rehydriert und dann in TRIS-Puffer überführt. Danach erfolgte – abhängig vom verwendeten Antikörper (siehe Tabelle 2) – eine Antigendemaskierung mittels verschiedener Vorbehandlungen:

- Kochen im Dampfdrucktopf (DT; 15 min.) in 10 mM Zitronensäure (pH 6,1; 2 g/l)
- Erhitzen im Dampfgarer (DG; 45 min.) in Decloaker-Puffer oder EDTA-Decloaker-Puffer (pH 8,0); letzterer wurde nur bei dem Antikörper Clusterin verwendet
- Erhitzen in einem Mikrowellenofen (MW) bei 850 W (5 min.) und 2x bei 150 W (15 min.) in 10 mM Zitronensäure (pH 6,1; 2 g/l)

Tabelle 2:**Verwendete Antikörper und Färbedetails**

Antigen	Klon & Art	Hersteller	Verdünnung	Vorbehandlung	Kontrollgewebe
Ki-67	MIB-1, m-mk.	Dako	1:20	Dampfdrucktopf	Tonsille
Top-2 α	Ki-S1 m-mk.	Dako	1:200	Dampfgarer	Tonsille
p 53	pab1801, m-mk.	Novocastra	1:50	Dampfdrucktopf	Colon-Ca.
p16	E6H4, m-mk.	Biocarta	1:50	Dampfgarer	Zervix-Ca.
E-Cadherin	36B5, m-mk	Novocastra	1:10	Dampfgarer	Tonsille
Clusterin	7D1, m-mk.	Novocastra	1:50	Dampfgarer	Tonsille
HER2	A0485, r-pk.	Dako	1:200	Mikrowelle	Mamma-Ca.
MDR	C-19 g-pk.	Santa Cruz	1:20	Dampfgarer	Colon-Ca. mit bekannter MDR- Expression

Abkürzungen: Ca.: Karzinom; m-mk.: monoklonal (Maus); r-pk.: polyklonal (Kaninchen); g-pk.: polyklonal (Ziege); Hersteller: Dako, Glostrup, Dänemark; Novocastra, Newcastle upon Tyne, England; Biocarta, Hamburg; Santa Cruz, Santa Cruz, Kalifornien, USA.

Nach der Vorbehandlung erfolgte die eigentliche Färbung nach folgendem Protokoll:

- Spülen der Objektträger in TRIS-Puffer
- Auftragen des unkonjugierten Primärantikörpers, der an das entsprechende Antigen direkt bindet, in jeweiliger Verdünnung (verdünnt mit ChemMate® Antibody Diluent) und Inkubation in einer feuchten Kammer für 30 min. bei Raumtemperatur (RT); anschließend spülen in TRIS-Puffer
- Auftragen des Sekundärantikörpers (biotinylierter rabbit-antimouse Antikörper), der gegen den Fc-Terminus des Primärantikörpers gerichtet ist; für monoklonale bzw. bei Verwendung von polyklonalen Primärantikörpern wurde biotinyliertes Immunglobulin (verdünnt 1:300 in TRIS-Puffer/ Humanserum (10:1); Dako,

Hamburg) verwendet und für 15 min. bei RT in der feuchten Kammer inkubiert; anschließend wieder spülen in TRIS-Puffer

- Blockung endogener Peroxidasen durch dreimaliges Auftragen von H₂O₂ für jeweils 5 min., anschließend spülen in TRIS-Puffer
- Auftragen eines Meerrettichperoxidase-konjugierten Streptavidin-Biotin-Komplexes, wodurch ein Komplex aus Streptavidin und Enzym-gekoppeltem Biotin am Sekundärantikörper entsteht; Inkubation für 15 min bei RT in der feuchten Kammer; anschließend spülen in TRIS-Puffer
- Auftragen des Farbstoffs Diaminobenzidin (DAB; 10 mg/ml; Dako Hamburg), der von Peroxidase gebunden in das Chromogen umgesetzt wird; Inkubation (10 min.) bei RT in der feuchten Kammer; anschließend Spülen in TRIS-Puffer
- Gegenfärben des übrigen Gewebes, das keinen Antikörper gebunden hat, mit Hämalaun nach Mayer (Merck, Darmstadt) für 5 min und nachfolgendes Bläuen in Leitungswasser für 5 min
- Abschließend Dehydrierung in der aufsteigenden Alkoholreihe (1 x 70%, 1x 96%, 2 x 100%), überführen in Xylol und manuelles Eindeckeln mit Aquatex® (Merck, Darmstadt).

Bei jedem Färbedurchgang wurden als Positivkontrolle Schnitte mit nachgewiesener hoher Antigenexpression mitgefärbt (Tabelle 2). Als Negativkontrollen dienten Präparate, bei denen der Erstantikörper durch ein unspezifisches Immunglobulin ersetzt worden war. Weiterhin wurden bei der HER2-Färbung ProbeCheck®-Kontrollschnitte, die im HercepTest® enthalten waren, mitgeführt.

Für die immunhistochemische Auswertung wurden pro Tumorgewebeprobe 200 Zellen hinsichtlich ihrer Anfärbung beurteilt. Innerhalb der Tumorchips wurden jeweils immer diejenigen Areale, in denen die Anfärbung am stärksten war, ausgewertet. In den wenigen Fällen, bei denen auf dem Tumorchip weniger als 200 Zellen enthalten waren, wurden entsprechend weniger Zellen ausgewertet. Je nach Lokalisation des Antigens wiesen die Tumorzellen eine hohe nukleäre (Ki67-Antigen, Top-2 α , p53), zytoplasmatische (Clusterin), membranständige (HER2, E-Cadherin) oder gleichmäßig nukleäre und zytoplasmatische Reaktivität (MDR, p16) auf. Beispiele für positive Färbungen mit den Antikörpern Top-2 α , p53, p16, E-Cadherin, Clusterin, HER2 und MDR sind in den nachstehenden Abbildungen 2 - 8 illustriert.

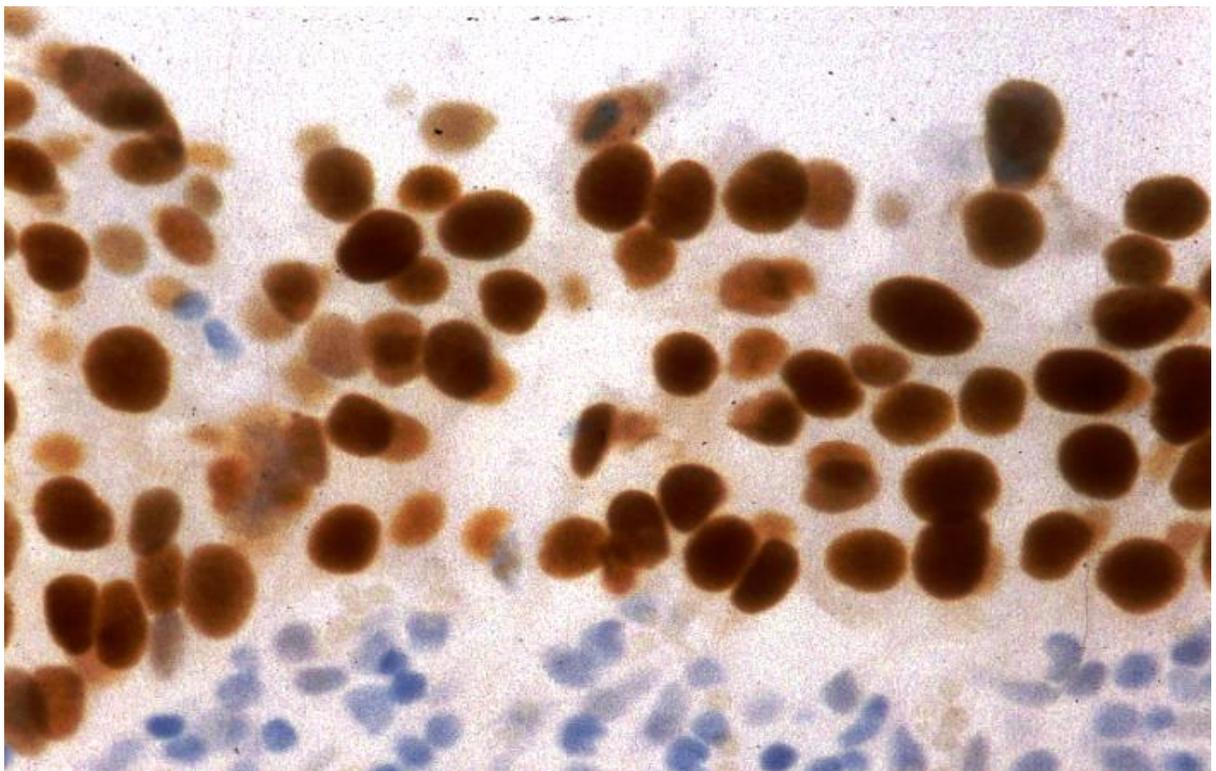
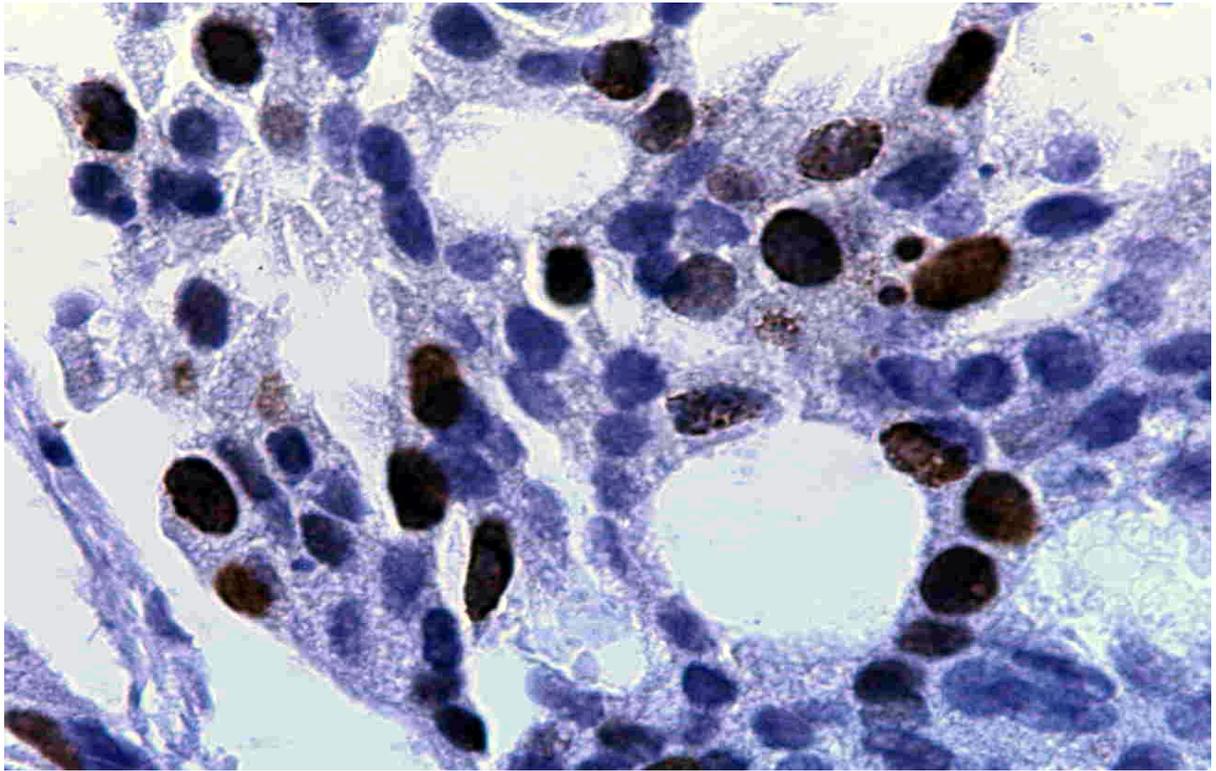


Abb. 2 (oben) und 3 (unten):

TOP-2 α - (oben) und p53-Expression (unten) in einem Harnblasenkarzinom. Beide Proteine werden rein nukleär exprimiert, erkenntlich an der braunen Kernfärbung (Originalvergrößerung: oben 400x, unten 1000x).

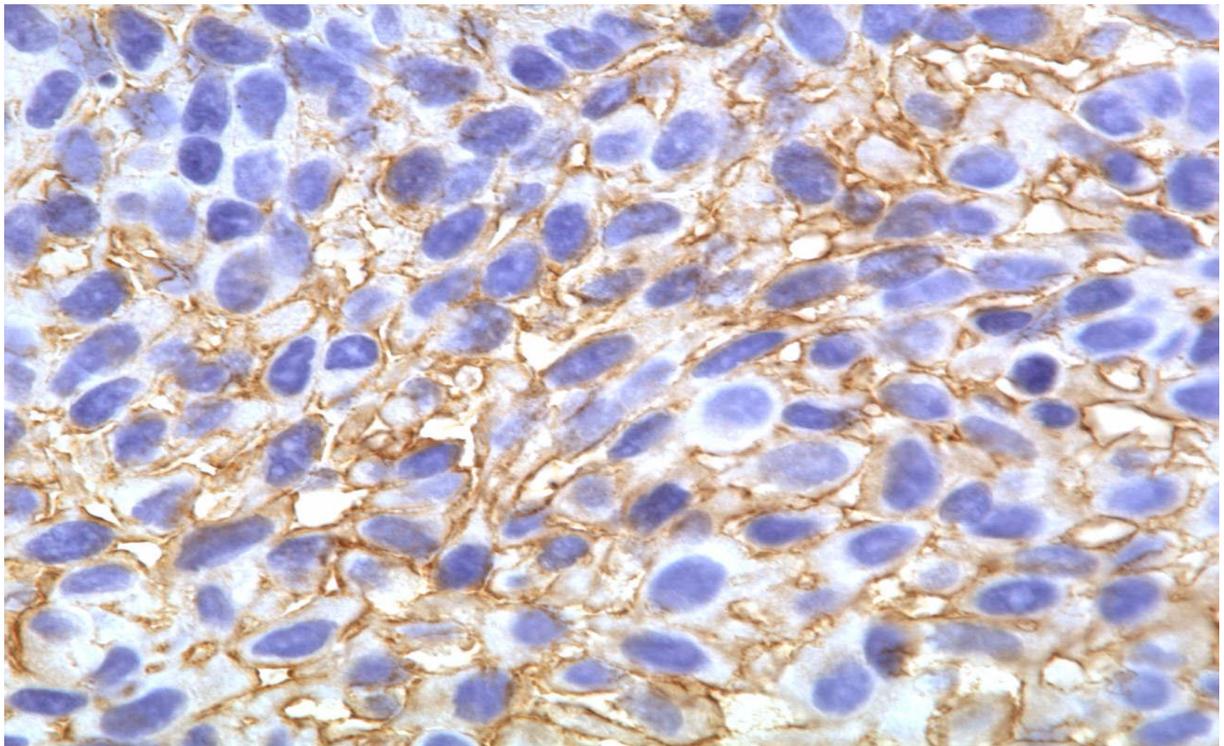
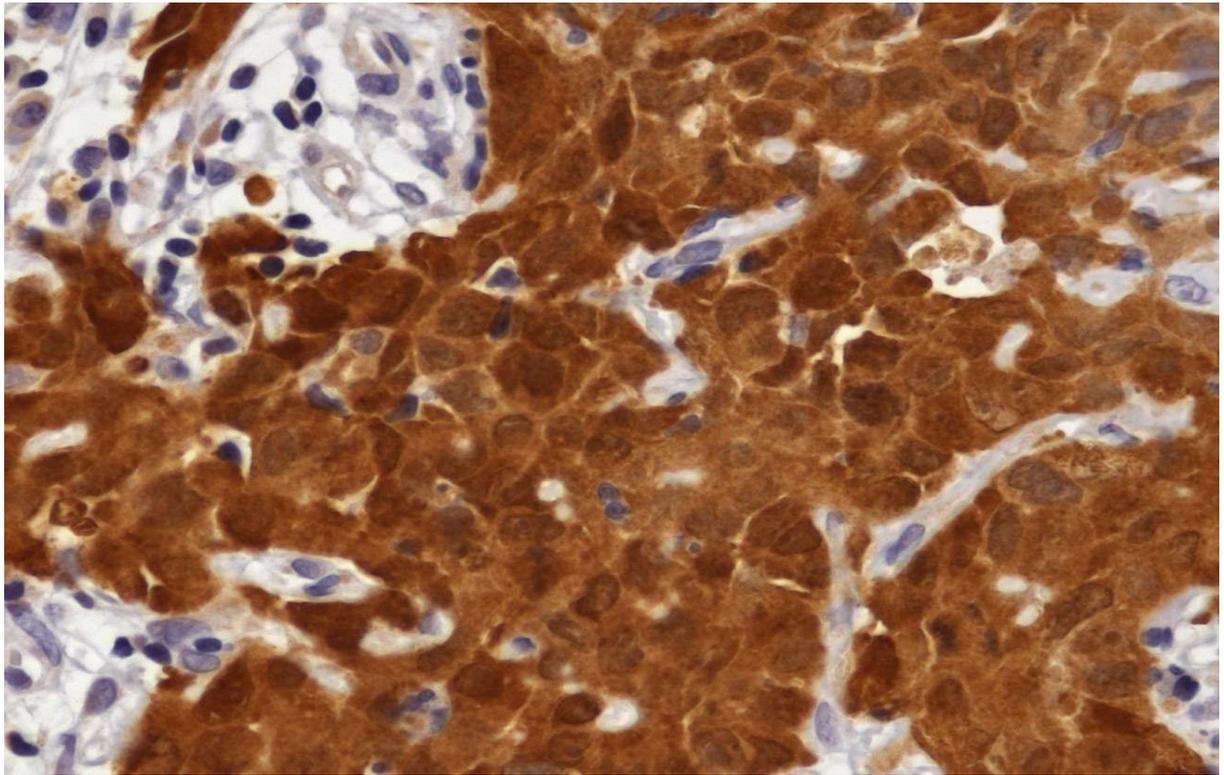


Abb. 4 (oben) und 5 (unten):

p16-Expression (oben) und E-Cadherin-Expression in einem Harnblasenkarzinom. Das p16-Protein wird sowohl zytoplasmatisch als auch nukleär exprimiert, während E-Cadherin ausschließlich membranständig exprimiert wird (Originalvergrößerung: oben 400x, unten 600x).

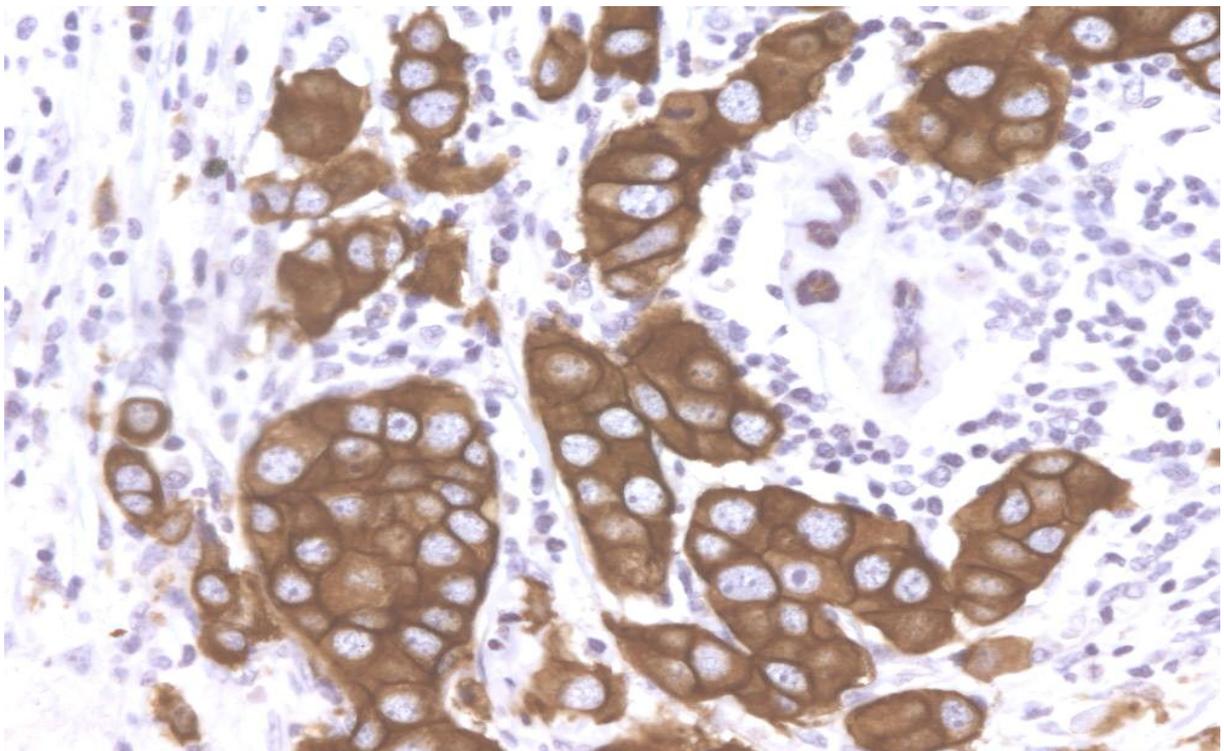
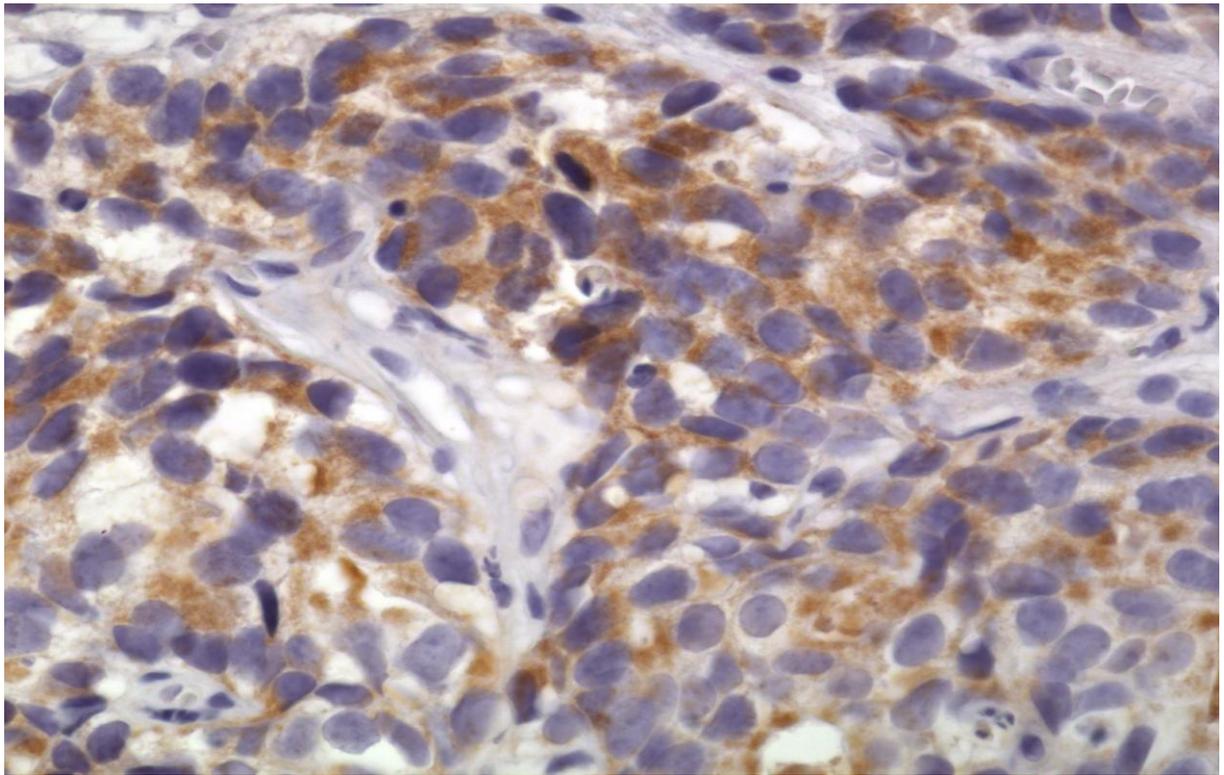


Abb. 6 (oben) und 7 (unten):

Clusterin-positives (oben) und HER2-überexprimierendes Harnblasenkarzinom (unten). Clusterin wird ausschließlich im Zytoplasma der Tumorzellen, HER2 vor allem im Bereich der Zellmembran exprimiert (Originalvergrößerung: jeweils 400x).

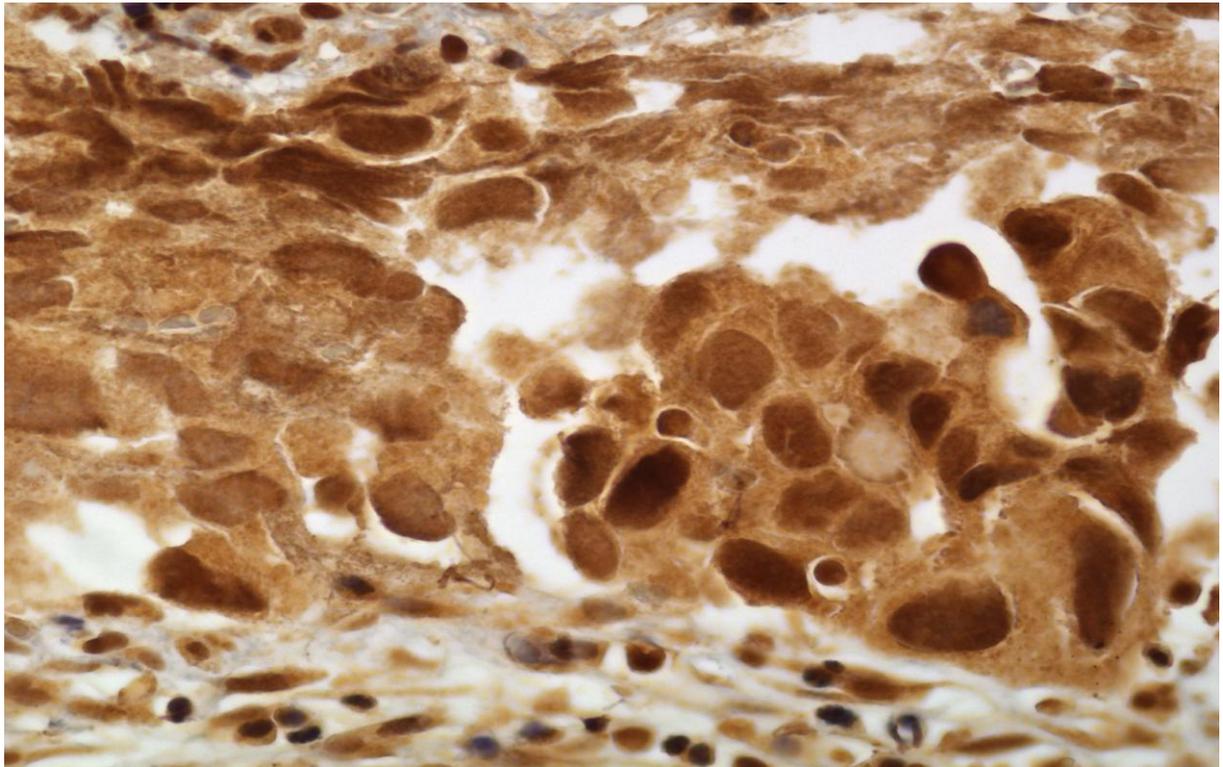


Abb. 8:

MDR-positives Harnblasenkarzinom. Das MDR-Protein wird sowohl zytoplasmatisch als auch nukleär exprimiert (Originalvergrößerung: 1000x).

Bei den Färbungen für p53, Ki-67 und Top-2 α erfolgte die Auswertung, indem innerhalb von 200 Tumorzellen der Anteil der positiv gefärbten Tumorzellen ermittelt wurde, wobei nur eine mittelgradige oder starke Anfärbung der Zellen, jedoch keine schwache Anfärbung als positiv bewertet wurde. Die so ermittelten Prozentsätze wurden als p53-, Ki-67- bzw. Top-2 α -Indizes angegeben. An der Schwelle des jeweiligen Medianwertes erfolgte die Einteilung in „Niedrigexprimierer“ (Index \leq Median) und „Hochexprimierer“ (Index $>$ Median). Bei den Färbungen für Clusterin und MDR wurden die Tumoren als „positiv“ gewertet, wenn mindestens 10% der Tumorzellen eine Positivität aufwiesen, bei der Auswertung der auf p16 getesteten Präparate wurde dagegen der Verlust der Expression als positiv gewertet, wenn mindestens 10% der Tumorzellen betroffen waren (gemäß Empfehlungen von Hitchings et al., 2004). Zur Beurteilung der auf E-Cadherin angefärbten Schnitte, wurde ein Verlust der E-Cadherin-Expression ab 20% der entarteten Zellen als relevant bewertet (Garcia del Muro et al., 2000). Die Beurteilung der Färbungen für HER2 erfolgte semiquantitativ, indem sowohl die Intensität der Färbung als auch der Anteil der gefärbten Tumorzellen berücksichtigt und nach Scorepunkten in vier Kategorien (0, 1+, 2+ und 3+) eingeteilt wurden. Als Beurteilungskriterien wurden die Richtlinien des HercepTests® (DAKO, Hamburg, Tabelle 3) zu Grunde gelegt. In der vorliegenden Arbeit wurde lediglich der Score 3+ als Merkmal einer HER2-Überexpression definiert.

Tabelle 3:

Richtlinien für die Score-Beurteilung der Färbung nach dem HercepTest®

HER2-Score	Definition
3+	starke, komplette Membranfärbung in $\geq 10\%$ der Tumorzellen
2+	geringe bis mittelgradige Membranfärbung in $\geq 10\%$ der Tumorzellen
1+	unvollständige Membranfärbung in $\geq 10\%$ der Tumorzellen
0	keine Färbung oder Färbung von $< 10\%$ der Tumorzellen

2.3 Statistische Analyse

Die Statistischen Berechnungen erfolgten mit Hilfe des Programms SPSS® (SPSS, München, Deutschland). Das Signifikanzniveau (p) lag bei allen Analysen bei 0,05. Von einer Tendenz wurde bei einem p -Wert von $< 0,10$ gesprochen. Das Erreichen oder Unterschreiten des signifikanten p -wertes (0,05) ist in den folgenden Tabellen durch Fettschrift hervorgehoben.

Aus den numerischen Parametern (Alter, p53-Index, Ki-67, Top-2 α) wurde der Median ermittelt und von diesem ausgehend die Unterteilung in zwei gleich starke Gruppen (\leq oder $>$ Median) vorgenommen. Alle anderen Parameter (Clusterin, E-Cadherin, MDR, p16, HER2, Grading, Multifokalität, Tumorstaging, Tumorsubstaging, Geschlecht, Chemotherapie) wurden semiquantitativ nach jeweils definierten Kriterien in Gruppen aufgeteilt.

Für die Überlebenszeitanalyse wurden Kaplan-Meier-Kurven angefertigt (Kaplan und Meier, 1958). Mit dieser Methode wird der geschätzte Verlauf der Überlebenszeitkurve durch eine fallende Treppenfunktion dargestellt: Die X-Achse zeigt die Überlebenszeit an, die Y-Achse den prozentualen Anteil der zum jeweiligen Zeitpunkt noch lebenden Patienten. Überlebensparameter waren für die minimal-invasiven pT1-Tumoren das rezidivfreie oder progressionsfreie Überleben, definiert als das Zeitintervall von der Erstdiagnose bis zur histopathologisch gesicherten Diagnose eines Rezidivs oder einer Progression in ein muskelinvasives Stadium, und für die muskelinvasiven Tumoren das krankheitsbezogene Überleben. Konnte der Verlauf nicht weiter verfolgt werden, z.B. weil sich die Patienten nicht den Nachsorgeuntersuchungen unterzogen, so gingen diese Daten als so genannte „zensierte“ Daten in die statistische Analyse ein. In den Kaplan-Meier-Kurven ist die Entfernung dieser Daten jeweils durch einen kleinen, vertikalen Strich gekennzeichnet.

Das betrachtete Intervall für die Patienten mit muskelinvasiven Tumoren umschließt den Zeitraum von der radikalen Zystektomie bis zum tumorbedingten Versterben. Von tumorbedingtem Ableben wurde ausgegangen, wenn neu aufgetretene Rezidivtumoren oder Metastasen histologisch oder radiologisch nachgewiesen werden konnten und der Patient mit diesen verstarb. Daten von Patienten, die sich einer weiteren Nachkontrolle entzogen hatten oder die aus unbekannter Ursache verstorben waren, wurden als zensierte Daten in der Analyse mitberücksichtigt und in den Kaplan-Meier-Kurven mit einem Vertikalstrich gekennzeichnet.

Alle Überlebensanalysen wurden in einem ersten Schritt mittels des Logrank-Tests durchgeführt, einer Variante des χ^2 -Tests, die sich besonders für die Betrachtung von Kaplan-Meier-Kurven eignet.

In einem zweiten Schritt wurde die prognostische Relevanz der einzelnen Parameter mittels einer univariaten, proportionalen Regressionsanalyse nach Cox (Cox, 1972) untersucht. Neben den immunhistochemischen Parametern wurden auch andere Parameter wie Alter, Geschlecht, Chemotherapiestatus, Multifokalität, Tumorgrading, Tumorstaging und Substaging betrachtet. Die Testergebnisse wurden in Form von Irrtumswahrscheinlichkeiten (p -Werten), dem so genannten „relativen Risiko“ (RR) sowie dem 95%-Konfidenzintervall wiedergegeben.

Für alle Parameter, die im Logrank-Test eine statistische ($p < 0,05$) oder tendenzielle Signifikanz ($p < 0,10$) erzielt hatten, wurde in einem dritten Schritt eine multivariate Cox-Regressionsanalyse durchgeführt, um die Unabhängigkeit der prognostischen Relevanz zu überprüfen. Nur denjenigen Parametern, die in der Multivariat-Analyse einen signifikanten p -Wert erzielten, konnte eine unabhängige prognostische Aussagekraft bescheinigt werden.

3. Ergebnisse

In diesem Kapitel werden sowohl die Ergebnisse der Untersuchungen von allgemeinen Parametern wie Alter, Geschlecht, histologischer Malignitätsgrad, Tumorstadium, Lymphknotenstatus und Chemotherapie-Status als auch die der immunhistochemischen Parameter für jeweils pT1-Tumoren und muskelinvasive Tumoren nacheinander vorgestellt. Als statistische Tests für die Überlebensanalysen wurden der Logrank-Test und die univariate Cox-Regressionsanalyse angewendet. Für alle Parameter, die im Logrank-Test einen p -Wert von $<0,10$ erreichten, erfolgt eine graphische Illustration durch Kaplan-Meier-Überlebenskurven.

3.1. Etablierte Prognosefaktoren und allgemeine Parameter

3.1.1. Lymphknotenstatus

Bei 22 von 110 Patienten mit muskelinvasiven Tumoren und histologisch nachweisbaren regionären Lymphknoten wurden Karzinometastasen der Lymphknoten festgestellt. Bei diesen Patienten war das krankheitsbezogene Überleben im Vergleich zu solchen ohne Lymphknotenmetastasen signifikant verkürzt ($p = 0,0001$ nach Logrank-Test und univariater Cox-Analyse; vgl. Tab. 3 und Abb. 9).

3.1.2. Tumorstadium

In dem hier untersuchten Patientenkollektiv lag in 76 Fällen das Stadium pT2, in 48 Fällen das Stadium pT3 und in 13 Fällen das Stadium pT4 vor. Um zwei annähernd gleich große Gruppen miteinander vergleichen zu können, wurden die Stadien pT3 und pT4 in einer Gruppe zusammengefasst. Es zeigte sich, dass Tumoren fortgeschrittener Tumorstadien (pT3/pT4) im Vergleich zu pT2-Tumoren ein signifikant schlechteres krankheitsbezogenes Überleben aufwiesen ($p = 0,002$ nach Logrank-Test; $p = 0,004$ nach univariater Cox-Analyse; vgl. Tab. 3 und Abb. 10).

Tabelle 3: Einfluss von etablierten Prognosefaktoren und allgemeinen Parametern auf das krankheitsbezogene Überleben von Patienten mit muskelinvasiven Harnblasenkarzinomen

Parameter	Kategorien (Fallzahlen)	Logrank- Test	Univariate Cox- Analyse		
		<i>p</i>	<i>p</i>	RR	95% KI
Lymphknotenstatus	pN- vs. pN+ (110 vs. 22)	0,0001	0,0001	2,57	1,80 - 3,66
Tumorstadium	pT2 vs. pT3/4 (71 vs. 61)	0,002	0,004	3,00	1,43 - 6,31
Malignitätsgrad	niedrig vs. hoch (6 vs. 126)	0,598	0,604	1,69	0,23 - 12,40
Alter	≤ vs. > 64 J. (66 vs. 66)	0,705	0,706	1,14	0,58 - 2,26
Geschlecht	männl. vs. weibl. (103 vs. 29)	0,033	0,038	2,12	1,04 - 4,30
Chemotherapie-Status	mit vs. ohne CT (102 vs. 30)	0,006	0,009	2,53	1,27 - 5,04

3.1.3. Substaging von pT1-Tumoren

Gemäß der von Cheng et al. (1999) vorgeschlagenen Methode zur Unterteilung von pT1-Tumoren (Substaging) anhand der Infiltrationstiefe wiesen 53 Patienten das Stadium pT1a und 20 Patienten das Stadium pT1b auf. Das Stadium pT1c wurde in keinem Fall diagnostiziert. Die statistische Analyse zeigte, dass das Substaging einen signifikanten Zusammenhang mit dem klinischen Verlauf aufwies: Patienten mit pT1a-Tumoren zeigten im Vergleich zu solchen mit pT1b-Tumoren ein signifikant besseres rezidivfreies Überleben ($p = 0,042$ nach Logrank-Test bzw. $p = 0,048$ nach univariater Analyse; vgl. Tab. 4, Abb. 11) und progressionsfreies Überleben ($p = 0,031$ bzw. $p = 0,038$; vgl. Tab. 5, Abb. 12).

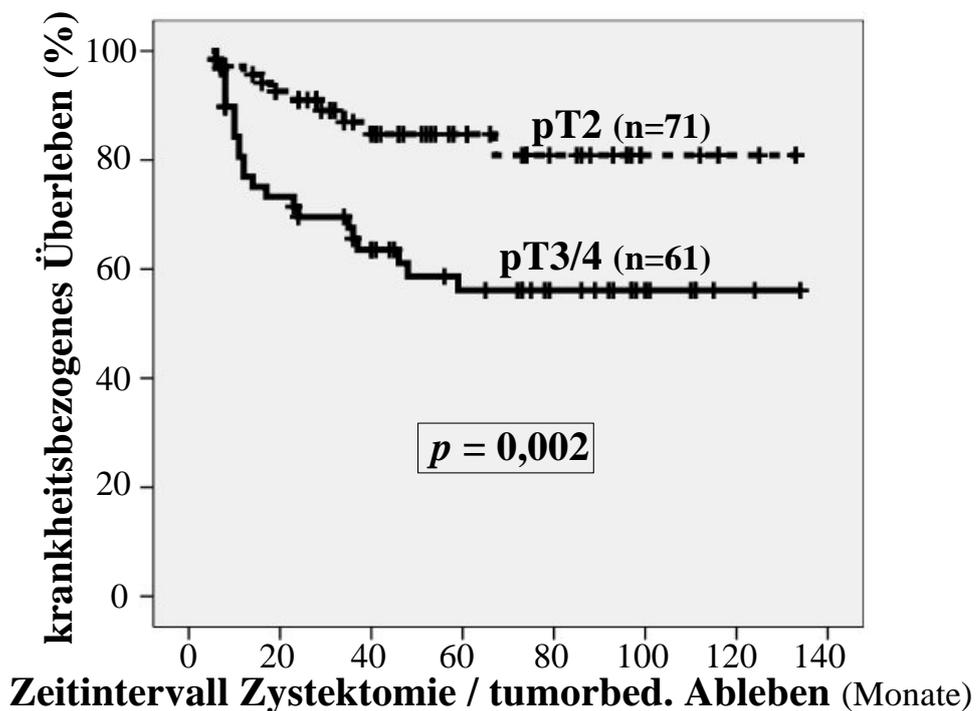
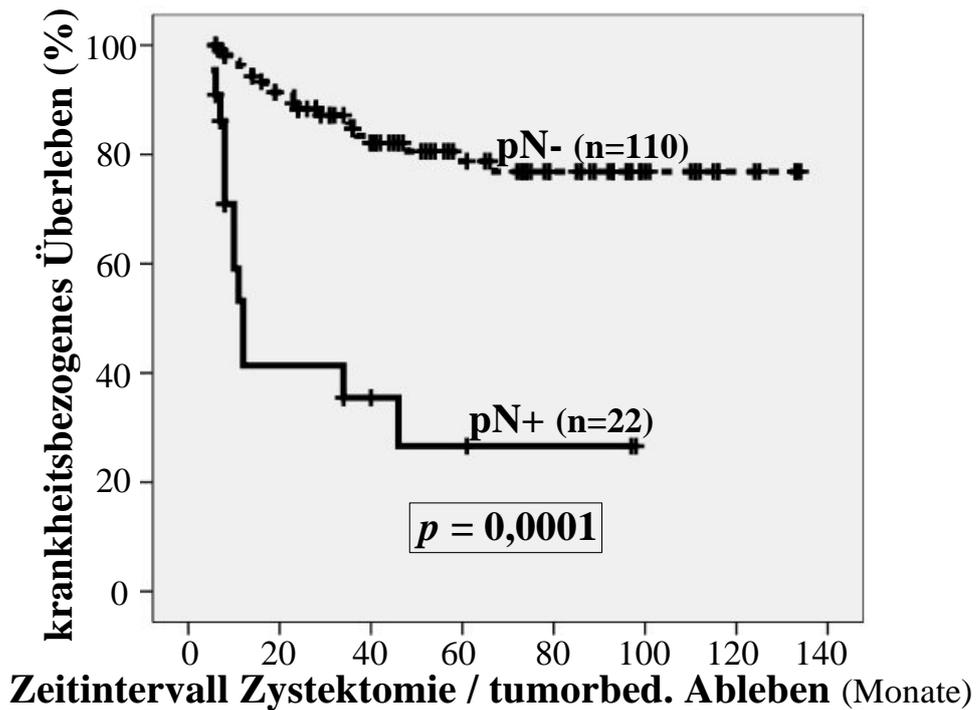


Abb. 9 (oben) und 10 (unten):

Kaplan-Meier-Überlebenskurven zum Einfluss von Lymphknotenstatus (oben) und Tumorstadium (unten) auf das krankheitsbezogene Überleben von Patienten mit muskelinvasiven Harnblasenkarzinomen

Tabelle 4: Einfluss von etablierten Prognosefaktoren und allgemeinen Parametern auf das rezidivfreie Überleben von Patienten mit pT1-Harnblasen-karzinomen

Parameter	Kategorien (Fallzahlen)	Logrank- Test	Univariate Cox- Analyse		
		<i>p</i>	<i>p</i>	RR	95% KI
Substaging	pT1a vs. pT1b (53 vs. 20)	0,042	0,048	1,79	1,01 - 3,18
Malignitäts- grad	niedrig vs. hoch (33 vs. 40)	0,004	0,006	2,23	1,27 - 3,91
Alter	≤ vs. > 68 J. (37 vs. 36)	0,218	0,227	1,40	0,81 - 2,42
Geschlecht	männl. vs. weibl. (60 vs. 13)	0,369	0,377	1,35	0,69 - 2,64
Multizentri- zität	uni- vs. multiz. (27 vs. 46)	0,185	0,194	0,70	0,40 - 1,20

Tabelle 5: Einfluss von etablierten Prognosefaktoren und allgemeinen Parametern auf das progressionsfreie Überleben von Patienten mit pT1-Harnblasen-karzinomen

Parameter	Kategorien (Fallzahlen)	Logrank- Test	Univariate Cox- Analyse		
		<i>p</i>	<i>p</i>	RR	95% KI
Substaging	pT1a vs. pT1b (53 vs. 20)	0,031	0,038	2,28	1,05 - 4,97
Malignitäts- grad	niedrig vs. hoch (33 vs. 40)	0,300	0,307	1,49	0,69 - 3,21
Alter	≤ vs. > 68 J. (37 vs. 36)	0,167	0,176	1,72	0,79 - 3,76
Geschlecht	männl. vs. weibl. (60 vs. 13)	0,310	0,318	1,55	0,65 - 3,69
Multizentri- zität	uni- vs. multiz. (27 vs. 46)	0,992	0,992	1,00	0,46 - 2,15

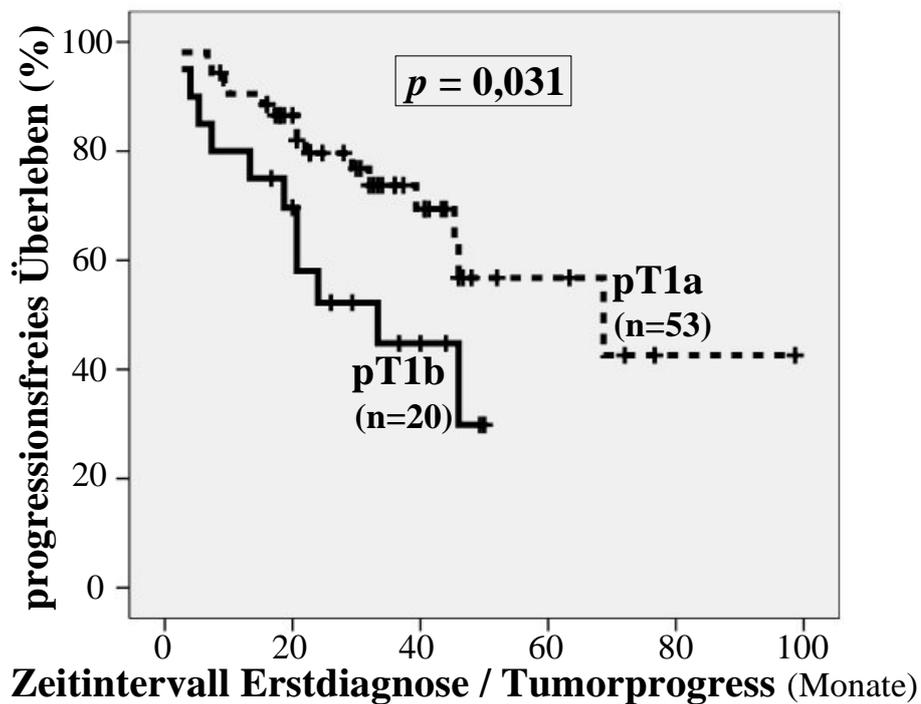
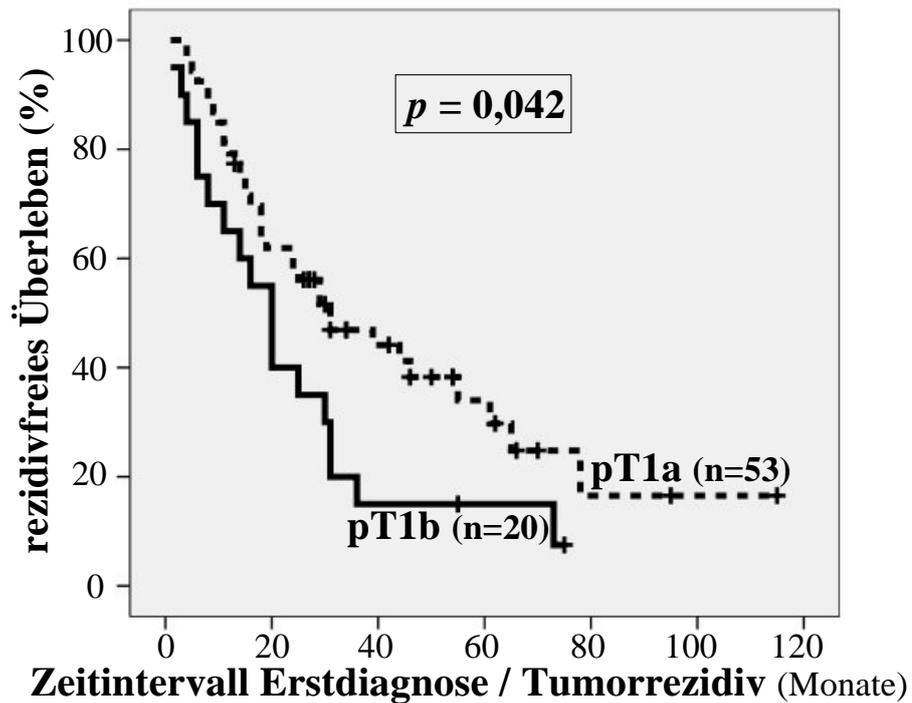


Abb. 11 (oben) und 12 (unten):

Kaplan-Meier-Überlebenskurven zum Einfluss des Substaging (pT1a vs. pT1b) auf das rezidivfreie (oben) und progressionsfreie Überleben (unten) von Patienten mit pT1-Harnblasenkarzinomen

3.1.4. Histologischer Malignitätsgrad

Wie aus Tabelle 3 (S. 31) hervorgeht, besaß der histologische Malignitätsgrad (Grading) keinen signifikanten Einfluss auf das krankheitsbezogene Überleben von Patienten mit muskelinvasiven Tumoren. Einschränkenderweise ist in diesem Zusammenhang allerdings anzumerken, dass die Gruppe der niedrig-malignen Karzinome mit einer Fallzahl von 6 nur sehr klein war.

Unter den pT1-Harnblasenkarzinomen zeigte der Malignitätsgrad einen signifikanten Einfluss auf das rezidivfreie Überleben ($p = 0,004$ nach Logrank-Test bzw. $p = 0,006$ nach univariater Cox-Analyse; vgl. Tab. 4 und Abb. 13), jedoch nicht auf das progressionsfreie Überleben ($p = 0,300$ nach Logrank-Test bzw. $p = 0,307$ nach univariater Cox-Analyse; vgl. Tab. 5).

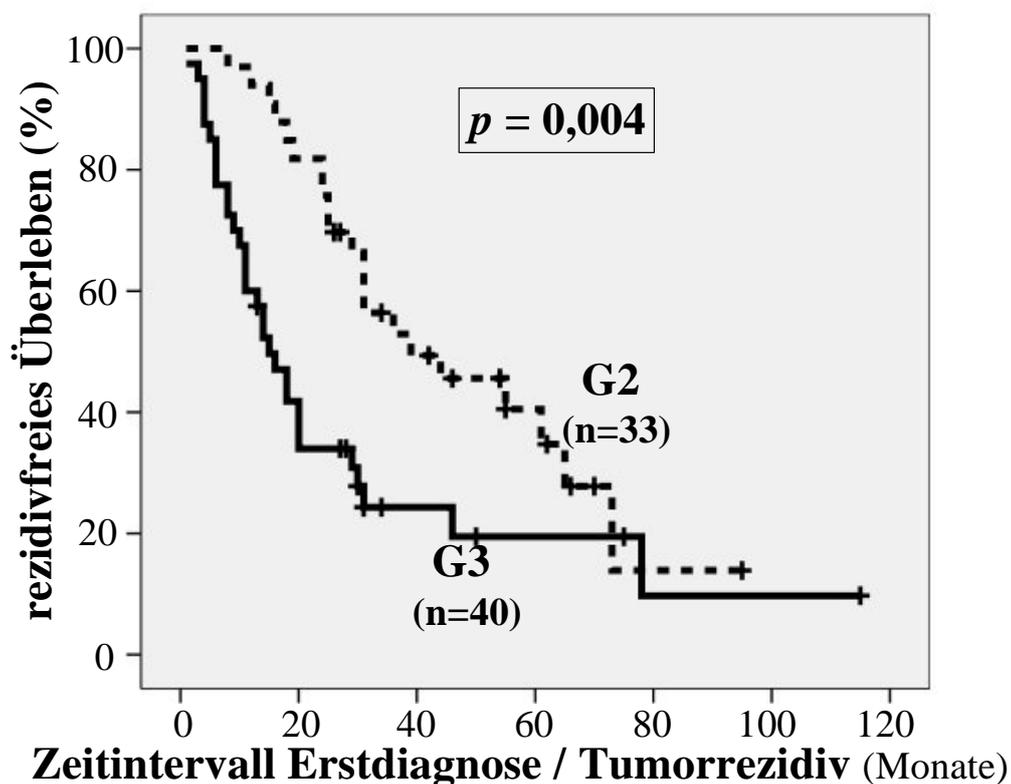


Abb. 13:

Kaplan-Meier-Überlebenskurve zum Einfluss des Malignitätsgrads auf das rezidivfreie Überleben von Patienten mit pT1-Harnblasenkarzinomen

3.1.5. Multizentrität

Bei den hier untersuchten pT1-Harnblasenkarzinomen lagen in 37% der Fälle solitäre und in 63% multiple (multizentrische) Tumoren vor. Patienten mit multizentrischen Tumoren unterschieden sich im Vergleich zu solchen mit unizentrischen Tumoren weder hinsichtlich des rezidivfreien Überlebens ($p = 0,185$ nach Logrank-Test bzw. $p = 0,194$ nach univariater Cox-Analyse; vgl. Tab. 4) noch hinsichtlich des progressionsfreien Überlebens ($p = 0,992$ nach Logrank-Test und nach univariater Cox-Analyse; vgl. Tab. 5) in signifikanter Weise.

3.1.6. Alter

Für die Überlebensanalysen wurden die Patienten an der Schwelle des Altersmedianwertes (\leq versus $>$ Median) in zwei etwa gleich große Gruppen eingeteilt. Es zeigte sich, dass das Patientenalter weder bei pT1-Harnblasenkarzinomen (p -Werte für das rezidivfreie Überleben nach Logrank-Test bzw. univariater Cox-Analyse: 0,218 bzw. 0,227; p -Werte für das progressionsfreie Überleben: 0,167 bzw. 0,176; vgl. Tab. 4 und 5) noch bei pT \geq 2-Harnblasenkarzinomen (p -Werte für das krankheits-bezogene Überleben nach Logrank-Test bzw. univariater Cox-Analyse: 0,705 bzw. 0,706) einen signifikanten Einfluss auf den Verlauf der Tumoren besaß.

3.1.7. Geschlecht

Das männliche Geschlecht überwog sowohl bei den pT1- als auch bei den pT \geq 2-Harnblasentumoren deutlich gegenüber dem weiblichen (Geschlechterverhältnis 4,6 : 1 bei pT1- und 3,6 : 1 bei pT \geq 2-Tumoren). Bei den pT1-Tumorpatienten unterschied sich der Krankheitsverlauf der Männer nicht signifikant von dem der Frauen (rezidivfreies Überleben: $p = 0,359$ nach Logrank-Test bzw. $p = 0,377$ nach univariater Cox-Analyse, vgl. Tab. 4; progressionsfreies Überleben: $p = 0,310$ bzw. $p = 0,318$, vgl. Tab. 5). Dagegen zeigten Frauen mit muskelinvasiven Tumoren (pT \geq 2) eine signifikant schlechtere krankheits-bezogene Überlebensrate als Männer ($p = 0,033$ nach Logrank-Test bzw. $p = 0,038$ nach univariater Cox-Analyse, vgl. Tab. 3 und Abb. 14).

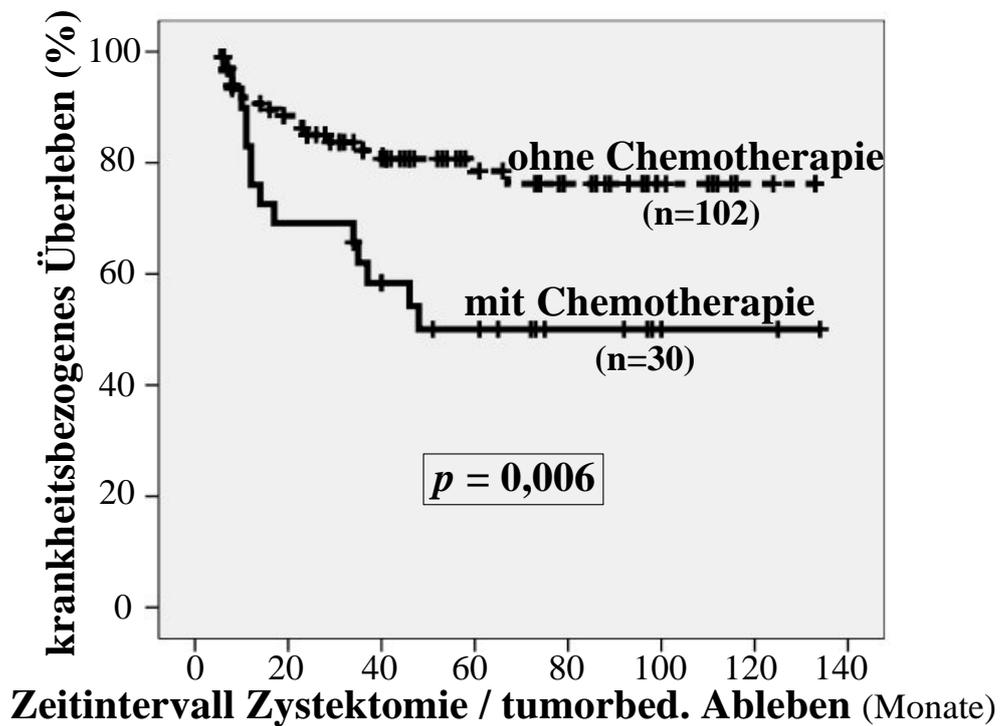
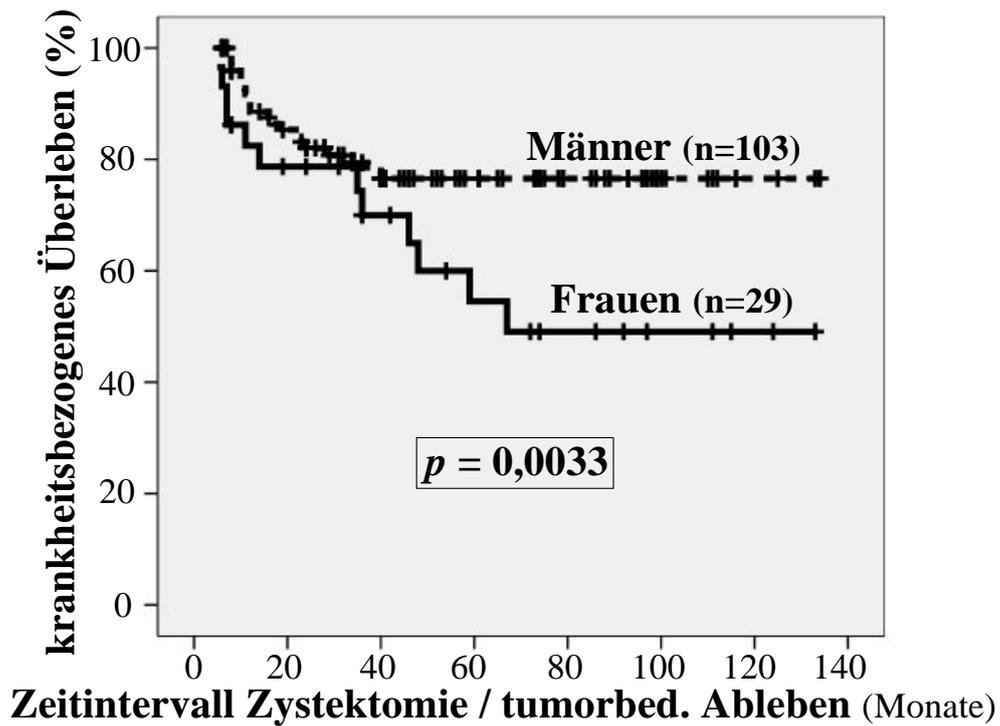


Abb. 14 (oben) und 15 (unten):

Kaplan-Meier-Überlebenskurven zum Einfluss des Geschlechts (oben) und des Chemotherapie-Status (unten) auf das krankheitsbezogene Überleben von Patienten mit muskelinvasiven Harnblasenkarzinomen

3.1.8. Chemotherapie-Status

30 der insgesamt 132 Patienten mit muskelinvasiven Harnblasenkarzinomen wurden einer chemotherapeutischen Behandlung unterzogen. Bei den meisten dieser Patienten waren histologisch Lymphknotenmetastasen festgestellt worden. Dagegen beinhaltete die Gruppe der nicht-chemotherapierten Patienten ausschließlich solche mit nodal-negativem Status. Eine Überlebensanalyse zeigte, dass Patienten, die eine Chemotherapie erhalten hatten, im Vergleich zu solchen ohne Chemotherapie durch ein signifikant schlechteres krankheitsbezogenes Überleben gekennzeichnet waren ($p = 0,006$ nach Logrank-Test bzw. $p = 0,009$ nach univariater Cox-Analyse, vgl. Tab. 3 und Abb. 15), wofür in erster Linie der enge Zusammenhang mit dem Nodalstatus verantwortlich sein dürfte.

3.2. Immunhistochemische Parameter

In der vorliegenden Studie wurden die Antikörper Ki-67, Top-2 α , p53, p16, E-Cadherin, Clusterin, HER2 und MDR eingesetzt. Da sich während der Färbeprozedur wiederholt einzelne Tumorchips von den Multitissue Arrays ablösten, kam es zu einer Reduktion der auswertbaren Fallzahl. Im Durchschnitt waren 80% der maximal 73 pT1- bzw. der maximal 132 pT \geq 2-Tumoren auswertbar. Im Einzelnen wurden die nachstehend geschilderten Ergebnisse erzielt:

3.2.1. Ki-67-Expression

Die bei den pT1- und pT \geq 2-Tumoren ermittelten Ki-67-Indizes sind in Tab. 6 aufgeführt. Wie die Daten verdeutlichen, waren die Ki-67-Indizes bei pT1- und pT \geq 2-Tumoren in etwa gleich hoch (Medianwerte: 51 bzw. 52%). Die Gruppeneinteilung erfolgte jeweils auf der Basis des Medianwertes. Es zeigte sich, dass pT1-Tumoren mit hohem Ki-67-Index im Vergleich zu solchen mit niedrigem Index ein signifikant schlechteres rezidivfreies Überleben ($p = 0,030$ nach Logrank-Test bzw. $p = 0,034$ nach univariater Cox-Analyse, vgl. Tab. 7 und Abb. 16), jedoch kein signifikant unterschiedliches progressionsfreies Überleben aufwiesen ($p = 0,690$ bzw. $p = 0,693$; vgl. Tab. 8). Bei den pT \geq 2-Tumoren zeigte der Ki-67-Index einen signifikanten Zusammenhang mit dem krankheitsbezogenen Überleben ($p = 0,008$ bzw. $p = 0,011$; vgl. Tab. 9 und Abb. 17).

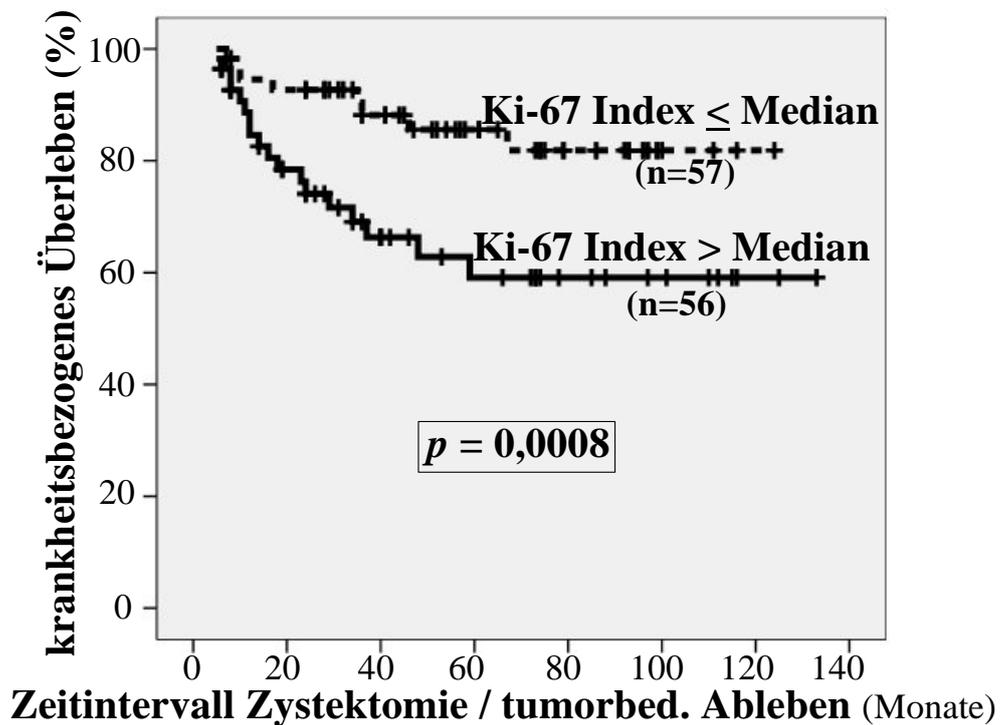
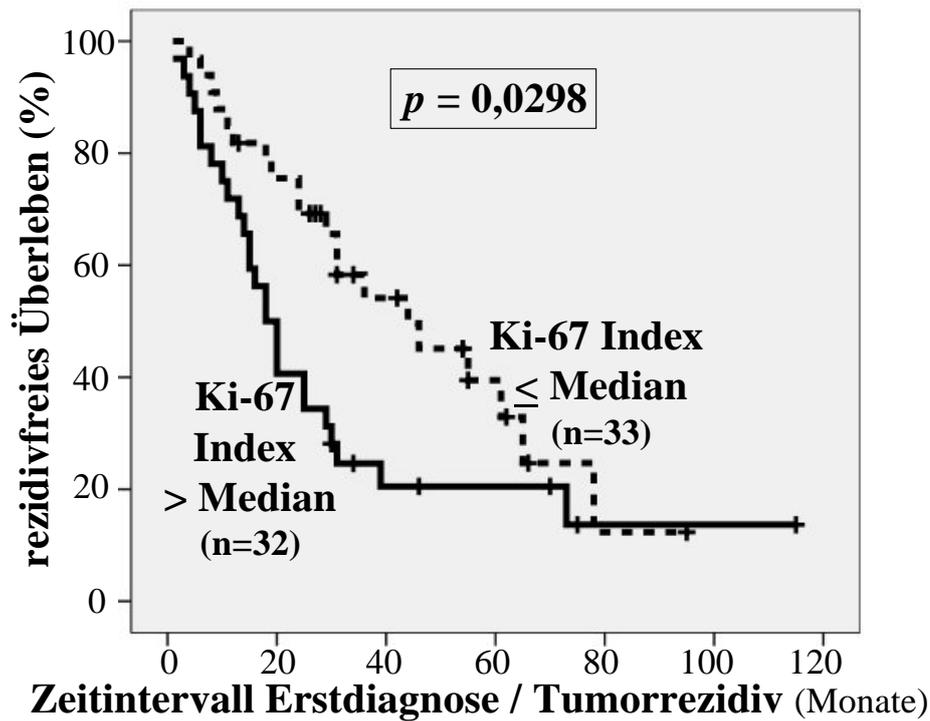


Abb. 16 (oben) und 17 (unten):

Kaplan-Meier-Überlebenskurven zum Einfluss des Ki-67-Index auf das rezidivfreie Überleben von pT1-Harnblasenkarzinompatienten (oben) bzw. auf das krankheitsbezogene Überleben von pT≥2-Harnblasenkarzinompatienten (unten)

Tabelle 6: Immunhistochemisch ermittelte Ki-67-Indizes bei pT1- und pT≥2-Harnblasenkarzinomen

T-Stadium	Fallzahl	Arithmetisches Mittel	Median	Spannweite
pT 1	65	47%	51%	1 - 93%
pT ≥ 2	113	51%	52%	5 - 98%

Tabelle 7: Einfluss von immunhistochemischen Parametern auf das rezidivfreie Überleben von Patienten mit pT1-Harnblasenkarzinomen

Parameter	Kategorien (Fallzahlen)	Logrank-Test	Univariate Cox-Analyse		
		<i>p</i>	<i>p</i>	RR	95% KI
Ki-67-Index	≤ vs. > Median (33 vs. 32)	0,030	0,034	1,89	1,05 - 3,40
Top-2α-Index	≤ vs. > Median (28 vs. 27)	0,002	0,003	2,75	1,39 - 5,35
p53-Index	≤ vs. > Median (33 vs. 33)	0,047	0,053	1,79	0,99 - 3,22
p16-Expression	norm. vs. Verlust (34 vs. 29)	0,334	0,341	1,34	0,74 - 2,44
E-Cadherin-Expression	norm. vs. Verlust (29 vs. 40)	0,004	0,005	2,31	1,29 - 4,13
Clusterin-Expression	neg. vs. pos. (42 vs. 15)	0,921	0,921	0,96	0,47 - 1,99
HER2-Score	(0 - 2+) vs. (3+) (57 vs. 9)	0,028	0,036	2,46	1,06 - 5,71

Tabelle 8: Einfluss von immunhistochemischen Parametern auf das progressionsfreie Überleben von Patienten mit pT1-Harnblasenkarzinomen

Parameter	Kategorien (Fallzahlen)	Logrank- Test	Univariate Cox- Analyse		
		p	p	RR	95% KI
Ki-67-Index	\leq vs. > Median (33 vs. 32)	0,690	0,693	1,18	0,52 - 2,68
Top-2 α -Index	\leq vs. > Median (28 vs. 27)	0,089	0,103	2,40	0,84 - 6,87
p53-Index	\leq vs. > Median (33 vs. 33)	0,260	0,270	1,59	0,70 - 3,64
p16- Expression	norm. vs. Verlust (34 vs. 29)	0,012	0,018	2,92	1,20 - 7,07
E-Cadherin- Expression	norm. vs. Verlust (29 vs. 40)	0,158	0,168	1,74	0,79 - 3,83
Clusterin- Expression	neg. vs. pos. (42 vs. 15)	0,280	0,290	1,68	0,64 - 4,36
HER2-Score	(0 - 2+) vs. (3+) (57 vs. 9)	0,152	0,165	2,19	0,72 - 6,62

**Tabelle 9: Einfluss von immunhistochemischen Parametern auf das krankheits-
bezogene Überleben von Patienten mit pT \geq 2-Harnblasenkarzinomen**

Parameter	Kategorien (Fallzahlen)	Logrank- Test	Univariate Cox- Analyse		
		p	p	RR	95% KI
Ki-67-Index	\leq vs. > Median (57 vs. 56)	0,008	0,011	2,94	1,28 - 6,77
Top-2 α -Index	\leq vs. > Median (54 vs. 54)	0,023	0,029	2,51	1,10 - 5,74
p53-Index	\leq vs. > Median (53 vs. 52)	0,183	0,193	2,04	0,70 - 5,97
p16- Expression	norm. vs. Verlust (49 vs. 70)	0,852	0,852	1,07	0,53 - 2,17
E-Cadherin- Expression	norm. vs. Verlust (64 vs. 54)	0,688	0,690	1,16	0,57 - 2,34
Clusterin- Expression	neg. vs. pos. (89 vs. 29)	0,042	0,048	2,15	1,01 - 4,59
HER2-Score	(0 - 2+) vs. (3+) (88 vs. 23)	0,016	0,020	2,41	1,15 - 5,08
MDR- Expression	neg. vs. pos. (61 vs. 59)	0,085	0,091	1,87	0,90 - 3,85

3.2.2. Top-2 α -Expression

Die Top-2 α -Indizes, die bei den pT1- und pT \geq 2-Tumoren ermittelt wurden, sind in Tab. 10 aufgeführt. Sie lagen bei pT1-Tumoren mit einem Medianwert von 36% etwas höher als bei den pT \geq 2-Tumoren, bei denen der Medianwert 26% betrug. Die Gruppeneinteilung erfolgte – wie auch beim Ki-67-Index – jeweils auf der Basis des Medianwertes. Es zeigte sich, dass pT1-Tumoren mit hohem Top-2 α -Index im Vergleich zu solchen mit niedrigem Index ein signifikant schlechteres rezidivfreies Überleben ($p = 0,002$ nach Logrank-Test bzw. $p = 0,003$ nach univariater Cox-Analyse, vgl. Tab. 7 und Abb. 18) und ein tendenziell schlechteres progressionsfreies Überleben aufwiesen ($p = 0,089$ bzw. $p = 0,103$; vgl. Tab. 8 und Abb. 19). Auch bei den muskelinvasiven Harnblasenkarzinomen zeigte der Top-2 α -Index eine Korrelation mit dem Krankheitsverlauf, und zwar insofern, als Tumoren mit hohem Top-2 α -Index im Vergleich zu solchen mit niedrigem Index durch ein signifikant schlechteres krankheitsbezogenes Überleben gekennzeichnet waren ($p = 0,023$ nach Logrank-Test bzw. $p = 0,029$ nach univariater Cox-Analyse; vgl. Tab. 9 und Abb. 20).

Tabelle 10: Immunhistochemisch ermittelte Top-2 α -Indizes bei pT1- und pT \geq 2-Harnblasenkarzinomen

T-Stadium	Fallzahl	Arithmetisches Mittel	Median	Spannweite
pT 1	55	38%	36%	5 - 83%
pT \geq 2	108	33%	26%	3 - 98%

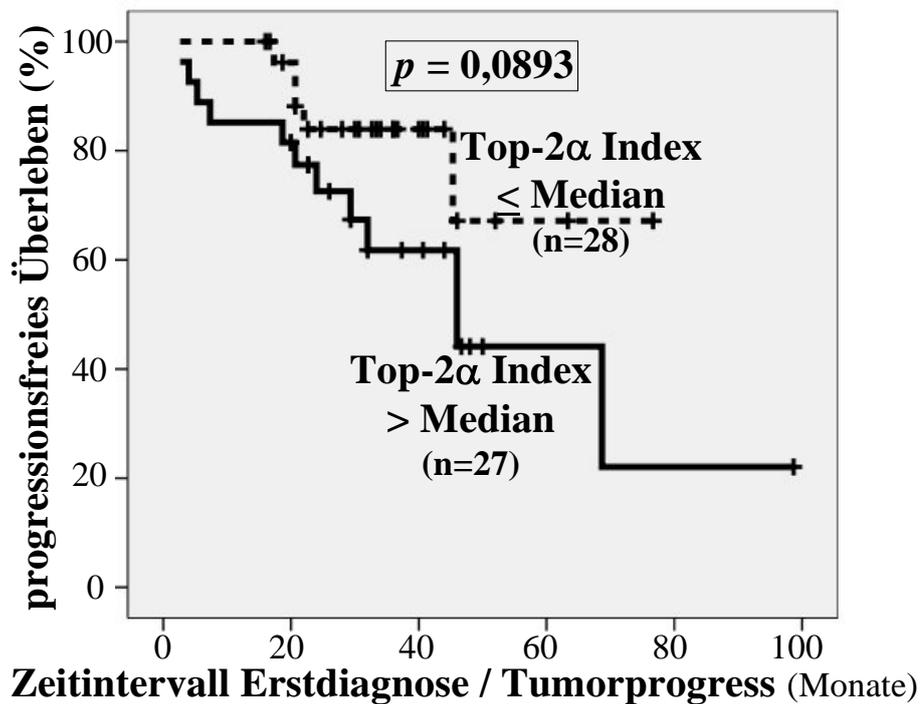
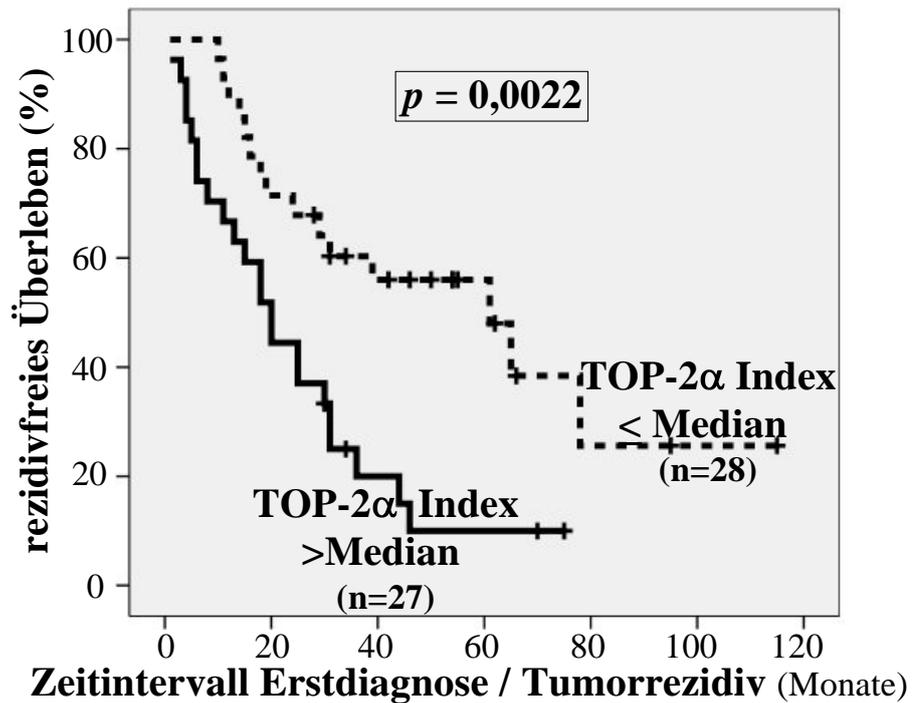


Abb. 18 (oben) und 19 (unten):

Kaplan-Meier-Überlebenskurven zum Einfluss des Top-2 α -Index auf das rezidivfreie (oben) und auf das progressionsfreie Überleben (unten) von pT1-Harnblasenkarzinompatienten

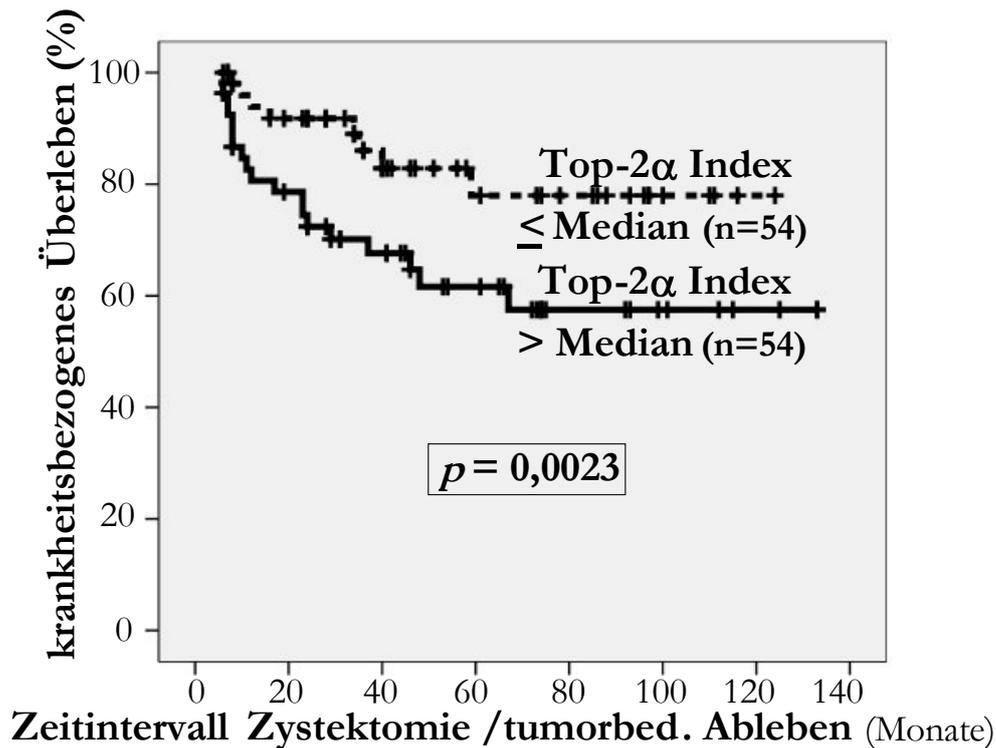


Abb. 20:

Kaplan-Meier-Überlebenskurve zum Einfluss des Top-2 α -Index auf das krankheitsbezogene Überleben von Patienten mit muskelinvasiven Harnblasenkarzinomen

3.2.3. p53-Expression

Die p53-Indizes lagen bei den pT1-Tumoren (Median: 10%) tendenziell etwas niedriger als bei den pT \geq 2-Tumoren (Median: 24%; vgl. Tab. 11), bei allerdings recht ähnlichen arithmetischen Mittelwerten (32 bzw. 34%). Bei den pT1-Tumoren war ein Zusammenhang zwischen erhöhtem p53-Index und früherem Tumorrezidiv festzustellen ($p = 0,047$ nach Logrank-Test bzw. $p = 0,053$ nach univariater Cox-Analyse, vgl. Tab. 7 und Abb. 21). Dagegen bestand weder ein signifikanter Zusammenhang zwischen p53-Index und Progressionsverhalten der pT1-Tumoren ($p = 0,260$ nach Logrank-Test bzw. $p = 0,270$ nach univariater Cox-Analyse; vgl. Tab. 8) noch zwischen p53-Index und krankheitsbezogener Überlebensrate von Patienten mit pT \geq 2-Tumoren ($p = 0,183$ nach Logrank-Test bzw. $p = 0,193$ nach univariater Cox-Analyse; vgl. Tab. 9).

Tabelle 11: Immunhistochemisch ermittelte p53-Indizes bei pT1- und pT≥2-Harnblasenkarzinomen

T-Stadium	Fallzahl	Arithmetisches Mittel	Median	Spannweite
pT 1	66	32%	10%	0 - 100%
pT ≥ 2	105	34%	24%	0 - 99%

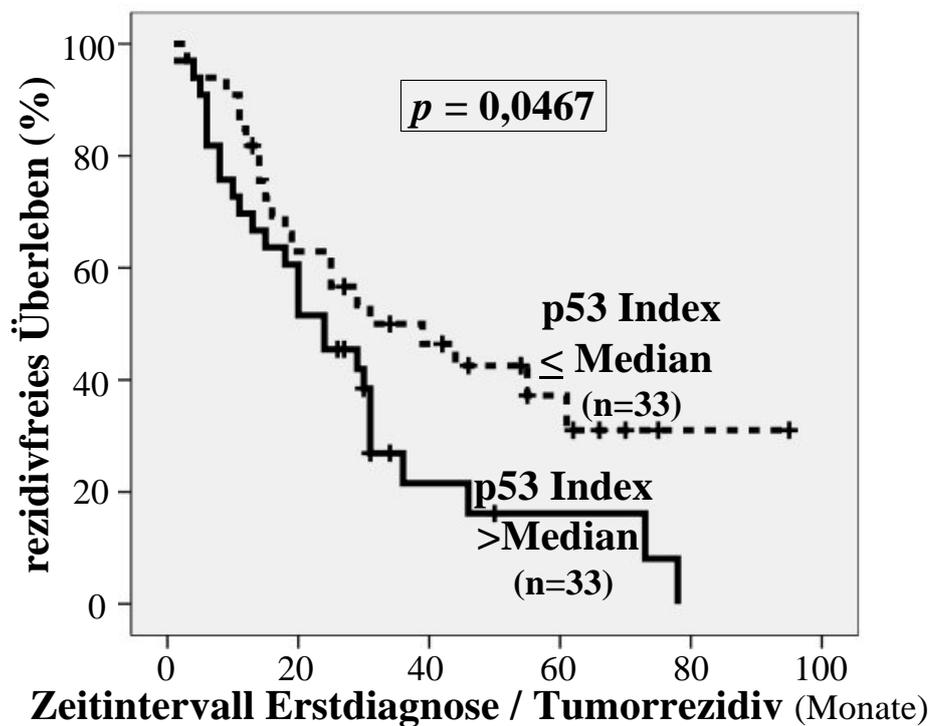


Abb. 21:

Kaplan-Meier-Überlebenskurve zum Einfluss des p53-Index auf das rezidivfreie Überleben von Patienten mit pT1-Harnblasenkarzinomen

3.2.4. p16-Expression

Bei 46% (29/63) der pT1-Tumoren und bei 59% (70/119) der pT \geq 2-Tumoren wurde ein Verlust der immunhistochemischen p16-Expression registriert (vgl. Abb. 4). Ein Verlust der p16-Expression korrelierte signifikant mit früherem Tumorprogress der pT1-Karzinome ($p = 0,012$ nach Logrank-Test bzw. $p = 0,018$ nach univariater Cox-Analyse; vgl. Tab. 8 und Abb. 22), jedoch nicht signifikant mit dem Rezidivverhalten ($p = 0,334$ nach Logrank-Test bzw. $p = 0,341$ nach univariater Cox-Analyse; vgl. Tab. 7). Bei den muskelinvasiven Harnblasenkarzinomen konnte keine signifikante Assoziation zwischen p16-Expression und krankheitsbezogener Überlebensrate festgestellt werden ($p = 0,852$ nach Logrank-Test und nach univariater Cox-Analyse; vgl. Tab. 9).

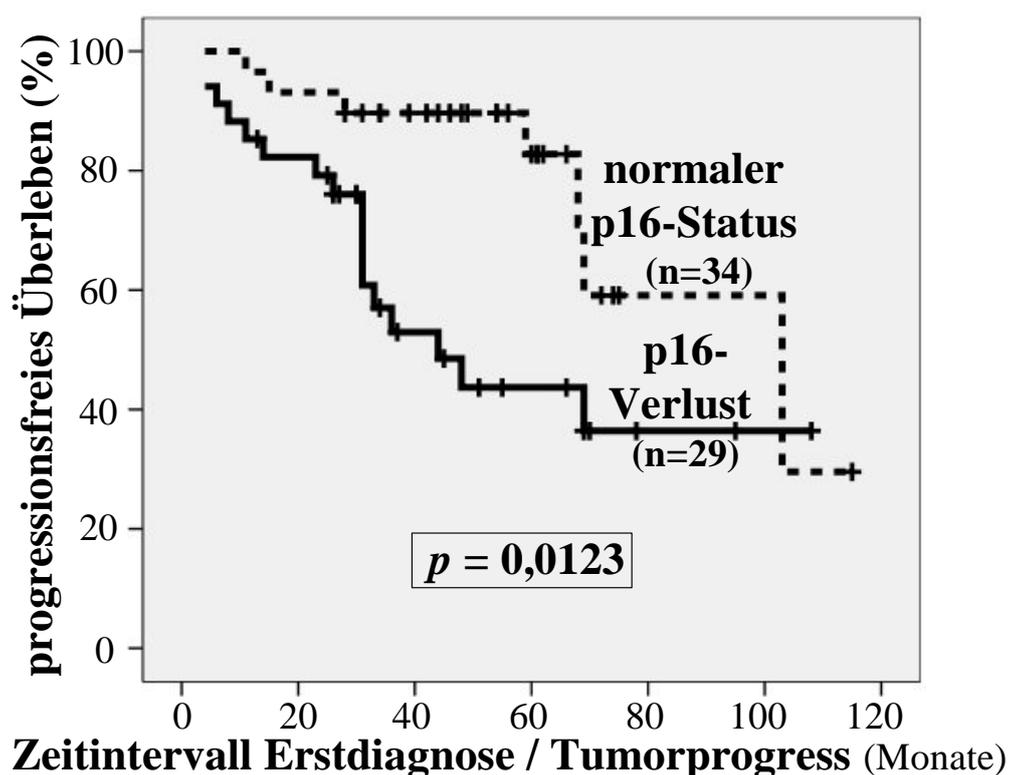


Abb. 22:

Kaplan-Meier-Überlebenskurve zum Einfluss der p16-Expression auf das progressionsfreie Überleben von Patienten mit pT1-Harnblasenkarzinomen

3.2.5. E-Cadherin-Expression

Die membranständige Expression von E-Cadherin (vgl. Abb. 5) war bei 58% (40/69) der pT1-Tumoren und bei 46% (54/118) der muskelinvasiven Tumoren stark reduziert (d. h. in $\leq 20\%$ der Tumorzellen nachweisbar). Ein derartiger E-Cadherin-Verlust war bei den pT1-Urothelkarzinomen signifikant mit einer erhöhten Rezidivneigung der Tumoren vergesellschaftet ($p = 0,004$ bzw. $p = 0,005$ nach Logrank-Test bzw. univariater Cox-Analyse; vgl. Tab. 7 und Abb. 23). Dagegen bestand nur ein schwacher, nicht signifikanter Trend bezüglich eines erhöhten Progressionsverhaltens ($p = 0,158$ bzw. $p = 0,168$; vgl. Tab. 8). Bei den muskelinvasiven Tumoren war keine Korrelation zwischen Verlust der E-Cadherin-Expression und der Überlebensrate der Harnblasenkarzinompatienten feststellbar ($p = 0,688$ bzw. $p = 0,690$; vgl. Tab. 9).

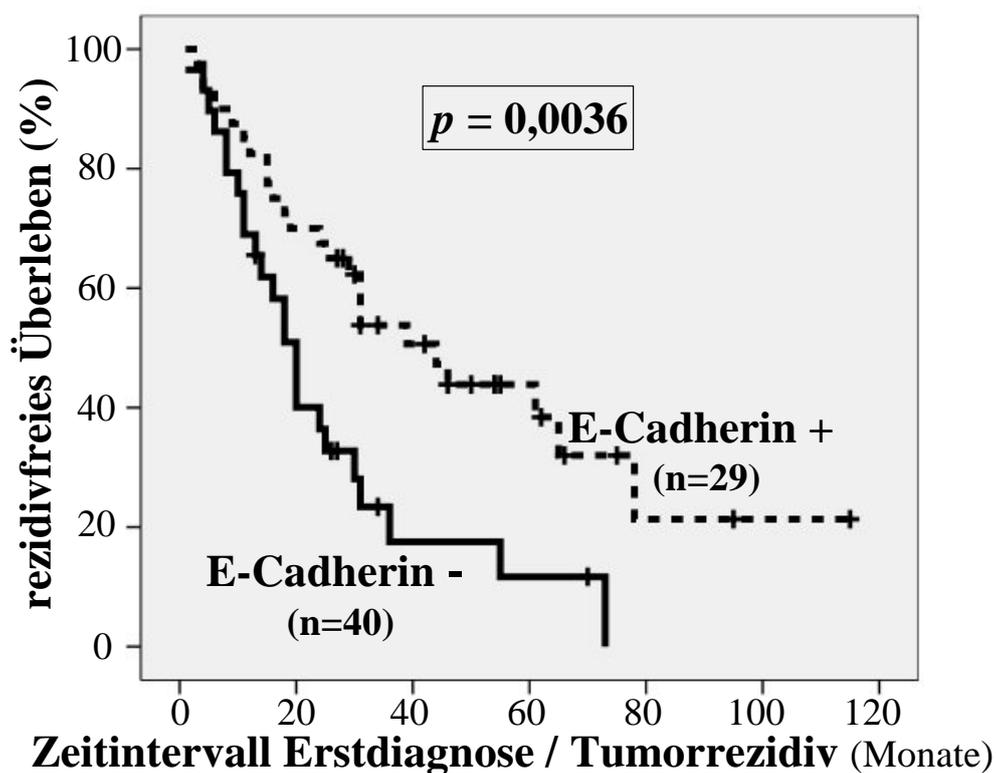


Abb. 23:

Kaplan-Meier-Überlebenskurve zum Einfluss der E-Cadherin-Expression auf das rezidivfreie Überleben von Patienten mit pT1-Harnblasenkarzinomen

3.2.6. Clusterin-Expression

Eine signifikante Clusterin-Expression, wie sie exemplarisch in Abb. 6 illustriert ist, war bei pT1- und pT \geq 2-Harnblasenkarzinomen in gleicher Häufigkeit, nämlich in jeweils 26% der Fälle, vorzufinden. Ein positiver Clusterin-Status war bei den pT1-Tumoren weder mit dem rezidivfreien ($p = 0,921$ nach Logrank-Test bzw. univariater Cox-Analyse; vgl. Tab. 7) noch mit dem progressionsfreien Überleben ($p = 0,280$ bzw. $p = 0,290$; vgl. Tab. 8) in signifikanter Weise assoziiert. Im Gegensatz hierzu bestand bei den muskelinvasiven Harnblasenkarzinomen ein signifikanter Zusammenhang zwischen positivem Clusterin-Status und schlechterem krankheitsbezogenem Überleben ($p = 0,042$ bzw. $p = 0,048$ nach Logrank-Test bzw. univariater Cox-Analyse; vgl. Tab. 9 und Abb. 24).

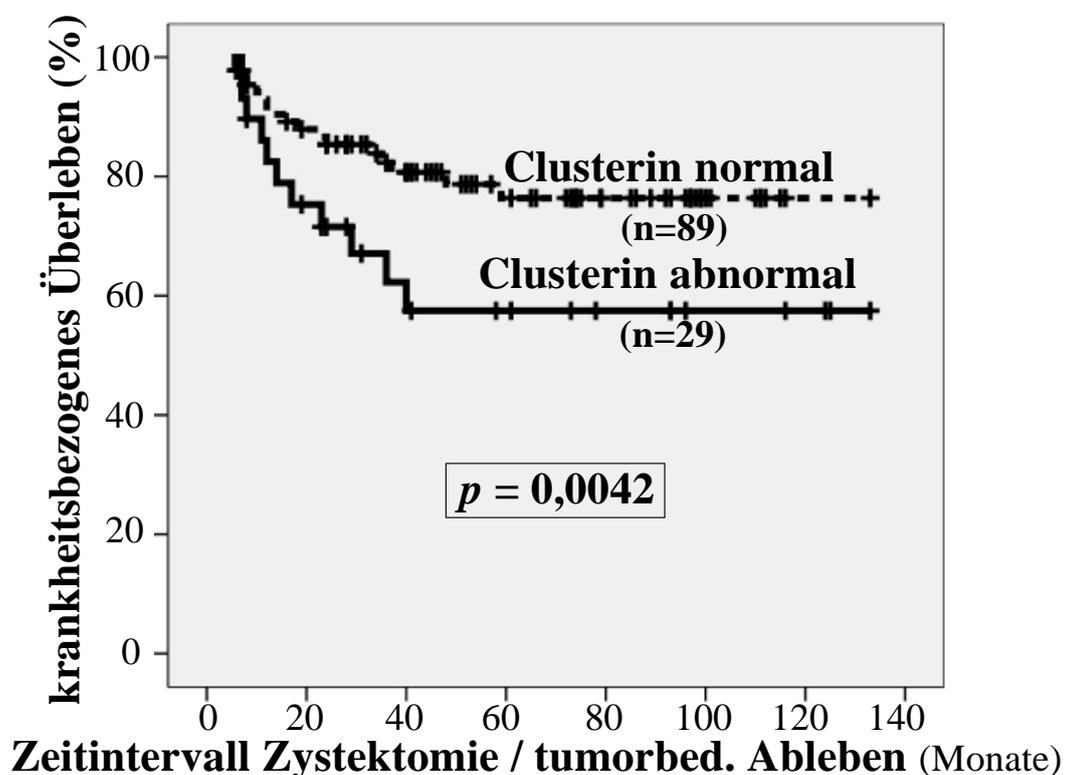


Abb. 24:

Kaplan-Meier-Überlebenskurve zum Einfluss der Clusterin-Expression auf das krankheitsbezogene Überleben von Patienten mit muskelinvasiven Harnblasenkarzinomen

3.2.7. HER2-Expression

Eine Überexpression des Wachstumsfaktorrezeptors HER2 (repräsentiert durch den immunhistochemischen Score 3+; vgl. Abb. 7) war bei 14% (9/66) der pT1-Tumoren und bei 21% (23/111) der pT \geq 2-Tumoren festzustellen und korrelierte signifikant sowohl mit einer erhöhten Rezidivneigung der pT1-Tumoren ($p = 0,028$ bzw. $p = 0,036$ nach Logrank-Test bzw. univariater Cox-Analyse; vgl. Tab. 7 und Abb. 25) als auch mit einem schlechteren krankheitsbezogenen Überleben von Patienten mit pT \geq 2-Tumoren ($p = 0,016$ bzw. $p = 0,020$; vgl. Tab. 9 und Abb. 26). Ein schwacher, nicht signifikanter Trend bestand zwischen dem HER2-Status und dem Progressionsverhalten von pT1-Tumoren ($p = 0,152$ bzw. $p = 0,165$; vgl. Tab. 8).

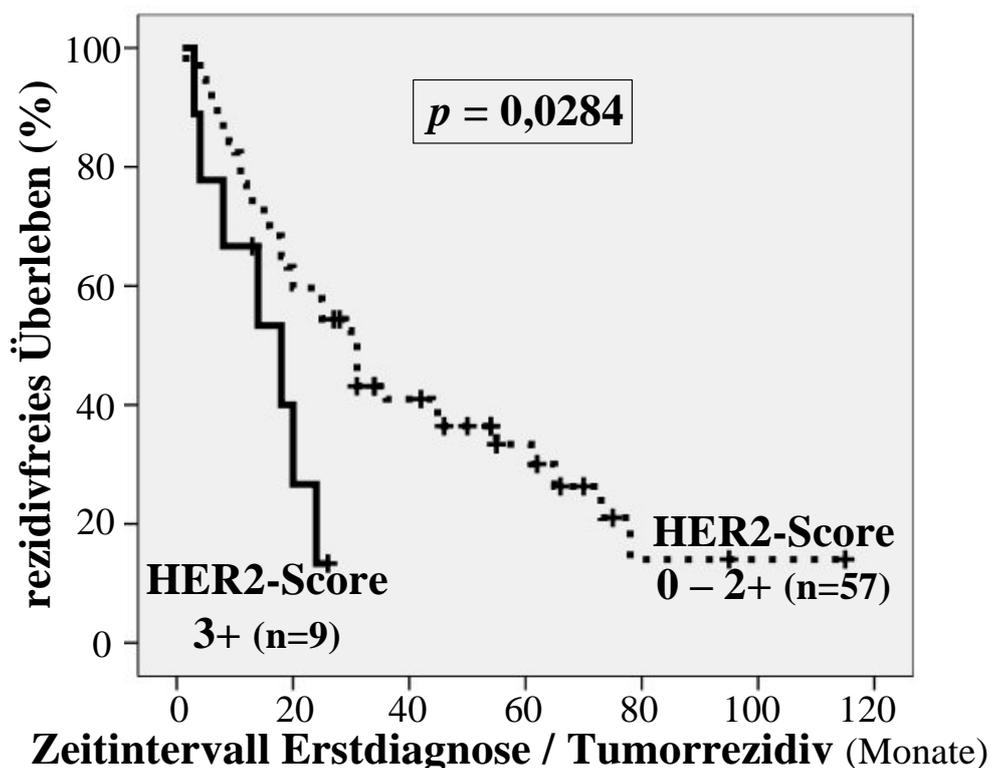


Abb. 25:

Kaplan-Meier-Überlebenskurve zum Einfluss des immunhistochemischen HER2-Status auf das rezidivfreie Überleben von Patienten mit pT1-Harnblasenkarzinomen

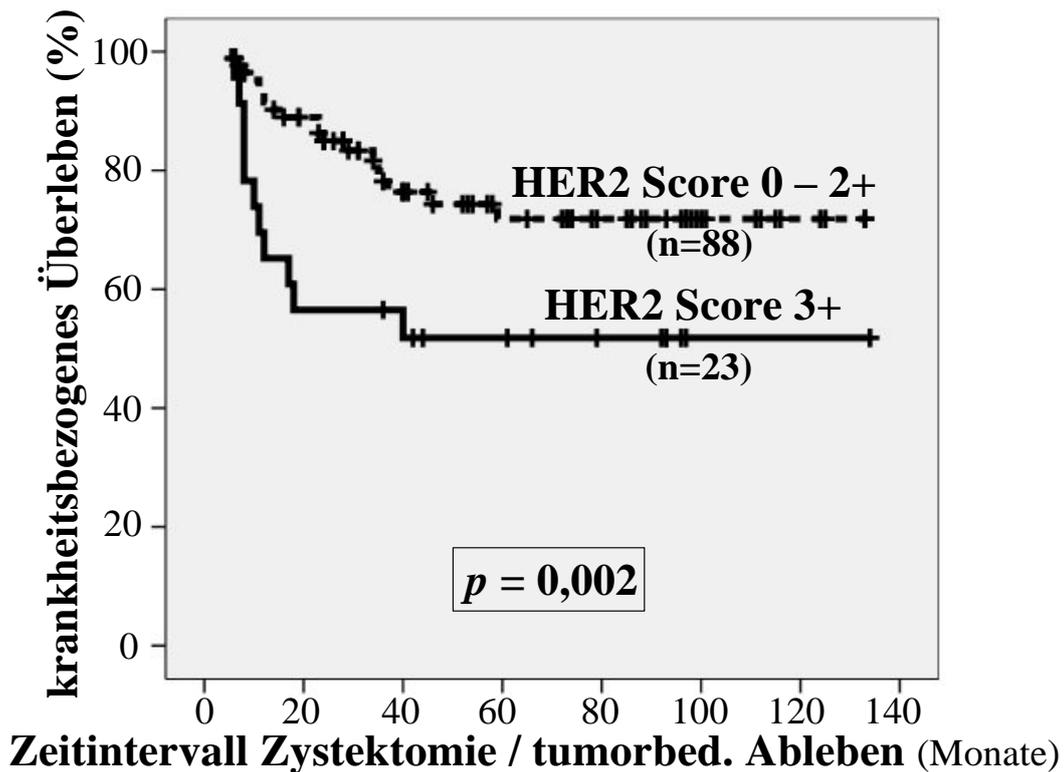


Abb. 26:

Kaplan-Meier-Überlebenskurve zum Einfluss des immunhistochemischen HER2-Status auf das krankheitsbezogene Überleben von Patienten mit muskelinvasiven Harnblasenkarzinomen

3.2.8. MDR-Expression

Der MDR-Status wurde nur bei den muskelinvasiven Harnblasenkarzinomen untersucht. Eine positive MDR-Expression (zytoplasmatische und/oder nukleäre Anfärbung in > 10% der Tumorzellen) fand sich hier in nahezu der Hälfte der Fälle (59/120, = 49%) und war tendenziell mit einem schlechteren krankheitsbezogenen Überleben assoziiert ($p = 0,085$ bzw. $p = 0,091$ nach Logrank-Test bzw. univariater Cox-Analyse; vgl. Tab. 9 und Abb. 27).

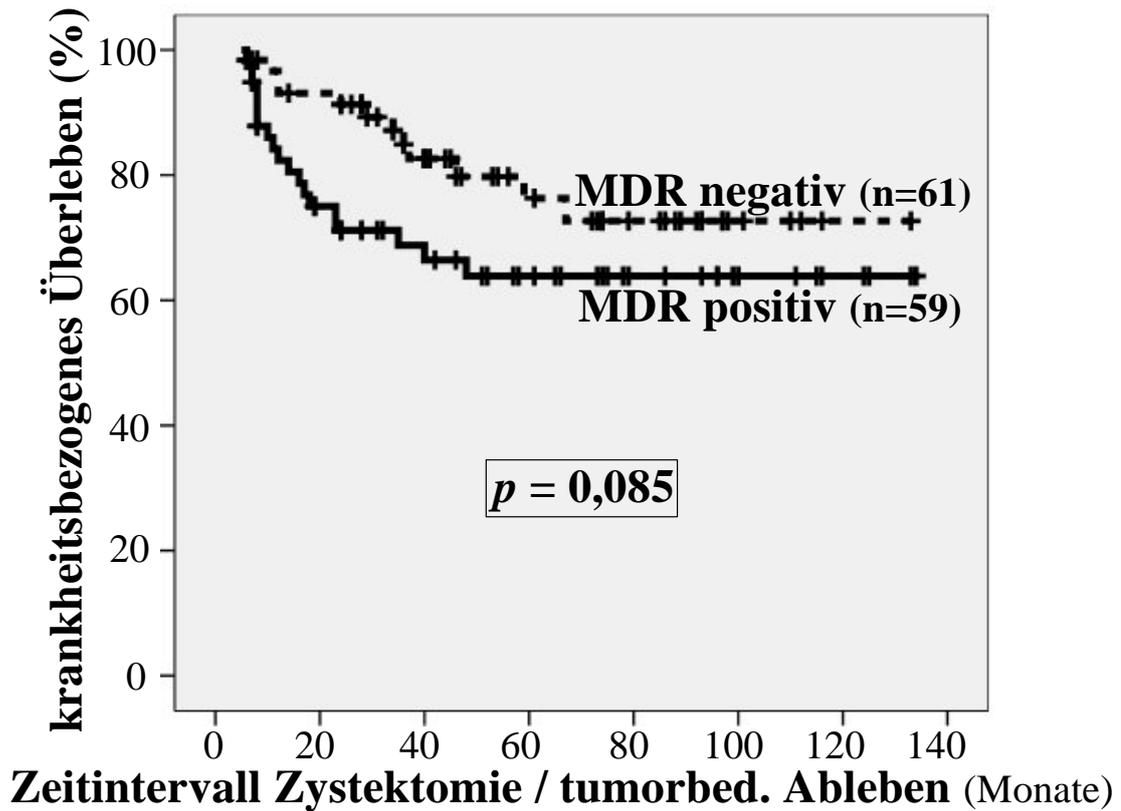


Abb. 27:

Kaplan-Meier-Überlebenskurve zum Einfluss des immunhistochemischen MDR-Status auf das krankheitsbezogene Überleben von Patienten mit muskelinvasiven Harnblasenkarzinomen

3.3. Multivariate Analyse

Die bisher untersuchte Korrelation zwischen Rezidiv-, Progressionsverhalten bzw. Überlebenszeit (unabhängige Variablen) und den allgemeinen bzw. immunhistologischen Parametern (abhängige Variablen) berücksichtigt noch nicht etwaige Zusammenhänge innerhalb der abhängigen Variablen. Um die unabhängige prognostische Bedeutung der einzelnen Parameter zu ermitteln, wurde eine multivariate Cox-Regressionsanalyse durchgeführt, in die all diejenigen Parameter eingeschleust wurden, welche im Logrank-Test mindestens eine tendenzielle Signifikanz, d. h. einen p -Wert von $<0,10$, gezeigt hatten. Es wurden jeweils für das rezidiv- und progressionsfreie Überleben von Patienten mit pT1-Tumoren sowie für das krankheitsbezogene Überleben von Patienten mit $pT \geq 2$ -Tumoren separate Multivariat-Analysen durchgeführt. Die Ergebnisse sind in nachstehenden Tabellen 12 bis 14 aufgeführt.

Tabelle 12: Multivariat-Analyse zum Einfluss verschiedener Parameter hinsichtlich der Beurteilung des Rezidivverhaltens von pT1-Harnblasenkarzinomen

Parameter	Multivariat-Analyse		
	<i>p</i>	RR	95%-KI
Substaging	0,891	1,06	0,45 - 2,49
Malignitätsgrad	0,796	1,17	0,36 - 3,75
Ki-67	0,008	2,93	1,33 - 6,46
Top-2 α	0,173	1,74	0,78 - 3,87
p53	0,014	2,66	1,22 - 5,79
E-Cadherin	0,815	1,13	0,40 - 3,19
HER2	0,287	1,99	0,56 - 1,08

Tabelle 13: Multivariat-Analyse zum Einfluss verschiedener Parameter hinsichtlich der Beurteilung des Progressionsverhaltens von pT1-Harnblasenkarzinomen

Parameter	Multivariat-Analyse		
	<i>p</i>	RR	95%-KI
Substaging	0,034	3,23	1,09 - 9,60
Top-2 α	0,049	2,96	1,01 - 8,67
p16	0,003	6,46	1,91 - 21,82

Tabelle 14: Multivariat-Analyse zum Einfluss verschiedener Parameter hinsichtlich der Beurteilung des krankheitsbezogenen Überlebens von Patienten mit pT \geq 2-Harnblasenkarzinomen

Parameter	Multivariat-Analyse		
	<i>p</i>	RR	95%-KI
Tumorstadium	0,011	4,13	1,38 - 12,39
Nodalstatus	0,0001	3,23	1,82 - 5,74
Chemoth.-Status	0,600	1,37	0,42 - 4,43
Geschlecht	0,194	2,27	0,66 - 7,81
Ki-67	0,002	9,04	2,27 - 36,06
Top-2 α	0,492	1,51	0,47 - 4,85
Clusterin	0,284	1,95	0,58 - 6,58
HER2	0,011	4,45	1,41 - 14,06
MDR	0,786	1,20	0,32 - 4,58

Wie aus den Tab. 12 - 14 ersichtlich ist, wurden als Parameter mit unabhängiger prognostischer Relevanz bei pT1-Tumoren der Ki-67- und p53-Index (hinsichtlich der Beurteilung des Rezidivverhaltens) sowie das Substaging, der Top-2 α -Index und die p16-Expression (hinsichtlich der Beurteilung des Progressionsverhaltens) identifiziert. Bei den muskelinvasiven Harnblasenkarzinomen erwiesen sich Tumorstadium, Lymphknotenstatus, Ki-67-Index und HER2-Status als unabhängige prognostische Faktoren.

3.4. Beantwortung der unter 1.6. formulierten Fragestellung

A. Bei den minimal-invasiven pT1-Harnblasenkarzinomen konnte in dieser Arbeit für den **Malignitätsgrad** eine signifikante prognostische Aussagekraft hinsichtlich des rezidivfreien, jedoch nicht hinsichtlich des progressionsfreien Überlebens bestätigt werden. Das **T1-Substaging** erwies sich sowohl für das Rezidiv- als auch für das Progressionsverhalten von T1-Tumoren in der univariaten Cox-Analyse als Parameter mit signifikanter prognostischer Aussagekraft. Letztere konnte für das Patientenalter, das Geschlecht und die Multizentrität nicht nachgewiesen werden.

Bei den muskelinvasiven pT \geq 2 Karzinomen waren das **Tumorstadium** und der **Lymphknotenstatus** diejenigen Größen, die das krankheitsbezogene Überleben entscheidend beeinflussten, ebenso auch der **Chemotherapie-Status**, der jedoch eng mit dem Lymphknotenstatus im Zusammenhang steht, sowie das **Geschlecht**. Der Malignitätsgrad besaß bei den muskelinvasiven Tumoren keine prognostische Relevanz.

Die Ergebnisse bestätigen einerseits, dass die bisher angewandten konventionellen Prognosefaktoren alleine nicht ausreichen, um sichere prognostische Aussagen zu treffen. Andererseits wird auch deutlich, dass bei der Beurteilung der prognostischen Wertigkeit einzelner Parameter das Tumorstadium mitzuberücksichtigen ist, da die Parameter je nach Stadium eine teilweise sehr unterschiedliche prognostische Wertigkeit besitzen.

B. Die Vermutung, dass bestimmte molekularbiologische Veränderungen, die während der Kanzerogenese stattfinden, in spezifischen immunhistochemischen Reaktionsmustern ihren Niederschlag finden und gleichzeitig mit der Prognose der Patienten korrelieren, konnte in vielen Fällen bestätigt werden: Bei Patienten mit pT1-Tumoren wurde mittels Logrank-Test bzw. univariater Cox-Analyse für die Marker **Ki-67**, **Top-2 α** , **p53**, **E-Cadherin** und **HER2**

eine signifikante prognostische Aussagekraft hinsichtlich der Beurteilung des Rezidivverhaltens nachgewiesen, ebenso für den Marker **p16** bezüglich der Beurteilung des Progressionsverhaltens. Bei den muskelinvasiven pT \geq 2-Tumoren wurde im Logrank-Test bzw. in der univariaten Cox-Analyse eine signifikante prognostische Wertigkeit für die Parameter **Ki-67**, **Top-2 α** , **Clusterin** und **HER2** gefunden.

C. Diejenigen Parameter, die in der univariaten Cox-Analyse einen p -Wert von $<0,10$ erzielt hatten, wurden einer multivariaten Cox-Analyse zugeführt. Die multivariate Analyse berücksichtigt etwaige Zusammenhänge, die zwischen den einzelnen untersuchten Parametern bestehen können. Parametern, die in der multivariaten Analyse einen signifikanten p -Wert von $<0,05$ erzielen, wird eine unabhängige prognostische Bedeutung zugesprochen. Letzteres war bei den pT1-Tumoren für den **Ki-67-Index** und den **p53-Index** der Fall. Diese beiden Parameter zeigten eine signifikante unabhängige prognostische Aussagekraft bezüglich der Beurteilung des Rezidivverhaltens. Bezüglich des Progressionsverhaltens kam den Parametern **T1-Substaging**, **Top-2 α** und **p16** eine signifikante unabhängige prognostische Bedeutung zu. Bei den muskelinvasiven Tumoren wurden die Faktoren **Tumorstadium**, **Lymphknotenstatus**, **Ki-67** und **HER2** als unabhängige prognostische Parameter identifiziert.

D. Die in dieser Arbeit angewendete Multitissue-Array-Technik hat sich als sehr praktikabel erwiesen. Insbesondere bei immunhistochemischen Studien mit größeren Fallzahlen ist diese Technik sehr zu empfehlen. Ihr entscheidender Vorteil liegt darin, dass mit einem einzigen Färbegang auf einem Objektträger eine große Anzahl von Gewebeschnitten gleichzeitig gefärbt werden kann und dadurch gewährleistet ist, dass jede Probe in identischer Weise jeden Schritt der Behandlungs- und Färbeprozedur durchläuft. Folglich besteht auch ein wesentlich geringerer Arbeits- und Materialaufwand. Die „Ausfallquote“, d.h. der Anteil an nicht auswertbaren Fällen, lag in der vorliegenden Arbeit bei ca. 20%, also in einer akzeptablen Größenordnung.

4. Diskussion

Das Harnblasenkarzinom stellt mit 25.950 Neuerkrankungen pro Jahr in Deutschland den vierthäufigsten malignen Tumor des Mannes und den achthäufigsten der Frau dar. Die Mehrzahl der neu diagnostizierten Tumoren – etwa 70% – wird in einem oberflächlichen Tumorstadium (pTis, pTa oder pT1) diagnostiziert. Der Verlauf der oberflächlichen Karzinome ist sehr variabel: Nach transurethraler Resektion (TUR) treten bei 70% der Erkrankten Rezidive auf, wovon wiederum 30% eine Progression in ein fortgeschrittenes Stadium oder einen höheren Malignitätsgrad erfahren (Arbeitsgemeinschaft Bevölkerungsbezogener Krebsregister in Deutschland, 2006). Welche Entwicklung ein neu diagnostizierter Tumor einmal durchlaufen wird, lässt sich zum Diagnosezeitpunkt schwer vorhersagen. Die derzeit etablierten Prognosefaktoren Tumorstadium, Lymphknotenstatus und Grading sind zur Beurteilung des Krankheitsverlaufs in vielen Fällen nicht ausreichend (Stein et al., 1998). Mit einer verbesserten Einschätzung von Tumorentwicklung und Prognose ließe sich allerdings die individuelle Therapie deutlich optimieren. Daher besteht ein großes klinisches Interesse an der Ermittlung neuer aussagekräftiger prognostischer Faktoren.

Für die in dieser Arbeit untersuchten pT1-Tumoren wurden alle Parameter in Hinblick auf ihre prognostische Wertigkeit für die Beurteilung des Rezidiv- bzw. Progressionsverhaltens untersucht. Ein Tumorrezidiv gilt aus tumorbiologischer Sicht als eine eher „kurzfristige“ Entwicklung, eine Tumorprogression als „langfristige“ Entwicklung. Diese Unterscheidung ist wichtig, da als Therapiemöglichkeiten nach einer TUR des Tumors zur weiteren Rezidivprophylaxe zum einen intravesikal applizierte Zytostatika (Doxorubicin, Mitomycin) und zum anderen der Immunmodulator BCG (Bacillus Calmette-Guérin) zur Verfügung stehen. Bei Patienten mit niedrigem Progressionsrisiko sind beide Therapieoptionen als gleichwertig anzusehen, während Patienten mit hohem Progressionsrisiko stärker von einer intravesikalen BCG-Therapie profitieren (gemäß der interdisziplinären Leitlinien der Deutschen Krebsgesellschaft und der Deutschen Gesellschaft für Urologie von 2002). Hochrisikopatienten (z.B. Patienten mit pT1,G3-Tumoren) werden gelegentlich wie Patienten mit fortgeschrittenem, muskelinvasivem Tumorstadium behandelt (Herr und Sogani, 2001) und sollten engmaschiger kontrolliert werden.

Für das zweite in dieser Arbeit untersuchte Patientenkollektiv, das an muskelinvasiven Urothelkarzinomen erkrankt war, wurde der Zusammenhang zwischen diversen, potenziell prognostisch relevanten Parametern und dem krankheitsbezogenen Überleben untersucht. Ziel war hier ebenfalls, anhand neuer Parameter differenziertere individuelle Risikoprofile zu

erstellen, die zu einer Optimierung der individuellen Therapie beitragen könnten. Neben der gewöhnlich durchgeführten Zystektomie und Lymphadenektomie galt es vor allem zu klären, welche Patienten von einer systemischen Chemotherapie profitieren und welche damit unnötig belastet bzw. „übertherapiert“ sind. In Erprobung befinden sich derzeit bei Inoperabilität oder erwünschter Organerhaltung und dennoch kurativem Ansatz die Radiotherapie sowie die Radio-/Chemotherapie, auf die an dieser Stelle jedoch nicht näher eingegangen werden soll, da für derartige Untersuchungen ein anderes Patientenkollektiv gewählt werden muss (Sökeland et al., 2004).

4.1. Etablierte Prognosefaktoren und allgemeine Parameter

4.1.1. Lymphknotenstatus (pN-Status)

Nach den Ergebnissen der hier vorgestellten Studie stellt der Lymphknotenstatus im muskelinvasiven Stadium des Harnblasenkarzinoms den prognostisch bedeutsamsten Faktor dar: Der Vergleich der Überlebensdaten der Patienten mit Lymphknotenmetastasen gegenüber denen ohne Metastasen zeigte eine hochsignifikant höhere Sterblichkeit ($p = 0,0001$ in der Univariat-Analyse) und erwies sich auch in der Multivariat-Analyse als stärkster unabhängiger prognostischer Parameter ($p = 0,0001$). Diese Einschätzung wird durch die Datenlage in der einschlägigen Literatur bestätigt. So ermittelten beispielsweise Jiminez et al. (2000a) in ihrer Studie mittels Multivariat-Analyse ebenfalls einen hochsignifikanten prognostischen Wert für den Nodalstatus ($p = 0,007$).

Der hohe prognostische Stellenwert des Nodalstatus erscheint einleuchtend, denn es ist davon auszugehen, dass bei Patienten mit positivem Lymphknotenbefall mit hoher Wahrscheinlichkeit eine Streuung von Tumorzellen jenseits des Operationsgebietes vorliegt und somit das Tumorgeschehen durch die radikale Zystektomie nicht vollständig elimiert werden kann. Dementsprechend wird solchen Patienten auch eine zusätzliche Therapie – in der Regel eine Chemotherapie – empfohlen. Im hier untersuchten Patientenkollektiv erfolgte bei allen Patienten mit positivem Lymphknotenbefall eine postoperative Chemotherapie, nicht hingegen bei nodal negativen Patienten. Die Tatsache, dass die chemotherapierten Patienten im Vergleich zu den Patienten, die keine Chemotherapie erhielten, ein signifikant schlechteres krankheitsbezogenes Überleben aufwiesen ($p = 0,009$ in der Univariat-Analyse), ist somit dadurch zu erklären, dass der Chemotherapiestatus in der vorliegenden Arbeit sehr eng mit dem Nodalstatus korreliert war.

4.1.2. Tumorstadium (pT-Status)

Die konventionelle Einteilung des Tumorstadiums gemäß der Richtlinien der UICC (vgl. Kap. 1.3.1.) repräsentiert neben dem Lymphknotenstatus einen der wichtigsten prognostischen Parameter bei muskelinvasiven Harnblasenkarzinomen. Wie bereits einleitend erläutert wurde, ist die Unterscheidung zwischen dem Stadium pT2, in dem der Tumor auf die Muscularis propria beschränkt ist, und den Stadien pT3/4, in denen der Tumor organüberschreitend das perivesikale Fettgewebe bzw. angrenzende Organe infiltriert, von erheblicher prognostischer Bedeutung, da sich die 5-Jahres-Überlebensraten hochsignifikant unterscheiden (Montie et al., 1984; Skinner und Lieskovsky, 1984; Pagano et al., 1991). Auch in der vorliegenden Arbeit zeigten Patienten mit pT3/4-Tumoren im Vergleich zu Patienten mit pT2-Tumoren eine signifikant höhere krankheitsbedingte Sterblichkeit ($p = 0,004$ in der Univariat-Analyse). In der Multivariat-Analyse erwies sich das Tumorstadium als signifikanter unabhängiger prognostischer Faktor ($p = 0,011$). Dieser Befund untermauert den bekannten hohen Stellenwert, der dem Tumorstadium bei der Einschätzung von muskelinvasiven Harnblasentumoren zukommt, und findet sich auch in Multivariat-Analysen anderer Studien bestätigt (Yurakh et al., 2006).

4.1.3. Tumorstadium-Subklassifikation (Substaging)

Das Tumorstadium pT1 wurde gemäß den von Cheng et al. (1999) formulierten Richtlinien in Unterstadien (pT1a/pT1b unterteilt), d.h. es wurde ein Substaging vorgenommen. Das von Cheng et al. ebenfalls vorgesehene Unterstadium pT1c wurde im vorliegenden Kollektiv von keinem Tumor erreicht, sodass das Augenmerk nur der Unterscheidung der beiden Unterstadien pT1a und pT1b galt (vgl. Kapitel 2.1.1.). Die pT1a-Tumoren unterschieden sich von den pT1b-Tumoren signifikant hinsichtlich des Rezidiv- und Progressionsverhaltens (p -Werte in der Univariat-Analyse: 0,048 bzw. 0,038). In der Multivariat-Analyse erwies sich das Substaging als unabhängiger prognostischer Parameter hinsichtlich der Beurteilung des progressionsfreien ($p = 0,034$), nicht jedoch hinsichtlich der Beurteilung des rezidivfreien Überlebens ($p = 0,891$). Diese Ergebnisse sind insbesondere auch deshalb beachtenswert, weil es sich bei den pT1-Tumoren um eine sehr heterogene Tumorgruppe handelt, deren Verhalten von relativ gutartig bis sehr aggressiv stark variiert. Somit stellt jedes Ergebnis, das die Einschätzung des Tumorverhaltens verbessert, eine Erkenntnis dar, die auch von unmittelbarer klinischer Relevanz sein kann.

Einschränkend muss jedoch angemerkt werden, dass zu der gewählten Methode des Substagings außer der zitierten Arbeit von Cheng et al. (1999) bislang keine weiteren

Studienergebnisse in der Literatur publiziert wurden. Von anderen Autoren wurden hingegen Vorschläge zum Substaging der pT1-Harnblasentumoren gemacht, die überwiegend auf der Infiltration der Muscularis mucosae als wesentliches Substaging-Kriterium basierten (Holmäng et al., 1997; Platz et al., 1996; Smits et al., 1998; Bernardini et al., 2001). Da die Muscularis mucosae jedoch in normaler Schleimhaut nur herdförmig nachweisbar ist und in Harnblasenschleimhautbiopsaten in einem erheblichen Prozentsatz fehlt, werden diese Substaging-Ansätze kritisch beurteilt (Jiminez et al., 2000b). Zusammenfassend muss somit bezweifelt werden, dass sich das Substaging von pT1-Tumoren als prognostisches Kriterium in der Praxis durchsetzen wird. Die Berechtigung dieser Zweifel spiegelt sich auch in der Tatsache wider, dass das pT1-Substaging in der aktuellen WHO-Klassifikation (Eble et al., 2004) keinerlei Berücksichtigung gefunden hat.

4.1.4. Histologischer Malignitätsgrad (Grading)

Der histologische Malignitätsgrad – graduiert nach den Kriterien der WHO von 1973 (Mostofi et al., 1973) – hat je nach Tumorstadium unterschiedlich starke prognostische Bedeutung: Bei nicht-invasiven und auch bei minimal-invasiven papillären Tumoren gilt er als etablierter prognostischer Faktor. Dieser Befund bestätigt sich auch in der vorliegenden Arbeit. Hier fand sich bei den pT1-Tumoren in der univariaten Analyse eine signifikante prognostische Relevanz bezüglich der Beurteilung des Rezidivverhaltens ($p = 0,006$), jedoch nicht bezüglich der Beurteilung des Progressionsverhaltens ($p = 0,307$). In der Multivariat-Analyse erlangte das Grading allerdings keine unabhängige prognostische Bedeutung. Hinsichtlich der muskelinvasiven Tumoren konnte für das Grading in der vorliegenden Arbeit ebenfalls keine prognostische Relevanz nachgewiesen werden. Dieser Befund deckt sich mit den Ergebnissen anderer Studien (Jiminez et al., 2000a; Witjes et al., 2000; Haitel et al., 2001).

Bei der Festlegung des histologischen Malignitätsgrads von Urothelkarzinomen ist mit zu berücksichtigen, dass hier teilweise erhebliche Inter- und Intraobserver-Varianzen eine Rolle spielen. So wiesen beispielsweise Witjes et al. (1994) in einer Studie nach, dass insbesondere die Abgrenzung von pT1,G2-Tumoren gegenüber den pT1,G3-Tumoren problematisch ist: Zwischen verschiedenen Pathologen wurde ein konkordantes Grading nur in 70% der Fälle erzielt.

Des Weiteren sorgen verschiedene Klassifikationssysteme für Schwierigkeiten: In dieser Arbeit musste, um eine Vergleichbarkeit herstellen zu können, von einer annähernden Kongruenz der Klassifikationen der WHO von 1973 (G1, G2, G3) und der WHO/ISUP von 1998 (PUNLMP, niedrimaligne, hochmaligne) ausgegangen werden (Oyasu, 2000).

Andere Autoren kritisieren jedoch gerade die Ungenauigkeit der Einteilung von 1973 und propagieren ein von der WHO 1999 entworfenes Klassifikationssystem, das die bisher als hochmaligne eingestuften Karzinome weiter unterteilt in hochmaligne Grad 2 (HG-2) und Grad 3 (HG-3), während niedrigmaligne Tumore als LG-1 klassifiziert werden (Bircan et al., 2004). Da dieses System bisher relativ wenig Akzeptanz erfahren hat und um Irrtümer aufgrund der ähnlichen Nomenklatur zu vermeiden, wurde in dieser Arbeit auf die weitere Unterteilung der hochmalignen Tumoren verzichtet und gemäß allgemeiner derzeitiger Empfehlungen (Lopez-Beltran et al., 2004b) die WHO-Klassifikation von 1998 verwendet.

4.1.5. Multizentrität

Die prognostische Bedeutung der Multizentrität, d.h. des synchronen Auftretens von mehreren (meist oberflächlichen) Harnblasentumoren an unterschiedlichen Lokalisationen der ableitenden Harnwege, wird in der Literatur unterschiedlich beurteilt. Einige Autoren beschreiben, dass multizentrische pTa- oder pT1-Tumoren im Vergleich zu unizentrischen Tumoren eine signifikant erhöhte Rezidivneigung aufweisen (Witjes et al., 2000; Portillo und Alken, 2002; Malavaud, 2004). In dem in der vorliegenden Arbeit untersuchten Kollektiv von pT1-Tumoren lagen in 63% der Fälle multizentrische Tumoren vor. Die univariate Analyse zeigte für die Multizentrität weder bezüglich des Rezidiv- noch bezüglich des Progressionsverhaltens ein signifikantes Ergebnis, so dass diesem Parameter anhand der eigenen Daten keine prognostische Relevanz zugeschrieben werden konnte.

4.1.6. Patientenalter

Harnblasenkrebs tritt bevorzugt im höheren Lebensalter auf, wobei der Gipfel in der siebten Lebensdekade liegt. Bei Stratifizierung der Patienten nach ihrem Altersmedian, der bei den pT1-Tumorpatienten bei 68 Jahren und bei den pT_≥2-Tumorpatienten bei 64 Jahren lag, ergab sich in der vorliegenden Arbeit kein Hinweis für eine prognostische Relevanz dieses Parameters. Die prognostische Bedeutung des Patientenalters beim Harnblasenkrebs wird in der Literatur unterschiedlich bewertet. Briggs et al. (1992) und Oosterhuis et al. (2000) berichten, dass das Patientenalter einen prognostisch relevanten Parameter bei oberflächlichen pTa- und pT1-Harnblasenkarzinomen darstellt. Dagegen konnten Sgambato et al. (2002) und Lopez-Beltran et al. (2004a) in ihren Studien keine derartige Bedeutung für diesen Parameter feststellen.

4.1.7. Geschlecht

Epidemiologische Daten zeigen, dass Männer etwa dreimal häufiger als Frauen an Urothelkarzinomen der ableitenden Harnwege erkranken. In der vorliegenden Arbeit wurde bei minimal-invasiven Tumoren kein signifikanter prognostischer Unterschied zwischen Männern und Frauen festgestellt. Dagegen zeigte sich bei den muskelinvasiven Harnblasenkarzinomen eine signifikant höhere krankheitsbezogene Mortalität bei Frauen im Vergleich zu Männern ($p = 0,038$ in der Univariat-Analyse). Allerdings erwies sich das Geschlecht in der Multivariat-Analyse nicht als signifikanter unabhängiger prognostischer Faktor. Der entsprechende p -Wert (0,194) deutet jedoch darauf hin, dass Harnblasenkarzinome bei Frauen tendenziell einen aggressiveren Verlauf zeigen als bei Männern. Diese Hypothese wird auch von Herr et al. (1997) vertreten, die bei Frauen mit pT1-Tumoren im Vergleich zu Männern über einen ungünstigeren klinischen Verlauf berichteten: Über einen Zeitraum von 15 Jahren entwickelten 63% der Frauen und 50% der Männer einen muskelinvasiven Tumor, und die Sterblichkeit lag für Frauen bei 48%, für Männer jedoch nur bei 29%. Im Gegensatz zu der vorliegenden Arbeit handelte es sich in der Studie von Herr et al. jedoch nur um Patienten mit G3-Tumoren, so dass das Risikoprofil insgesamt etwas anders gelagert war.

4.2. Immunhistochemische Parameter

In der hier vorgelegten Untersuchung an pT1- und pT \geq 2-Tumoren wurden verschiedene immunhistochemische Marker in Hinblick auf ihre prognostische Aussagekraft überprüft. Diese Parameter werden im Folgenden näher beleuchtet.

4.2.1. Ki-67-Expression

Die Ki-67-Expression in Urothelkarzinomen ist ein häufig untersuchter Proliferationsmarker (siehe Kapitel 1.5.2.). In der Literatur wird über eine prognostische Relevanz dieses Markers bei der Beurteilung des Rezidivverhaltens von oberflächlichen Harnblasenkarzinomen berichtet (Korkolopoulou et al., 1997; Oosterhuis et al., 2000; Wu et al., 2000; Sgambato et al., 2002). Wie auch in der vorliegenden Arbeit kam in den zitierten Studien der MIB1-Antikörper zum Einsatz. Die eigenen Daten belegen, dass der Ki-67-Index bei pT1-Tumoren signifikant mit dem Rezidivverhalten der Tumoren korreliert ($p = 0,030$ in der Univariat-Analyse). In dieser Hinsicht erwies sich der Ki-67-Index unter allen untersuchten Parametern sogar als stärkster unabhängiger prognostischer Faktor ($p = 0,008$ in der

Multivariat-Analyse). Diese eigenen Ergebnisse passen gut zu dem in der Literatur beschriebenen Kenntnisstand hinsichtlich der prognostischen Bedeutung der Ki-67-Expression bei Harnblasenkarzinomen insbesondere oberflächlicher Tumorstadien. Auch bei den muskelinvasiven Harnblasentumoren erwies sich der Ki-67-Index in der hier vorgelegten Arbeit sowohl in der univariaten ($p = 0.011$) als auch in der multivariaten Analyse ($p = 0,002$) als Parameter mit hoher unabhängiger prognostischer Bedeutung. Einen ähnlichen Befund beschrieben Korkolopoulou et al. (2002) und Yurakh et al. (2006). Die Ergebnisse unterstreichen die Einschätzung, dass die proliferative Aktivität von muskelinvasiven Harnblasenkarzinomen, die sich im Ki-67-Index maßgeblich widerspiegelt, einen signifikanten Einfluss auf den biologischen Verlauf der Tumoren und somit auf die Überlebensrate der betroffenen Patienten ausübt.

4.2.2. Topoisomerase 2 α -Expression

Das nukleäre Topoisomerase 2 α -Enzym (Top-2 α) repräsentiert einen Proliferationsmarker, der bei der Chromatinkondensation und bei der chromosomalen Segregation eine entscheidende Rolle spielt (siehe Kapitel 1.5.2.). In mehreren Studien, die an unterschiedlichen Tumorarten (u. a. Mammakarzinom, Ovarialkarzinom, Bronchialkarzinom, Astrozytom, Melanom) durchgeführt wurden, konnte ein Zusammenhang zwischen Top-2 α -Überexpression und einer schlechten Prognose gezeigt werden (Holden und Townsend, 1999; Costa et al., 2000; Depkowski et al., 2000; Mu et al., 2000).

Zu der prognostischen Relevanz der Top-2 α -Überexpression bei Harnblasenkarzinomen liegen bisher nur wenige Untersuchungen vor. Nakopoulou et al. (2001) beschreiben einen signifikanten Zusammenhang von hoher Top-2 α -Expression und aggressivem, prognostisch ungünstigem Tumorverhalten für Urothelkarzinome, insbesondere für oberflächliche Tumoren. Diese Aussage konnte in der vorliegenden Arbeit bestätigt werden: Bei pT1-Tumoren bestand eine signifikante Korrelation ($p = 0,003$ in der univariaten Analyse) zwischen dem Top-2 α -Index und dem Rezidivverhalten sowie ein tendenzieller Zusammenhang ($p = 0,103$) zwischen dem Top-2 α -Index und dem Progressionsverhalten. Darüber hinaus belegte die Multivariat-Analyse für den Top-2 α -Index bei der Beurteilung des progressionsfreien Überlebens von pT1-Harnblasenkarzinom-patienten sogar eine signifikante unabhängige prognostische Aussagekraft ($p = 0,049$). Für die muskelinvasiven Tumoren wurde in der Univariat-Analyse ein signifikanter Zusammenhang zwischen der Top-2 α -Überexpression und einem verkürztem krankheitsbezogenen Überleben festgestellt ($p = 0,029$), jedoch erlangte der Top-2 α -Index hier in der Multivariat-Analyse keine unabhängige prognostische Relevanz ($p = 0,492$).

Die eigenen Ergebnisse deuten darauf hin, dass der immunhistochemisch ermittelte TOP2 α -Index insbesondere bei pT1-Harnblasenkarzinomen als prognostischer Parameter nutzbar sein könnte, was in weiteren prospektiven Studien zu bestätigen ist. Ein Vergleich mit dem Ki-67-Antigen, das ebenso wie der TOP2 α -Index einen Proliferationsmarker darstellt, zeigt eine Überlegenheit des TOP2 α -Index bei der Beurteilung des Progressionsverhaltens von pT1-Tumoren sowie eine Überlegenheit des Ki-67-Index bei der Beurteilung des Rezidivverhaltens von pT1-Tumoren und bei der Prognoseabschätzung von muskelinvasiven Harnblasenkarzinomen.

4.2.3. p53-Expression

Das Tumorsuppressorgen p53 gehört zu den bei malignen Tumoren am intensivsten untersuchten Genen. In der Literatur findet sich eine große Anzahl von Studien mit teilweise sehr unterschiedlichen Ergebnissen. Mutationen bzw. Alterationen des p53-Gens zählen zu den häufigsten genetischen Veränderungen bei humanen Krebsarten (Sidransky et al., 1991). Bei Harnblasenkarzinomen treten p53-Alterationen besonders häufig in Tumoren hohen Malignitätsgrades und/oder fortgeschrittenen Tumorstadiums auf (Stein et al., 1998; Lee und Droller, 2000). Da das mutierte p53-Gen in den meisten Fällen zur Synthese eines veränderten p53-Proteins mit verlängerter Halbwertszeit führt, korreliert der immunhistochemische p53-Status eng mit dem Mutationszustand, d.h. bei Tumoren mit hohem p53-Index sind in der Regel Mutationen des p53-Gens zu erwarten. Somit stellt der immunhistochemische p53-Index einen potenziell prognostisch relevanten Marker dar.

Die Daten der vorliegenden Arbeit bestätigen diese Annahme weitgehend. Es zeigte sich zunächst, dass muskelinvasive Tumoren (medianer p53-Index: 24%) in der Regel höhere p53-Indizes aufwiesen als minimal-invasive Tumoren (medianer Index: 10%). Hinsichtlich seiner prognostischen Wertigkeit zeigte der p53-Index einen signifikanten Zusammenhang mit dem Rezidivverhalten der pT1-Tumoren ($p = 0,047$ im Logrank-Test), nicht jedoch mit deren Progressionsverhalten ($p = 0,260$). In der Multivariat-Analyse kam dem p53-Index eine signifikante unabhängige prognostische Bedeutung bei der Abschätzung des Rezidivverhaltens von pT1-Tumoren zu ($p = 0,014$). Ähnliche Ergebnisse schildern Sarkis et al. (1993), Kilicli-Camur et al. (2002), Zhang et al. (2003) und Saint et al. (2004). Bei den muskelinvasiven Tumoren korrelierte der p53-Index nicht signifikant mit dem krankheitsbezogenen Überleben ($p = 0,183$), was auch durch die Studienergebnisse von Siu et al. (1998) sowie Jahnson und Karlsson (1998) Bestätigung findet. Die Angaben in der Literatur zur prognostischen Bedeutung der p53-Expression bei Harnblasentumoren sind

insgesamt recht heterogen und die Studienergebnisse teilweise widersprüchlich. Für diese Diskrepanzen dürften vor allem Unterschiede im allgemeinen Studiendesign, in der immunhistochemischen Färbung und in der Auswertung verantwortlich sein. Nach den Aussagen von Siu et al. (1998) eignet sich der in der vorliegenden Arbeit verwendete, monoklonale Antikörper PAB1801 gut zur Beurteilung des klinischen Verlaufs von Harnblasentumoren. Schmitz-Dräger et al. (2000b) fassten in einer Metaanalyse 138 Publikationen zusammen, die die Assoziation von p53 und Prognose beim Harnblasenkrebs behandelten, und stellten dabei fest, dass erhebliche Differenzen bei den publizierten Resultaten existieren. Sie forderten eine detaillierte Standardisierung der immunhistochemischen Analyse der p53-Expression und die Durchführung einer Multicenter-Studie zu diesem Thema.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass eine endgültige Aussage über die prognostische Wertigkeit der p53-Expression trotz der großen Anzahl an Studien derzeit noch nicht möglich ist und ein prognostisches Potenzial für diesen Parameter nach eigener Studienlage zwar wahrscheinlich ist, jedoch weder sicher belegt noch ausgeschlossen werden kann.

4.2.4. p16-Expression

Das p16-Protein gilt als so genanntes Tumorsuppressorprotein, welches durch seine hemmende Funktion auf verschiedene cyclin-abhängige Kinasen während des Zellzyklus eine wichtige Kontrollfunktion ausübt (siehe Kapitel 1.5.4.). Seine Inaktivierung stellt ein wichtiges und bei der Entstehung von Harnblasenkarzinomen sehr häufiges Ereignis dar (Williamson et al., 1995; Reznikoff et al., 2000; Baithun et al., 2001), das sich oft bereits in der Frühphase der Karzinogenese nachweisen lässt (Friedrich et al., 2001). In dem hier untersuchten Patientenkollektiv minimal-invasiver Tumoren zeigte der immunhistochemische p16-Status einen signifikanten Zusammenhang mit dem Progressionsverhalten (univariate Analyse: $p = 0,012$), jedoch nicht mit dem Rezidivverhalten ($p = 0,334$). In der Multivariat-Analyse erwies sich die p16-Expression hinsichtlich der Beurteilung des progressionsfreien Überlebens als unabhängiger prognostischer Faktor, dem unter allen untersuchten Parametern sogar die höchste Signifikanz zufiel ($p = 0,003$). Hitchings et al. (2004) und Shariat et al. (2004) kamen in vergleichbaren Studien zu ähnlichen Ergebnissen, wodurch die hohe prognostische Aussagekraft der p16-Expression bei oberflächlichen Harnblasenkarzinomen bestätigt wird. Die Untersuchung der muskelinvasiven Tumoren zeigte allerdings keinen signifikanten Zusammenhang zwischen dem immunhistochemischen p16-Status und dem krankheitsbezogenen Überleben ($p = 0,852$). Dieser

Befund steht in Einklang mit einer Aussage von Niehans et al. (1999), die ebenfalls die p16-Expression als ungeeignet für die prognostische Beurteilung muskelinvasiver Harnblasentumoren bezeichneten.

Die Datenlage über die p16-Expression bei Harnblasenkarzinomen ist insgesamt recht uneinheitlich. Bei genauer Betrachtung weisen die Studien erhebliche Unterschiede im Studiendesign auf. Wiederholt wurden auch Kombinationen mehrerer Zellzyklusproteine (z.B. p16 und Rb, p53, p27, p21, Cyclin D1) untersucht. Weiterhin existieren in den publizierten Studien z.T. erhebliche Unterschiede hinsichtlich der immunhistologischen Färbetechnik und der Evaluationskriterien (Korkolopoulou et al., 2001; Yang et al., 2002; Hitchings et al., 2004; Mhaweck et al., 2004; Shariat et al., 2004). Richtlinien zu einem immunhistologischen Standardverfahren könnten dieses Problem teilweise lösen, sie existieren jedoch derzeit für die immunhistochemische p16-Analyse nicht.

4.2.5. E-Cadherin-Expression

Ein Verlust und eine herabgesetzte Expression von E-Cadherin, einem zellulären Adhäsionsmolekül, sind bei einer Vielzahl von invasiv wachsenden malignen Tumoren bekannt. Hinsichtlich seiner Funktion wird vermutet, dass E-Cadherin die Rolle eines „Tumorinvasions-Suppressor-Moleküls“ ausübt (Frixen et al., 1991). In der vorliegenden Arbeit konnte für 58% der pT1-Karzinome und für 46% der muskelinvasiven Tumoren ein E-Cadherin-Verlust gezeigt werden. Innerhalb der pT1-Tumoren bestand ebenfalls eine Korrelation zwischen dem E-Cadherin-Verlust und dem Unterstadium (pT1a/pT1b). Somit untermauern die eigenen Daten den bekannten, engen Zusammenhang zwischen E-Cadherin-Verlust und Tumordinfiltrationstiefe (Sun und Herrera, 2002). Welche molekularen Mechanismen für den E-Cadherin-Verlust verantwortlich sind, ist bisher relativ unklar. Bringuier et al. (1999) beschreiben bei Harnblasenkarzinomzellen eine allgemeine Herabregulation des E-Cadherin-mRNA-Gehalts.

Hinsichtlich der prognostischen Wertigkeit des E-Cadherin-Verlusts existieren in der Literatur sehr unterschiedliche Angaben. Während Bringuier et al. (1993), Otto et al. (1997) und Garcia del Muro et al. (2000) eine signifikante prognostische Aussagekraft des immunhistochemischen E-Cadherin-Status für alle Tumorstadien beschreiben, widersprechen Hong et al. (1995) und Rao et al. (2002) dieser Aussage. Aufgrund des nachgewiesenen Zusammenhangs von E-Cadherin-Verlust und Infiltrationstiefe erscheint jedoch eine differenzierte Betrachtung der einzelnen Tumorstadien angezeigt. In der vorliegenden Arbeit wurde ein signifikanter Zusammenhang zwischen E-Cadherin-Verlust und

rezidivfreiem Überleben von pT1-Harnblasenkarzinompatienten ermittelt ($p = 0,004$ in der Univariat-Analyse). In der Multivariat-Analyse erreichte dieser Parameter jedoch nicht das Signifikanzniveau. Mit dem Progressionsverhalten von pT1-Tumoren bestand ebenso wie mit dem krankheitsbezogenen Überleben von muskelinvasiven Tumoren kein signifikanter Zusammenhang in der Univariat-Analyse. Die Korrelation zwischen dem immunhistochemischen E-Cadherin-Status und dem Rezidivverhalten von oberflächlichen Harnblasenkarzinomen wird durch Studienergebnisse von Zhang et al. (2003) und Zhu et al. (2003) bestätigt. Bei muskelinvasiven Harnblasenkarzinomen schreiben Nakopoulou et al. (2000), Byrne et al. (2001) und Slaton et al. (2004) dem E-Cadherin-Status ebenfalls eine signifikante oder tendenzielle prognostische Bedeutung zu, während Lipponen und Eskelinen (1995) – ähnlich wie die hier vorgestellte Arbeit – für diesen Parameter keine prognostische Signifikanz nachweisen konnten.

Zusammenfassend ist festzustellen, dass der immunhistochemische E-Cadherin-Status einen wichtigen prognostischen Parameter insbesondere bei minimal-invasiven Harnblasenkarzinomen darstellt. Die exakte prognostische Bedeutung des E-Cadherin-Verlusts sollte in prospektiven Studien weiter geklärt werden.

4.2.6. Clusterin-Expression

Die vielfältigen biologischen Funktionen von Clusterins (siehe Kapitel 1.5.6.) und insbesondere sein möglicher Einfluss auf die Apoptose (Wu et al., 2002) machen Clusterin zu einem Marker, der möglicherweise Hinweise auf das biologische Verhalten von malignen Tumoren liefern könnte. So berichten Redondo et al. (2000) und Steinberg et al. (1997) über eine immunhistochemisch nachweisbare Clusterinreaktivität in Mamma- und Prostatakarzinomen, bei gleichzeitiger negativer Reaktivität im Normalgewebe. Weiterhin konnte an Prostatakarzinomen eine Korrelation zwischen Clusterinexpression einerseits sowie aggressivem Tumorverhalten und höherem Grading andererseits ermittelt werden (Steinberg et al., 1997). Darüber hinaus wurde bei Mammakarzinomen über eine inverse Korrelation zwischen Clusterinexpression und Apoptoseindex berichtet (Redondo et al., 2000). Mittlerweile ist bekannt, dass Clusterin sowohl zytoprotektive als auch zytotoxische Eigenschaften besitzt (Criswell et al., 2003; Chen et al., 2004). Clusterin kommt in zwei Isoformen vor, wobei die eine im Zytoplasma lokalisiert ist und vermutlich zytoprotektive Eigenschaften besitzt, während die andere nukleär vorzufinden ist und zytotoxisch wirkt (Criswell et al., 2003). Im eigenen Untersuchungsgut wurde ausschließlich eine zytoplasmatische Clusterinexpression beobachtet, so dass davon auszugehen ist, dass in den Harnblasentumoren ausschließlich die zytoprotektive Isoform exprimiert wird.

In der vorliegenden Arbeit wurden sowohl minimal-invasive als auch muskelinvasive Tumoren hinsichtlich einer möglichen Korrelation von immunhistochemischem Clusterin-Status und klinischem Verlauf untersucht. Für die pT1-Tumoren zeigte sich hierbei kein signifikanter Zusammenhang. Bei den muskelinvasiven Tumoren bestand hingegen insofern eine signifikante Assoziation, als dass Patienten mit Clusterin-exprimierenden Tumoren eine signifikant höhere Sterblichkeit aufwiesen ($p = 0,048$ in der Univariat-Analyse). In der Multivariat-Analyse verfehlte die Clusterinexpression allerdings mit einem p -Wert von 0,284 das geforderte Signifikanzniveau, sodass diesem Parameter keine unabhängige prognostische Bedeutung zukam.

In der Literatur finden sich bislang keine Vergleichsdaten bezüglich immunhistochemischer Studien an Harnblasentumoren. Miyake et al. (2002) berichten allerdings beim Harnblasenkarzinom über eine signifikante Korrelation zwischen gesteigerter Clusterin-mRNA-Expression und erhöhter tumorbedingter Sterblichkeit. Sie propagieren weiterhin einen positiven therapeutischen Effekt einer Kombinationsbehandlung, in der neben dem Zytostatikum Gemcitabin (einem Pyrimidin-Analogon) zusätzlich so genannte Clusterin-Antisense-Oligonukleotide eingesetzt werden (Miyake et al., 2001). Hierbei lagern sich die Antisense-Oligonukleotide direkt an das Clustering an, wodurch dessen Expression gehemmt und mutmaßlich die zytotoxische Wirkung des Gemcitabins gesteigert wird. Auch Versuche, Clusterin-Antisense-Oligonukleotide mit Adenovirus-vermitteltem p53-Gentransfer zu kombinieren, scheinen neue Therapieoptionen darzustellen, die, insbesondere in Kombination mit Chemotherapie die Prognose verbessern könnten (Miyake et al., 2005).

Zusammenfassend scheint Clusterin einen Einfluss auf das biologische Verhalten von Harnblasenkarzinomen fortgeschritteneren Tumorstadiums auszuüben. Dieser Parameter kann daher als zusätzlicher prognostischer Indikator angesehen werden. Inwieweit der Einsatz von Clusterin-Antisense-Oligonukleotiden in Kombination mit Gemcitabin oder p53-Gentransfer einen therapeutischen Vorteil bringt, muss in klinischen Studien geklärt werden.

4.2.7. HER 2-Expression

Seit längerer Zeit ist bekannt, dass Mammakarzinomzellen in einem hohen Prozentsatz der Fälle den HER2-Rezeptor überexprimieren und damit einen Wachstumsstimulus erfahren (Slamon et al., 1989). Hier existiert mit dem gegen das HER2-Rezeptormolekül gerichteten monoklonalen Antikörper Trastuzumab (Herceptin®) auch ein therapeutisches Agens, mit dem ein lebensverlängernder Effekt bei Patientinnen mit metastasiertem Mammakarzinom erreicht werden kann (Pegram et al., 2000).

Auch beim Harnblasenkarzinom untersuchten zahlreiche Autoren die HER2-Expression (McCann et al., 1990; Zhau et al., 1990; Moriyama et al., 1991; Wood et al., 1991; Wright et al., 1991; Lipponen et al., 1991; Sato et al., 1992; Coombs et al., 1993; Fossa et al., 1993; Sauter et al., 1993; Gorgoulis et al., 1995; Underwood et al., 1995; Mellon et al., 1996; Ravery et al., 1997; Korkolopoulou et al., 1997; Vollmer et al., 1998; Ioachim et al., 2000; Jiminez et al., 2001; Krüger et al. 2002). In diesen Studien wurde berichtet, dass Harnblasenkarzinome in einem recht unterschiedlichen Prozentsatz – zwischen 2% (McCann et al., 1990) und 74% (Zhau et al., 1990) – den HER2-Rezeptor überexprimieren. Die Gründe für diese teilweise erheblich diskrepanten Prozentangaben dürften in Unterschieden hinsichtlich des Studiendesigns, der Färbetechnik, der verwendeten Antikörper sowie der immunhistochemischen Evaluationsmethoden liegen. In der vorliegenden Arbeit wurde die Auswertung mittels des standardisierten HercepTests® vorgenommen (vgl. Kapitel 2.2.), um derartige Probleme bei der Reproduzierbarkeit zu vermeiden.

Bei der Untersuchung der pT1-Tumoren ergab sich ein signifikanter Zusammenhang zwischen dem immunhistochemischen HER2-Status und dem Rezidivverhalten ($p = 0,028$ in der Univariat-Analyse), jedoch nicht zwischen dem HER2-Status und dem Progressionsverhalten ($p = 0,152$). In der Multivariat-Analyse konnte keine unabhängige prognostische Bedeutung für diesen Marker nachgewiesen werden. Einschränkend muss jedoch erwähnt werden, dass bei den pT1-Tumoren die Gruppe der HER2-überexprimierenden Tumoren mit nur 9 Fällen (gegenüber 66 HER2-negativen/normalen Fällen) recht klein und die Gruppenstärken daher insgesamt sehr unausgewogen waren. Im Zusammenhang mit dem HER2-Status richtete sich das Hauptaugenmerk auf die muskelinvasiven Tumoren, da eine HER2-Überexpression hier bekanntermaßen besonders häufig auftritt und mit dem Einsatz von Herceptin® insbesondere für diese Tumoren eine mögliche therapeutische Option zur Verfügung steht. Mittels des HercepTests® konnte in der vorliegenden Arbeit bei 23% der muskelinvasiven Harnblasenkarzinome eine HER2-Überexpression (entsprechend dem HER2-Score 3+) festgestellt werden. In der Univariat-Analyse ergab sich eine signifikante Korrelation zwischen HER2-Score und reduziertem krankheitsbezogenen Überleben ($p = 0,02$ in der Univariat-Analyse). Indem sich dieses Ergebnis in der Multivariat-Analyse bestätigte ($p = 0,011$), erwies sich der immunhistochemische HER2-Status hier als Parameter von unabhängiger prognostischer Bedeutung.

Bezüglich der prognostischen Relevanz des HER2-Status finden sich kaum Vergleichsstudien an muskelinvasiven Harnblasenkarzinomen, in denen ebenfalls der standardisierte HercepTest® eingesetzt wurde. Es existiert lediglich eine einzige Studie von

Jiminez et al. (2001), in der über eine nicht signifikante, aber tendenzielle prognostische Relevanz des HER2-Status berichtet wurde. Allerdings war die Fallzahl in dieser Studie mit 93 Patienten im Vergleich zur vorliegenden Arbeit deutlich geringer. Zur Bestätigung unserer Ergebnisse hinsichtlich der prognostischen Bedeutung des HER2-Status in muskelinvasiven Harnblasenkarzinomen ist die Durchführung weiterer, prospektiver Studien zu empfehlen.

4.2.8. MDR-Expression

Das „Multidrug-Resistenz-Phänomen“ ist bereits seit mehreren Jahren bekannt und in zahlreichen Studien an unterschiedlichen malignen Tumorentitäten intensiv studiert worden. Neben dem in dieser Arbeit untersuchten P170-Protein gibt es zahlreiche andere Proteine, die dieses Phänomen verursachen können. Dazu zählen beispielsweise das „breast cancer related protein“ (BCRP), das „multidrug resistance protein 1“ (MRP1) und das „lung resistance related protein“ (LRP). Bei der Einschätzung der Ergebnisse dieser Arbeit muss daher bedacht werden, dass es sich um ein relativ komplexes Phänomen handelt, von dem nur ein einzelner Parameter betrachtet wurde. Da P170 durch seine Eigenschaft, eingebrachte Zytostatika aus den Tumorzellen herauszuschleusen, den Tumoren eine Resistenz gegenüber Chemotherapeutika verleihen kann und eine Chemotherapie hauptsächlich für Harnblasenkarzinome im fortgeschrittenen Tumorstadium relevant ist, wurde der MDR-Status in der vorliegenden Arbeit nur bei muskelinvasiven Tumoren analysiert.

In dem hier untersuchten Patientenkollektiv wies etwa die Hälfte der Tumoren einen positiven immunhistochemischen MDR-Status auf. Bezogen auf die tumorbedingte Überlebensrate zeigten Patienten mit positivem MDR-Status eine tendenziell schlechtere Prognose ($p = 0,091$ in der Univariat-Analyse). In der Multivariat-Analyse konnte keine unabhängige prognostische Bedeutung für den MDR-Status ermittelt werden. Bei ausschließlicher Betrachtung der Untergruppe der 30 Patienten, die eine Chemotherapie erhalten hatten, zeigte sich ebenfalls keine signifikante Korrelation zwischen dem MDR-Status und dem krankheitsbezogenen Überleben ($p = 0,536$ in der Univariat-Analyse; Daten nicht gesondert dargestellt). Aufgrund der geringen Gruppenstärke muss allerdings offen bleiben, ob bei einer höheren Fallzahl eine signifikante prognostische Aussagekraft des MDR-Status deutlich geworden wäre.

Bezüglich der immunhistochemischen MDR-Expression von Harnblasenkarzinomen existieren in der Literatur vielfältige Vergleichsangaben. Nakagawa et al. (1997) und Yasuhiro et al. (2000) beschreiben für Harnblasentumoren eine gesteigerte MDR-Expression nach

Chemotherapie, die eine inverse Korrelation zu dem Grad der Methylierung an der Promotorregion des Gens aufwies (Yasuhiro et al., 2000). Die Frage, inwieweit der MDR-Status vor Chemotherapie das Ansprechen auf die Therapie und den klinischen Verlauf beeinflusst, wird recht unterschiedlich bewertet: So berichten Zhu et al. (2003) bei pT1,G3-Tumoren über einen signifikanten Zusammenhang zwischen dem MDR-Status und dem Rezidivverhalten der Tumoren. Diestra et al. (2003) gehen von einer potenziellen prognostischen Bedeutung des MDR-Status aus, während Sandlow et al. (1994), Park et al. (1994), Nakagawa et al. (1997) und Siu et al. (1998) in ihren Studien keine Korrelation zwischen dem MDR-Status und der Prognose finden konnten.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass die immunhistochemisch nachweisbare MDR-Expression einen Parameter mit potenzieller prognostischer Aussagekraft bei muskelinvasiven Harnblasenkarzinomen darstellt. Die exakte prognostische Signifikanz dieses Parameters sollte in weiteren, prospektiven Studien näher validiert werden.

4.3. Limitationen dieser Arbeit

In dieser Arbeit wurden so genannte Multitissue-Arrays (Biochips®) verwendet, die die gleichzeitige Färbung einer Vielzahl von Gewebeproben auf einem einzigen Objektträger in einem Färbegang ermöglichen. Dadurch wird gewährleistet, dass jede Gewebeprobe in identischer Weise gefärbt wird und Unterschiede in den einzelnen Behandlungsschritten der Färbeprozedur ausgeschlossen werden. Gleichzeitig ermöglichen Multitissue-Arrays eine Minimierung von Arbeits- und Materialaufwand. Wie in einer groß angelegten Studie nachgewiesen werden konnte, beeinflusst die kleine Ausschnittsgröße, die von jedem Tumor auf dem Array vorhanden ist (in der Regel maximal 4 mm²), das immunhistochemische Färbeargebnis nicht wesentlich (Nocito et al., 2001).

Einschränkend muss nach den in der vorliegenden Arbeit gewonnenen Erkenntnissen angemerkt werden, dass insbesondere durch das Ablösen einzelner Tumorchips vom Array und durch eine teilweise zu geringe Anzahl von repräsentativen Tumorzellen auf einzelnen Chips nicht immer die Maximalzahl der auf dem Array vorhandenen Tumorgewebsproben ausgewertet werden konnte. Im Durchschnitt lag der Anteil der auswertbaren Fälle bei etwa 80%. Trotz dieser Verlustrate ist die Multitissue-Array-Technik für die immunhistochemische Untersuchung größerer Tumorserien grundsätzlich gut geeignet. Angesichts der hohen Fallzahl, die dieser Arbeit zugrunde liegt (insgesamt 205 Patienten), beeinträchtigte die Verlustrate (20%) die statistische Aussagekraft insgesamt nicht wesentlich.

Ein weiterer kritischer Aspekt, der bei der Planung und Bewertung von immunhistochemischen Studien bedacht werden muss, ist das häufige Fehlen von Standards für die jeweiligen Färbetechniken und für die immunhistochemische Auswertung. HER2 ist der einzige hier untersuchte Parameter, für den mit dem HercepTest® ein derartiger Standard existiert. Bei allen anderen Markern wurde auf in der Literatur beschriebene Empfehlungen und Erfahrungen zurückgegriffen, wobei die einzelnen Berichte teilweise erhebliche Unterschiede aufwiesen.

Die Auswahl der immunhistochemischen Parameter, die für diese Arbeit getroffen wurde, basierte auf der bis 2002 in der Literatur publizierten Datenlage. Die ausgewählten Parameter stellen somit einen repräsentativen Ausschnitt aus der üppigen Palette immunhistochemischer Parameter dar, über die bislang von einer potenziellen prognostischen Relevanz bei Harnblasentumoren berichtet wurde. Naturgemäß konnte hier nur eine Auswahl getroffen werden. Da bei der Kanzerogenese und Tumorprogression des Harnblasenkrebses vielfältige molekulare Mechanismen eine Rolle spielen, ist davon auszugehen, dass sich in der hier getroffenen Auswahl an immunhistochemischen Parametern längst nicht alle dieser molekularen Mechanismen widerspiegeln. Es ist davon auszugehen, dass in den nächsten Jahren noch zahlreiche weitere Faktoren identifiziert werden, die eine prognostische Aussagekraft bei invasiven Urothelkarzinomen der Harnblase besitzen. Nichtsdestoweniger erfasst die vorliegende Arbeit mit der getroffenen Parameterauswahl ein relativ großes Spektrum an prognostischen Faktoren und untersucht darüber hinaus deren jeweilige Unabhängigkeit mittels der Multivariat-Analyse.

4.4. Ausblick

Die Immunhistochemie hat in den letzten Jahren eine große Weiterentwicklung erfahren. In der Pathologie spielt sie heutzutage nicht nur in der Forschung, sondern gerade auch in der Routinediagnostik eine sehr wichtige Rolle. Durch die fortwährende Entwicklung neuer Antikörpern nimmt der Stellenwert der Immunhistochemie in diagnostischen Laboratorien ständig zu. Insbesondere im Bereich der Tumorpathologie werden mit Hilfe der Immunhistochemie immer wieder neue Erkenntnisse zu Tumorbiologie und Kanzerogenese gewonnen.

Durch die ständige Erweiterung unseres Kenntnisstandes hinsichtlich der molekularen Veränderungen in malignen Tumoren eröffnen sich auch neue therapeutische Chancen. So steht beispielsweise für Mammakarzinome, die den HER2-Rezeptor überexprimieren, mit einem gegen das Rezeptormolekül gerichteten monoklonalen Antikörper namens

Trastuzumab (Herceptin®) seit einigen Jahren ein neues therapeutisches Agens zur Verfügung (Pegram et al., 2000). Auch durch die Antisense-Gentherapie eröffnen sich neue therapeutische Möglichkeiten. So wurde beispielsweise beim Nierenzellkarzinom berichtet, dass die Effizienz einer zytostatischen Therapie durch die Applikation von bcl-2-Antisense-Oligonukleotiden gesteigert werden kann (Kausch et al., 2005).

Obwohl bei diesem komplexen Thema noch viele Fragen ungeklärt sind, gibt es immer mehr immunhistochemische Parameter, die eine klinische bzw. prognostische Relevanz aufweisen und daher Eingang in den diagnostischen Praxisalltag gefunden haben oder noch finden werden. Es ist davon auszugehen, dass in dieser Hinsicht der Stellenwert der Immunhistochemie in den kommenden Jahren noch weiter zunehmen wird.

5. Zusammenfassung

Der Harnblasenkrebs stellt in Deutschland die vierthäufigste Krebsart des Mannes und die achthäufigste der Frau dar. Die wenigen etablierten Prognosefaktoren erlauben in vielen Fällen keine genaue Einschätzung des klinischen Verlaufs von invasiven Harnblasentumoren. Ziel der hier beschriebenen, retrospektiven Studie war es, den prognostischen Stellenwert von insgesamt acht immunhistochemischen Parametern bei minimal-invasiven (pT1) und muskelinvasiven (pT \geq 2) Urothelkarzinomen zu ermitteln und mit dem Stellenwert von etablierten Prognosefaktoren (Tumorstadium, Lymphknotenstatus, Malignitätsgrad) und konventionellen Parametern mit potenzieller prognostischer Bedeutung (Substaging von pT1-Tumoren, Alter, Geschlecht, Chemotherapiestatus) zu vergleichen.

Das Patientenkollektiv umfasste insgesamt 205 Harnblasenkarzinompatienten mit bekanntem Follow-up, darunter befanden sich 73 mit einem transurethral resezierten pT1- und 132 mit einem durch radikale Zystektomie behandelten pT \geq 2-Tumor. In der letztgenannten Gruppe erhielten 30 Patienten zusätzlich eine Chemotherapie. Als Verlaufparameter dienten bei pT1-Tumoren das rezidiv- und progressionsfreie Überleben sowie bei pT \geq 2-Tumoren das krankheitsbezogene Überleben. Multitissue-Arrays, auf denen 2x2 mm große Ausschnitte von Paraffinschnitten der Tumoren fixiert waren, wurden nach einem immunhistochemischen Standardverfahren unter Verwendung von Antikörpern gegen die proliferationsassoziierten Proteine Ki-67 und Topoisomerase-2 α , die Tumorsuppressorproteine p53 und p16, das Adhäsionsmolekül E-Cadherin, das „Anti-Apoptoseprotein“ Clusterin, das Onkoprotein HER2 sowie das Transportprotein MDR gefärbt. Von den beiden erstgenannten Parametern wurde bei allen Tumoren der Index, d.h. der Anteil positiv gefärbter Tumorzellen, ausgezählt und das Kollektiv anhand des medianen Indexwertes in zwei gleich große Gruppen stratifiziert. Die anderen sechs Parameter wurden in semiquantitativer Weise (positiv vs. negativ) ausgewertet.

Die statistische Analyse zeigte bei den pT1-Tumoren im Logrank-Test eine signifikante Korrelation mit dem rezidivfreien Überleben für die Faktoren Malignitätsgrad ($p = 0,004$), Substaging ($p = 0,042$), Ki-67 ($p = 0,030$), Top-2 α ($p = 0,002$), p53 ($p = 0,047$), E-Cadherin ($p = 0,004$) und HER2 ($p = 0,028$) sowie eine signifikante Korrelation mit dem progressionsfreien Überleben für das Substaging ($p = 0,031$) und p16 ($p = 0,012$). Für den Top-2 α -Index bestand ein tendenzieller Zusammenhang mit dem progressionsfreien Überleben ($p = 0,089$). Bei den muskelinvasiven Tumoren zeigten die Parameter Tumorstadium ($p = 0,002$), Lymphknotenstatus ($p = 0,0001$), Geschlecht ($p = 0,033$), Chemotherapiestatus ($p = 0,006$), Ki-67 ($p = 0,008$), Top2 α ($p = 0,023$), Clusterin ($p = 0,042$) und

HER2 ($p = 0,016$) einen signifikanten Zusammenhang und MDR ($p = 0,085$) einen tendenziellen Zusammenhang mit dem krankheitsbezogenen Überleben.

In der multivariaten Cox-Regressionsanalyse wurden alle Parameter, die im Logrank-Test eine signifikante oder tendenzielle prognostische Relevanz aufwiesen, hinsichtlich einer möglichen unabhängigen prognostischen Bedeutung überprüft. Demnach erwiesen sich für die Beurteilung des Rezidivverhaltens der pT1-Tumoren der Ki-67-Index ($p = 0,008$) und der p53-Index ($p = 0,014$), für die Beurteilung des Progressionsverhaltens der pT1-Tumoren das Substaging ($p = 0,034$), der Top-2 α -Index ($p = 0,049$) und p16-Status ($p = 0,003$) sowie für die Beurteilung des krankheitsbezogenen Überlebens von muskelinvasiven Tumoren das Tumorstadium ($p = 0,011$), der Lymphknotenstatus ($p = 0,0001$), der Ki-67-Index ($p = 0,002$) und der HER2-Status ($p = 0,011$) als Faktoren mit unabhängiger prognostischer Aussagekraft.

Sollten sich diese Befunde auch in prospektiven Validierungsstudien bestätigen, so könnten sich die genannten Parameter beim invasiven Harnblasenkrebs als prognostische Marker etablieren. In diesem Zusammenhang ist allerdings mitzuberücksichtigen, dass für minimal-invasive und muskelinvasive Harnblasenkarzinome teilweise unterschiedliche prognostische Faktoren existieren und somit ein Zusammenhang zwischen der prognostischen Bedeutung einzelner Parameter und dem Fortschritt der Tumorerkrankung besteht. Die Tatsache, dass für verschiedene immunhistochemische Marker – die Proliferationsmarker Ki-67 und Top2 α , die Tumorsuppressorproteine p53 und p16, das Adhäsionsmolekül E-Cadherin, das „Anti-Apoptoseprotein“ Clusterin sowie das Onkoprotein HER2 – eine Korrelation mit dem klinischen Erkrankungsverlauf gefunden werden konnte, unterstreicht die Vielfalt an molekularen Mechanismen, die bei Wachstum und Ausbreitung von Urothelkarzinomen der Harnblase involviert sind. Für die Zukunft ist zu erwarten, dass der Stellenwert der Immunhistochemie bei der Abschätzung des biologischen Verhaltens von Harnblasentumoren – und wohl auch von vielen anderen malignen Tumoren – weiter zunehmen wird.

6. Literaturverzeichnis

Arai T, Nakano T, Fukuhisa, Kasamatsu T, Tsunematsa R, Masubuchi K, Yamauchi K, Hamada T, Fukuda T, Noguchi H: Second cancer after radiation therapy for cancer of the uterine cervix. *Cancer* 67, 398-405 (1991)

Arbeitsgemeinschaft Bevölkerungsbezogener Krebsregister in Deutschland, Saarbrücken: Krebs in Deutschland, Häufigkeiten und Trends. 5. Aufl., herausgegeben von der Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e. V. (GEKID) in Zusammenarbeit mit dem Robert-Koch-Institut, 13, 80-83 (2006)

Armstrong BK: Saccharin/cyclamates: epidemiological evidence. *IARC Sei Publ* 65, 129-143 (1985)

Baithun SI, Naase M, Blanes A, Diaz-Cano SJ: Molecular and kinetic features of transitional cell carcinomas of the bladder: biological and clinical implications. *Virchows Arch* 438, 289-297 (2001)

Bates MN, Smith AH, Hopenhayn-Rich C: Arsenic ingestion and internal cancers: a review. *Am J Epidemiol* 135, 462-476 (1992)

Bernardini S, Billerey C, Martin M, Adessi GL, Wallerand H, Bittard H, Klotz L: The predictive value of muscularis mucosae invasion and p53 over expression on progression of stage pT1 bladder carcinoma. *J Urol* 165: 42-46 (2001)

Bircan S, Candir O, Serel AT: Comparison of WHO 1973, WHO/ISUP 1998, WHO 1999 grade and combined scoring systems in evaluation of bladder carcinoma. *Urol Int* 73, 201-208 (2004)

Brandau S, Böhle A: Bladder Cancer. I. Molecular and genetic basis of carcinogenesis. *Eur Urol* 39, 491-497 (2001)

Briggs NC, Young TB, Gilchrist KW, Vaillancourt AM, Messing EM: Age as a predictor of an aggressive clinical course for superficial bladder cancer in men. *Cancer* 69, 1445-1451 (1992)

Bringuier PP, Umbas R, Schaafsma HE, Karthaus HF, Debruyne FM, Schalken JA: Decreased E-cadherin immunoreactivity correlates with poor survival in patients with bladder tumors. *Cancer Res* 53, 3241-3245 (1993)

Bringuier PP, Girolidi LA, Umbas R, Shimazui T, Schalken JA: Mechanisms associated with abnormal E-cadherin immunoreactivity in human bladder tumors. *Int J Cancer* 83, 591-595 (1999)

Byrne RR, Shariat SF, Brown R, Kattan MW, Morton JR, Wheeler TM, Lerner SP: E-cadherin immunostaining of bladder transitional cell carcinoma, carcinoma *in situ* and lymph node metastases with long-term follow-up. *J Urol* 165, 1473-1479 (2001)

Calmels S, Ohshima H, Vincent P, Gounot AM, Bartsch H: Screening of microorganisms for nitrosation catalysis at pH 7 and kinetic studies on nitrosamine formation from secondary amines by *E. coli* strains. *Carcinogenesis* 6, 911-915 (1985)

Calvo EL, Mallo GV, Fiedler F, Malka D, Vaccaro MI, Keim V, Morisset J, Dagorn JC, Iovanna JL: Clusterin overexpression in rat pancreas during the acute phase of pancreatitis and pancreatic development. *Eur J Biochem* 254, 282-289 (1998)

Chen SS, Chen KK, Lin ATL, Chang YH, Wu HHH, Hsu THS, Chang LS: The significance of tumour grade in predicting disease progression in stage Ta transitional cell carcinomas of the urinary bladder. *Br J Urol* 78, 209-212 (1996)

Chen T, Turner J, McCarthy S, Scaltriti M, Bettuzzi S, Yeatman TJ: Clusterin-mediated apoptosis is regulated by adenomatous polyposis coli and p21 dependent but p53 independent. *Cancer Res* 64, 7412-7419 (2004)

Cheng L, Weaver AI, Neumann RM, Scherer BG, Bostwick DG: Substaging of T1 bladder carcinoma bases on the depth of invasion as measured by micrometer: a new proposal. *Cancer* 86, 1035-1045 (1999)

Coombs LM, Oliver S, Sweeny E, Knowles M: Immunocytochemical localization of c-erbB-2 protein in transitional cell carcinoma of the urinary bladder. *J Pathol* 169, 35-42 (1993)

Correa-Rotter R, Ibarra-Rubio ME, Schwochau G , Cruz C, Silkensen JR, Pedraza-Chavarri J, Chmielewski D, Rosenberg ME: Induction of clusterin in tubules of nephrotic rats. *J Am Soc Nephrol* 9, 33-37 (1998)

Costa MJ, Hansen CL, Holden JA, Guinee D Jr: Topoisomerase II-alpha: prognostic predictor and cell cycle marker in surface epithelial neoplasms of the ovary and peritoneum. *Int J Gynecol Pathol* 19, 248-257 (2000)

Cox DR: Regression models and life tables. *J R Stat Soc* 34, 187-192 (1972)

Criswell T, Klokov D, Beman M, Lavik JP, Boothman DA: Repression of IR-inducible clusterin expression by the p53 tumor suppressor protein. *Cancer Biol Ther* 2, 372-380 (2003)

Depkowski PL, Rosenthal SI, Brien TP, Stylos S, Johnson RL, Ross JS: Topoisomerase II-alpha expression in breast cancer: correlation with outcome variables. *Mod Pathol* 13, 542-547 (2000)

Deutsche Krebsgesellschaft: Kurzgefasste Interdisziplinäre Leitlinien 2002, 3. Auflage (2002)

Diestra JE, Condom E, Del Muro XG, Scheffer GL, Perez J, Zurita AJ, Munoz-Segui J, Vignes F, Scheper RJ, Capella G, Germa-Lluch JR, Izquierdo MA: Expression of multidrug resistance proteins P-glycoprotein, multidrug resistance protein 1, breast cancer resistance protein and lung resistance related protein in locally advanced bladder cancer treated with neoadjuvant chemotherapy: biological and clinical implications. *J Urol* 170, 1383-1387 (2003)

Eble JN, Sauter G, Epstein JI, Sesterhenn IA: World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs. IARC Press, Lyon, 116-123 (2004)

Epstein JI, Amin MB, Reuter VR, Mostofi FK, and the Bladder Consensus Conference Committee: The World Health Organization/ International Society of Urological Pathology consensus classification of urothelial (transitional cell) neoplasm of the urinary bladder. *Am J Surg Pathol* 22, 1435-1448 (1998)

Fonatsch C, Duchrow M, Rieder H, Schluter C, Gerdes J: Assignment of the human Ki-67 gene (MK 167) to 10q25-qter. *Genomics* 11, 476-477 (1991)

Fossa SD, Berner AA, Jacobsen AB, Waehre H, Kvarstein B, Urnes T, Ogreid P, Johansen TE, Slide J, Nesland JM: Clinical significance of DNA ploidy and S-phase fraction and their relation to p53 protein, c-erbB-2 protein and HCG in operable muscle-invasive bladder cancer. *Br J Cancer* 68, 572-578 (1993)

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

Fritz IB, Burdzy C, Setchell B, Blaschuck O: Ram rete testis fluid contains a protein (clusterin) which influences cell-cell interactions in vitro. *Biol Reprod* 28, 1173-1188 (1993)

Frixen UH, Behrens J, Sachs M, Eberle G, Voss B, Warda A, Löchner D, Birchmeier W: E-cadherin mediated cell-cell adhesion prevents invasiveness of human carcinoma cells. *J Cell Biol* 113, 173-185 (1991)

Garcia del Muro X, Torregrosa A, Munoz J, Castellsague X, Condom E, Vignes F, Arance A, Fabra A und Germa JR: Prognostic value of the expression of E-cadherin and beta-catenin in bladder cancer. *Eur J Cancer* 36, 357-362 (2000)

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

Gorgoulis VG, Barbatis C, Poulias I, Karameris AM: Molecular and immunohistological evaluation of epidermal growth factor receptor and c-erbB-2 gene product in transitional cell carcinomas of the urinary bladder: a study in Greek patients. *Mod Pathol* 8, 758-764 (1995)

Gottesman MM, Pastan I: Biochemistry of multidrug resistance mediated by the multidrug transporter. *Annu Rev Biochem* 62, 385-427 (1993)

Grossman HB, Dinney CPN: Markers of bladder cancer – state of the art. *Urol Oncol* 5, 3-10 (2000)

Haitel A, Posch B, El-Baz M, Mokhtar AA, Susani M, Ghoneim MA, Marberger M: Bilharzial related, organ confined, muscle invasive bladder cancer: prognostic value of apoptosis markers, proliferation markers, p53, E-cadherin, epidermal growth factor receptor and c-erbB-2. *J Urol* 165, 1481-1487 (2001)

Hardy SP, Goodfellow HR, Valverde MA, Gill DR, Sepulveda F, Higgins F: Protein kinase C-mediated phosphorylation of the human multidrug resistance P-glycoprotein regulates cell volume-activated chloride channels. *EMBO J* 14, 68-75 (1995)

Heidebrecht HJ, Buck F, Haas K, Wacker HH, Parwaresch R: Monoclonal antibodies Ki-S3 and Ki-S5 yield new data on the 'Ki-67' proteins. *Cell Prolif* 29 (7), 413-425 (1996)

Hermanek P, Hutter RVP, Sobin LH, Wagner G, Wittekind C: TNM atlas. Illustrated guide to the TNM-pTNM classification of malignant tumours. UICC. 4.Aufl., 309-314, Springer Verlag, Berlin-Heidelberg-New York (1997)

Herr HW, Cookson MS, Zhang ZF, Soloway S, Sogani PC, Fair WR: The treated natural history of high risk superficial bladder cancer: Fifteen year outcome. *J Urol* 158, 62-67 (1997)

Herr HW, Sogani PC: Does early cystectomy improve the survival of patients with high risk superficial bladder tumors? *J Urol* 166, 1296-1299 (2001)

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

Holden JA, Towndend JJ: DNA topoisomerase II-alpha as a proliferation marker in astrocytic neoplasms of the central nervous system: correlation with MIB-1 expression and patient survival. *Mod Pathol* 12, 1094-1100 (1999)

Holmäng S, Hedelin H, Anderström C, Johansson SL: The relationship among multiple recurrences, progression and prognosis of patients with stages Ta and T1 transitional cell carcinoma of the bladder followed for at least 20 years. *J Urol* 153, 1823-1827 (1995)

Holmäng S, Hedelin H, Anderström C, Holmberg E, Johansson SL: The importance of the depth of invasion in stage T1 bladder carcinoma: a prospective cohort study. *J Urol* 157: 800-803 (1997)

Holmäng S, Andius P, Hedelin H, Wester K, Busch C, Johansson SL: Stage progression in Ta papillary urothelial tumours: relationship to grade, immunohistochemical expression of tumour markers, mitotic frequency and DNA ploidy. *J Urol* 165, 1124-1130 (2001)

Hong RL, Pu YS, Hsieh TS, Chu JS, Lee WJ: Expressions of E-cadherin and exon v6-containing isoforms of CD44 and their prognostic values in human transitional cell bladder carcinoma. *J Urol* 153, 2025-2028 (1995)

Hsu M, Raine L, Fanger H: The use of avidin biotin peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: Comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedure. *J Histochem Cytochem* 29, 577-583 (1981)

Huff JE: Carcinogenicity of ochratoxin A in experimental animals. *IARC Sei Publ* 115, 229-244 (1991)

Ioachim E, Charchanti A, Stavropoulos NE, Athanissiou ED, Michael MC, Angantis NJ: Immunohistochemical expression of retinoblastoma gene product (Rb), p53 protein, MDM2, c-erbB-2, HLA-DR and proliferation indices in human urinary bladder carcinoma. *Histol Histopathol* 15, 721-727 (2000)

Jahnsen S, Karlsson MG: Predictive value of p53 and pRB immunostaining in locally advanced bladder cancer treated with cystectomy. *J Urol* 160, 1291-1296 (1998)

Järvinen TA, Tanner M, Rantanen V, Bärlund M, Borg A, Grenman S, Isola J: Amplification and deletion of topoisomerase II-alpha is associated with erbB-2 amplification and affects sensitivity to topoisomerase II inhibitor doxorubicin in breast cancer. *Am J Pathol* 156, 839-847 (2000)

Jemal A, Siegel R, Ward E, Murray T, Xu J, Smigal C, Thun MJ: Cancer statistics, 2006. *CA Cancer J Clin* 56, 106-130 (2006)

Jenne DE, Tschopp J: Clusterin: the intriguing guises of a widely expressed glycoprotein. *Trends Biochem Sci* 17, 154-149 (1992)

Jimenez R, Gheiler E, Oskanian P, Tiguert R, Sakr W, Wood DP, Pontes JE, Grignon DJ: Grading the invasive component of urothelial carcinoma of the bladder and its relationship with progression-free survival. *Am J Surg Pathol* 24, 980-987 (2000a)

Jiminez R, Keane TE, Hardy HT: pT1 urothelial carcinoma of the bladder: criteria for diagnosis, pitfalls, and clinical implications. *Adv Anat Pathol* 7: 13-25 (2000b)

Jiminez R, Hussain M, Bionco FJ Jr, Vaishampayan U, Tabzcka P, Sakr WA, Pontes JE, Wood DP, Grignon DJ: HER-2/neu overexpression in muscle-invasive urothelial carcinoma of the bladder: prognostic significance and comparative analysis in primary and metastatic tumours. *Clin Cancer Res* 7, 2440-2447 (2001)

Jordan-Stark TC, Witte DP, Aronow B, Harmony JAK: Apolipoprotein J: a membrane policeman? *Curr Opin Lipidol* 3, 75-85 (1992)

Kälble T, Riedasch G, Pomer S, Möhring K: Harnblasentumoren unter Immunsuppression nach Nierentransplantation. *Akt Urol* 19, 304-309 (1988)

Kaplan EM, Meier P: Nonparametric estimation from incomplete observations. *J Am Stat Assoc* 53: 457-481 (1958)

Kausch I, Jiang H, Thode B, Doehn C, Krüger S, Jocham D: Inhibition of bcl-2 enhances the efficacy of chemotherapy in renal cell carcinoma. *Eur Urol* 47: 703-709 (2005)

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

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

Korkolopoulou P, Christodoulou P, Kapralos P, Exarchakos M, Bisbiroula A, Hadjiyannakis M, Georgountzos C, Thomas-Tsagli E: The role of p53, MDM2 and c-erbB2 oncoproteins, epidermal growth factor receptor and proliferation markers in the prognosis of urinary bladder cancer. *Pathol Res Pract* 193, 767-775 (1997)

Korkolopoulou P, Christodoulou P, Lazaris A, Thomas-Tsagli E, Kapralos P, Papanikolaou A, Kalliteraki I, Davaris P: Prognostic implications of aberrations in p16/pRb pathway in urothelial bladder carcinomas: a multivariate analysis including p53 expression and proliferation markers. *Eur Urol* 30, 167-177 (2001)

Korkolopoulou P, Lazaris AC, Konstantinidou AE, Kavantzas N, Patsouris E, Christodoulou P, Thomas-Tsagli E, Davaris P: Differential expression of bcl-2 family proteins in bladder carcinomas: relationship with apoptotic rate and survival. *Eur Urol* 41, 274-283 (2002)

Krüger S, Weitsch G, Büttner H, Matthiesen A, Böhmer T, Marquardt T, Sayk F, Feller AC, Böhle A: HER2 overexpression in muscle-invasive urothelial carcinoma of the bladder: prognostic implications. *Int J Cancer* 102, 514-518 (2002)

Krüger S, Lange I, Kausch I, Feller AC: Topoisomerase 2 α - und HER2-Expression in minimal-invasiven Urothelkarzinomen der Harnblase (Stadium pT1) – eine Multitissue-Array-Analyse. *Focus MUL* 22, Heft 1, 7-14 (2005)

Lee R, Droller MJ: The natural history of bladder cancer. Implications for therapy. *Urol Clin North Am* 27, 1-13 (2000)

Lipponen P, Eskelinen MJ, Syrjanen S, Tervahauta A, Syrjanen K: Use of immunohistochemically demonstrated c-erb B-2 oncoprotein expression as a prognostic factor in transitional cell carcinoma of the urinary bladder. *Eur Urol* 20, 238-242 (1991)

Lipponen P, Eskelinen MJ: Reduced expression of E-cadherin is related to invasive disease and frequent recurrence in bladder cancer. *Cancer Res Clin Oncol* 121,303-308 (1995)

Liukkonen T, Rajala P, Raitanen M, Rintale E, Kaasinen E, Lipponen P, Finbladder Group: Prognostic value of MIB-1 score, p53, EGFR, mitotic index and papillary status primary superficial (stage pTa/pT1) bladder cancer: a prospective study. *Eur Urol* 36, 393-400 (1999)

Lopez-Abente G, Gonzalez CA, Errezola M, Escolar A, Izarzugaza I, Nebot M, Riboli E: Tobacco smoke inhalation pattern, tobacco type, and bladder cancer in Spain. *Am J Epidemiol* 134, 830-839 (1991)

Lopez-Beltran A, Luque RJ, Alvarez-Kindelan J, Quintero A, Merlo F, Carrasco JC, Requena MJ, Montironi R: Prognostic factors in stage T1 grade G3 bladder cancer survival: the role of G1-S modulators (p53, p21Waf1, p27kip1, Cyclin D1, and Cyclin D3) and proliferation index (ki67-MIB1). *Eur Urol* 45, 606-612 (2004a)

Lopez-Beltran A, Sauter G, Gasser T, Hartmann A, Schmitz-Dräger BJ, Helpap B, Ayala AG, Tamboli P, Knowles MA, Sidransky D, Cordon-Cardo C, Jones PA, Cairns P, Simon R, Amin MB, Tyczynski JE: Infiltrating urothelial carcinoma. In: Eble JN, Sauter G, Epstein JI, Sesterhenn IA (Hrsg.): World Health Organization classification of tumours. Pathology and genetics of tumours of the urinary system and male genital organs. IARC Press, Lyon, 93-109 (2004b)

Malavaud B: T1G3 bladder tumours: the case of radical cystectomy. *Eur Urol* 45, 406-410 (2004)

May PC: Sulfated glycoprotein-2: an emerging molecular marker for neurodegeneration. *Ann N Y Acad Sci* 679, 235-244 (1993)

McCann A, Dervan PA, Johnston PA, Gullick WJ, Carney DN: C-erbB-2 oncoprotein expression in primary human tumors. *Cancer* 65, 88-92 (1990)

McCredie M, Stewart JH, Ford JM, McLennan RA: Phenacetin-containing analgetics and cancer of the bladder or renal pelvis in women. *Br J Urol* 55, 220-224 (1983)

Mellon KJ, Lunec J, Wright C, Horne CH, Kelly P, Neal DE: C-erbB-2 in bladder cancer: molecular biology, correlation with epidermal growth factor receptors and prognostic value. *J Urol* 155, 321-326 (1996)

Mhaweck P, Greloz V, Oppikofer C, Szalay-Quinodoz I, Herrmann F: Expression of cell cycle proteins in T1a and T1b urothelial bladder carcinoma and their value in predicting tumor progression. *Cancer* 100, 2367-2375 (2004)

Mitra AP, Datar RH, Cote RJ: Molecular pathways in invasive bladder cancer: new insights into mechanisms, progression, and target identification. *J Clin Oncol* 24, 5552-5546 (2006)

Miyake H, Hara I, Kamidono S, Gleave ME: Synergistic chemosensitization and inhibition of tumour growth and metastasis by the antisense oligodeoxynucleotide targeting clusterin gene in a human bladder cancer model. *Clin Cancer Res* 7, 4245-4252 (2001)

Miyake H, Gleave ME, Kamidono S, Hara I: Overexpression of clusterin in transitional cell carcinoma of the bladder is related to disease progression and recurrence. *Urology* 50, 150-154 (2002)

Miyake H, Yamanaka K, Muramaki M, Hara I, Gleave ME: Therapeutic efficacy of adenoviral-mediated p53 gene transfer is synergistically enhanced by combined use of antisense oligodeoxynucleotide targeting clusterin gene in a human bladder cancer model. *Neopl* 7, 171-179 (2005)

Montie JE, Straffon RA, Stewart BH: Radical cystectomy without radiation therapy for carcinoma of the bladder. *J Urol* 131, 477-482 (1984)

Moriyama M, Akiyama T, Yamamoto T, Kawamoto T, Kato T, Sato K, Watanuki T, Hikage T, Katsuta N, Mori S: Expression of c-erbB-2 gene product in urinary bladder cancer. *J Urol* 145, 423-427 (1991)

Mostafa MH, Helmi S, Badawi AF, Tricker AR, Spiegelhalder B, Preussmann R: Nitrate, nitrite and volatile N-nitroso compounds in the urine of *Schistosoma haematobium* and *Schistosoma mansoni* infected patients. *Carcinogenesis* 15, 619-625 (1994)

Mostofi FK, Sobin LH, Torloni H: Histological typing of urinary bladder tumours, Volume 10. Geneva: World Health Organization, 16-17 (1973)

Mu XC, Tran TA, Ross JS, Carison JA: Topoisomerase II-alpha expression in melanocytic nevi and malignant melanoma. *J Cutan Pathol* 27, 242-248 (2000)

Nakagawa M, Emoto A, Nasu N, Hanada T, Kuwano M, Cole S, Nomura Y: Clinical significance of multi-drug resistance associated protein and p-glycoprotein in patients with bladder cancer. *J Urol* 157, 1260-1264 (1997)

Nakopoulou L, Zervas A, Gakipoulou-Givalou H, Constantinides C, Doumanis G, Davaris P, Dimopoulos C: Prognostic value of E-cadherin, beta-catenin, P120ctn in patients with transitional cell bladder cancer. *Anticancer Res* 20, 4571-4578 (2000)

Niehans GA, Kratzke RA, Froberg MK, Aeppli DM, Nguyen PL, Geradts J: G1 checkpoint protein and p53 abnormalities occur in most invasive transitional cell carcinomas of the urinary bladder. *Br J Cancer* 80, 1175-1184 (1999)

Nocito A, Bubendorf L, Maria-Tinner E, Suess K, Wagner U, Forster T, Kononen J, Fijan A, Bruderer J, Schmid U, Ackermann D, Maurer R, Alund G, Knönagel H, Rist M, Anabitarte M, Hering F, Hardmeier T, Schoenenberger AJ, Flury R, Jäger P, Luc-Fehr J, Schraml P, Moch

H, Mihatsch MJ, Gasser T, Sauter G: Microarrays of bladder cancer tissue are highly representative of proliferation index and histological grade. *J Pathol* 194, 349-357 (2001)

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

Orlow I, LaRue H, Osman I, Lacombe L, Moore L, Rabbani F, Meyer F, Fradet Y, Cordon-Cardo C: Deletions of the INK4A gene in superficial bladder tumours. Association with recurrence. *Am J Pathol* 155, 105-113 (1999)

O'Sullivan J, Whyte L, Drake J, Tenniswood M: Alterations in the post-translational modification and intracellular trafficking of clusterin in MCF-7 cells during apoptosis. *Cell Death Differ* 10, 914-927 (2003)

Otto T, Bex A, Schmidt U, Raz A, Rübber H: Improved prognosis assessment for patients with bladder carcinoma. *Am J Pathol* 150, 1919-1923 (1997)

Oyasu R: World Health Organization and International Society of Urological Pathology classification and two-number grading system of bladder tumors. *Cancer* 88, 1509-1512 (2000)

Pagano F, Bassi P, Galetti TP, Meneghini A, Dilani C, Artibani W, Garbuglio A: Results of contemporary radical cystectomy for bladder cancer: a clinicopathological study with an emphasis on the inadequacy of the tumour, nodes and metastasis classification. *J Urol* 145, 45-50 (1991)

Park J, Shinohara N, Liebert M, Noto L, Flint A, Grossman HB: P-glycoprotein expression in bladder cancer. *J Urol* 151, 43-46 (1994)

Patrianakos C, Hoffmann D: Chemical studies on tobacco smoke LXIV, on the analysis of aromatic amines in cigarette smoke. *J Anal Toxicol* 3, 150-154 (1979)

Pegram MD, Koneeny G, Slamon DJ: The molecular cellular biology of HER2/neu gene amplification/overexpression and the clinical development of Herceptin (trastuzumab) therapy for breast cancer. *Cancer Treat Res* 103: 57-75 (2000)

Platz CE, Cohen MB, Jones MP, Olson DB, Lynch CF: Is microstaging of early invasive cancer of the urinary bladder possible or useful? *Mod Pathol* 9: 1035-1039 (1996)

Poremba C, Bankfalvi A, Dockhorn-Dworniczak B: Das Tumorsuppressorgen p53 – Die theoretischen Grundlagen und ihre Bedeutung für die Pathologie. *Pathologie* 17, 181-188 (1996)

Portillo FJ, Alken P: Current problems and needs in the treatment of pT1G3 bladder carcinoma. *Int Urol and Nephrol* 33, 29-40 (2002)

Prout GR Jr, Barton B, Griffin P, Friedell G: Treated history of noninvasive grade 1 transitional cell carcinoma. *J Urol* 148, 1413-1419 (1992)

Rao J, Seligson D, Visapaa H, Horvath S, Eeva M, Michel K, Pantuck A, Beldegrun A, Palotie A: Tissue microarray analysis of cytoskeletal actin-associated biomarkers gelsolin and E-cadherin in urothelial carcinoma. *Cancer* 95, 1247-1257 (2002)

Ravery V, Grignon D, Angulo J, Pontes E, Montie J, Crissman J, Chopin D: 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 (1997)

Redondo M, Villar E, Torres-Mundo J, Tellez T, Morell M, Carol K, Petit: Overexpression of clusterin in human breast carcinoma. *Am J Pathol* 157: 393-399 (2000)

Reznikoff CA, Sarkar S, Jülicher KP, Burger MS, Jairaj BS, Puthenveetil JA, Jarrard DF, Newton MA: Genetic alterations and biological pathways in human bladder cancer. *Urol Oncol* 5, 191-203 (2000)

Riede UN, Wehner H, Freudenberg N: Uropoetisches System. In: Riede UN, Schaefer HE: *Allgemeine und spezielle Pathologie*. 4. Aufl., 839-844, Thieme Verlag, Stuttgart-New York (1999/2001)

Rocco JW, Sidransky D: P16 (MTS-1/CDKN2/INK4a) in cancer progression. *Exp Cell Res* 264, 42-55 (2001)

Saint F, Le Frere Belda MA, Quintela R, Hoznek A, Patard JJ, Bellot J, Popov Z, Zafrani ES, Abbou CC, Chopin DK, Diez de Medina SG: Pretreatment p53 nuclear overexpression as a

prognostic marker in superficial bladder cancer treated with bacillus calmette-guérin (BCG). *Eur Urol* 45, 475-482 (2004)

Sandlow J, Cohen MB, Robinson RA, Dreicer R, Williams RD. DNA ploidy and P-glycoprotein expression as predictive factors of response to neoadjuvant chemotherapy for invasive bladder cancer. *Urology* 43, 787-791 (1994)

Sarkis AS, Dalbagni G, Cordon Cardo C, Zhang ZF, Sheinfeld J, Fair WR, Herr HW, Reuter VE: Nuclear overexpression of p53 protein in transitional cell bladder carcinoma: a marker for disease progression. *J Nat Cancer Inst* 85, 53-59 (1993)

Sato K, Moriyama M, Mori S, Saito M, Watanuki T, Terada K, Okuhara E, Akiyama T, Toyoshima K, Yamamoto T: An immunohistochemical evaluation of c-erbB-2 gene products in patients with urinary bladder carcinoma. *Cancer* 70, 2493-2498 (1992)

Sauter G, Moch H, Moore D, Carroll P, Kerschmann P, Chew K, Mihatsch MJ, Gudat F, Waldman F: Heterogeneity of erbB-2 gene amplification in bladder cancer. *Cancer Res* 53, 2199-2203 (1993)

Sauter G, Mihatsch MJ: Pussycats and baby tigers: Non-invasive (pTa) and minimally invasive (pT1) bladder carcinomas are not the same! *J Pathol* 185, 339-341 (1998)

Schmähl D, Habs M, Lorenz M, Wagner I: Occurrence of second tumours in man after anticancer drug treatment. *Cancer Treat Rev* 9, 167-194 (1982)

Schmidt MHH, Broll R, Bruch HP, Bögler O, Duchrow M: The proliferation marker pKi-67 organizes the nucleolus during the cell cycle depending on Ran and cyclin B. *J Pathol* 199, 18-27 (2003)

Schmitz-Dräger BJ, Goebell PJ, Heydthausen M: p53 immunohistochemistry in bladder cancer. Combined analysis: a way to go? *Urol Oncol* 5, 204-210 (2000a)

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

Sensibar JA, Sutkowski DM, Raffo A, Buttyan R, Griswold MD, Sylvester SR, Kozlowski JM, Lee C: Prevention of cell death induced by tumor necrosis factor alpha in LNCaP cells by overexpression of sulphated glycoprotein-2 (clusterin). *Cancer Res* 55, 2431-2437 (1995)

Sgambato A, Migaldi M, Faraglia B, De Aloysio G, Ferrari P, Ardito R, De Gaetani C, Capelli G, Cittadini A, Trentini GP: Cyclin D1 expression in papillary superficial bladder cancer: its association with other cell cycle-associated proteins, cell proliferation and clinical outcome. *Int J Cancer* 97, 671-678 (2002)

Shariat SF, Tokunaga H, Zhou J, Kim J, Ayala GE, Benedict WF, Lerner SP: P53, p21, pRB, and p16 expression predict clinical outcome in cystectomy with bladder cancer. *J Clin Oncol* 22, 1014-1024 (2004)

Sidransky D, von Eschenbach A, Tsai YC, Jones P, Summerhayes I, Marshall J, Paul M, Green P, Hamilton SR, Frost P, Vogelstein B: Identification of p53 gene mutations in bladder cancers und urine samples. *Science (Washington DC)* 252, 706-709 (1991)

Siu LL, Banerjee D, Khurana RJ, Pan X, Pflueger R, Tannock IF, Moore MJ: The prognostic role of p53, metallothionein, P-glycoprotein, and MIB-1 in muscle-invasive urothelial transitional cell carcinoma. *Clin Cancer Res* 4, 559-565 (1998)

Skinner DG, Lieskovsky G: Contemporary cystectomy with pelvic node dissection compared to preoperative radiation therapy plus cystectomy in the management of invasive bladder cancer. *J Urol* 131, 1069-1072 (1984)

Slamon DJ, Godolphin W, Jones LA, Holt LA, Wong SG, Keith DE, Levin WJ, Stuart SG, Udove J, Ullrich A, Press MF: Studies of the HER2 proto-oncogene in human breast and ovarian cancer. *Science* 244, 707-712 (1989)

Slaton JW, Millikan R, Inoue K, Krashima T, Czerniak B, Shen Y, Yang Y, Benedict WF, Dinney CP: Correlation of metastasis related gene expression and relapse-free survival in patients with locally advanced bladder cancer treated with cystectomy and chemotherapy. *J Urol* 171, 570-574 (2004)

Smits G, Schaafsma E, Kiemeney L, Caris C, Debruyne F, Witjes JA: Microstaging of pT1 transitional cell carcinoma of the bladder: identification of subgroups with distinct risks of progression. *Urology* 52: 1009-1013 (1998)

Sökeland J, Schulze H, Rübber H: Gut- und bösartige Neubildungen. Harnblasenkarzinom. In: Urologie. 13. Aufl., 266-273, Thieme Verlag, Stuttgart-New York (2004)

Speers AG, Lwaleed BA, Featherstone JM, Sallis BJ, Cooper AJ: Furosemide reverse multidrug resistance status in bladder cancer cells in vitro. J Clin Pathol 59, 912-915 (2006)

Stasik MJ: Carcinomas of the urinary bladder in a 4-chloro-o-toluidine cohort. Int Arch Occup Environ Health 60, 21-24 (1988)

Stein JP, Grossfeld GD, Ginsberg DA, Esrig D, Freeman JA, Figueroa AJ, Skinner DG, Cote RJ: Prognostic markers in bladder cancer: A contemporary review of the literature. J Urol 160, 645-659 (1998)

Steinberg J, Oyasu R, Lang S, Sintich S, Rademaker A, Lee C, Kozlowski JM, Sensibar JA: Intracellular levels of SGP-2 (clusterin) correlate with tumor grade in prostate cancer. Clin Cancer Res 3, 1707-1711 (1997)

Stejskal DD, Fiala RR: Evaluation of serum and urine clusterin as a potential tumor marker for urinary bladder cancer. Neopl 53, 343-346 (2006)

Sugawara I: Expression and functions of P-Glycoprotein (mdr1 gene product) in normal and malignant tissue. Acta Pathol Jpn 40, 545-553 (1990)

Sun W, Herrera GA: E-cadherin expression in urothelial carcinoma in situ, superficial papillary transitional cell carcinoma and invasive transitional cell carcinoma. Hum Pathol 33, 996-1000 (2002)

Tachibana M, Deguchi N, Baba S, Jitsukawa S, Hata M, Tazaki H: Multivariate analysis of flow cytometric deoxy-ribonucleic acid parameters and histological features for prognosis of bladder cancer patients. J Urol 146, 1530-1534 (1991)

Takeichi M: Cadherin cell adhesion receptors as a morphogenetic regulator. Science 251, 1452-1455 (1991)

Thorns C, Noack F, Feller AC, Merz H, Stocker W, Mueller-Kunert E, Bernd HW: Application of newly developed tissue-arrays to study EMMPRIN (CD 147) expression in malignant Non-Hodgkin lymphoma. Cancer Genomics Proteomics 1, 45-52 (2004)

Underwood M, Bartlett J, Reeves J, Gardiner DS, Scott R, Cooke T: C-erbB2 gene amplification: a molecular marker in recurrent bladder tumours? *Cancer Res* 55, 2422-2430 (1995)

van der Valk P, van Kalken CK, Ketelaars H, Broxterman HJ, Scheffer G, Kuiper CM, Tsuruo T, Lankelma J, Meijer CJ, Pinedo HM, Scheper RJ: Distribution of multidrug resistance-associated P-glycoprotein in normal and neoplastic human tissue. Analysis with 3 monoclonal antibodies recognizing different epitopes of the P-glycoprotein molecule. *Ann Oncol* 1, 56-64 (1990)

Villanueva CM, Canton KP, Grimalt JO, Malats N, Silverman D, Tardon A, Garcia-Closas R, Serra C, Carrato A, Castano-Vinyals G, Marcos R, Rothman N, Real FX, Dosemeci M, Kogevinas M: Bladder cancer and exposure to water disinfection by-products through ingestion, bathing, showering, and swimming pools. *Am J Epidemiol* 165, 148-156 (2007)

Viscoli CM, Lachs MS, Horwitz RI: Bladder cancer and coffee drinking: a summary of case-control research. *Lancet* 341, 1432-1437 (1993)

Vollmer RT, Humphrey PA, Swanson PE, Wick MR, Hudson MA: Invasion of the bladder by transitional cell carcinoma: its relation to histologic grade and expression of p53, MIB-1, c-erbB-2, epidermal growth factor receptor, and bcl-2. *Cancer* 84, 715-723 (1998)

Williamson MP, Elder PA, Shaw ME, Devlin J, Knowles MA: P16 (CDKN2) is a major deletion target at 9p21 in bladder cancer. *Hum Mol Genet* 4, 1569-1577 (1995)

Witjes JA, Kiemeny LA, Schaafsma HE, Debruyne FM, the members of the Dutch South-east Cooperative Urological group: The influence of review pathology on study outcome of a randomized multicentre superficial bladder cancer trial. *Br J Urol* 73, 172-176 (1994)

Witjes JA, Kiemeny LALM, Wheelless LL, Grossmann HB: The value of histopathological prognostic factors in superficial bladder cancer. *Urol Oncol* 5, 185-190 (2000)

Witte DP, Aronow BJ, Dry JK, Harmony JA: Temporally and spatially restricted expression of apolipoprotein J in the developing heart defines discrete stages of valve morphogenesis. *Dev Dyn* 201, 290-296 (1994)

Wood DP, Wartinger DD, Reuter V, Cordon-Cardo C, Fair WR, Chaganti RSK: DNA, RNA and immunohistochemical characterization of the HER-2/neu oncogene in transitional cell carcinoma of the bladder. *J Urol* 146, 1398-1401 (1991)

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

Wu TT, Chen JH, Lee YH, Huang JK: The role of bcl-2, p53, and Ki-67 index in predicting tumour recurrence for low grade superficial transitional cell bladder carcinoma. *J Urol* 163, 758-760 (2000)

Wu AJ, Park II, Zhaung L, Lee C: Response to a lethal dose of heat shock by a transient up-regulation of clusterin expression followed by down-regulation and apoptosis in prostate and bladder cancer cells. *Prostate* 53, 277-285 (2002)

Wunsche W, Tenniswood MP, Schneider MR, Vollmer G: Estrogenic regulation of clusterin mRNA in normal and malignant endometrial tissue. *Int J Cancer* 76, 684-688 (1998)

Yang CC, Chu KC, Chen HY, Chen WC: Expression of p16 and cyclin D1 in bladder cancer and correlation in cancer progression. *Urol Int* 69, 190-194 (2002)

Yasuhiro T, Morimasa W, Kentaro K, Naoko K, Taishi H, Jun N, Masayuki N, Seiji N, Michihiko K: MDR1 gene overexpression and altered degree of methylation at the promoter region in bladder cancer during chemotherapeutic treatment. *Clin Cancer Res* 6, 4618-4627 (2000)

Yurakh AO, Ramos D, Calabuig-Farinas S, Lopez-Guerrero JA, Rubio J, Salsona E, Romanenko AM, Vozianov AF, Pellin A, Llombart-Bosch A: Molecular and immunohistochemical analysis of the prognostic value of cell-cycle regulators in urothelial neoplasms of the bladder. *Eur Urol* 50, 506-515 (2006)

Zhang J, Zeng, L, Li GZ, Yang XY, Xia TL, Na YQ, Guo YL: Multivariate analysis of recurrence in T1 bladder transitional cell carcinoma. *Zhonghua Zhong Liu Za Zhi*, 25, 475-477 (2003)

Zhou HE, Zhang X, von Eschenbach AC, Scoresone K, Babaian RJ, Ro JY, Hung MC: Amplification and expression of the c-erb B2/neu proto-oncogene in human bladder cancer. *Mol Carcinogen* 3, 254-257 (1990)

Zhu YY, Kong CZ, Zeng Y, Pang GY, Yang CM, Sun ZX: The role of cell adhesion, multidrug-resistance and cell proliferation in short-term recurrent cases with T1G3 superficial bladder cancer. *Zhonghua Wai Ke Za Zhi* 41, 893-896 (2003)

7. Anhang

7.1. Studiengenehmigung durch die Ethikkommission

Die vorliegende Studie wurde von der Ethik-Kommission der Medizinischen Fakultät der Universität zu Lübeck in ihrem Bewilligungsschreiben vom 12.09.2006 genehmigt. Der Ethikantrag trägt den Titel „Prognostische Bedeutung immunhistochemischer Parameter bei Harnblasenkarzinomen“ und das Aktenzeichen 06-134.

7.2. Danksagung

Ganz besonders herzlich möchte ich mich bei PD Dr. med. Stefan Krüger, Oberarzt am Institut für Pathologie der Universität zu Lübeck, für die Überlassung des Themas und die hervorragende wissenschaftliche Betreuung, die gute Anleitung mit zahlreichen Hilfestellungen und die freundliche Motivation bedanken, die wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Mein besonderer Dank gilt auch Professor Dr. med. A. C. Feller, dem Direktor des Instituts für Pathologie der Universität zu Lübeck, der diese Studie ermöglicht und großzügig gefördert hat.

Ich danke den MTAs des immunhistochemischen Labors des Instituts für Pathologie für die methodentechnische Einarbeitung und Hilfsbereitschaft während der Laborarbeitszeiten.

Den Mitarbeitern der Klinik für Urologie, namentlich Herrn Prof. Dr. med. A. Böhle und Herrn PD Dr. med. I. Kausch, danke ich für die Probengewinnung und klinische Verlaufsdokumentation.

Sehr dankbar bin ich meinen Eltern und meinem Bruder, die mir dieses Medizinstudium sowie diese Arbeit ermöglicht haben und mich in jeder Hinsicht stets bedingungslos und selbstlos unterstützt haben.

Für die Zeit der Experimente und des Schreibens bin ich auch Dr. med. Friedhelm Sayk und vielen Freunden sehr dankbar für die Geduld, die sie mit mir hatten, aber auch für alle mentale Unterstützung, Anteil- und Rücksichtnahme.

7.3. Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Anne Gunda Mahnken
Geboren	03.10.1979 in Oldenburg (Niedersachsen)
Familienstand	Ledig
Eltern	Vater: Burkhard Mahnken, Dipl. Ing. Mutter: Antje Schumacher, Dipl. Ing.

Schulbildung

1986 – 1990	Grundschule Lienen
1990 – 1992	Orientierungsstufe Elsfleth
1992 – 1999	Gymnasium Brake
1999 – 2000	Au-pair-Aufenthalt in Madrid, Spanien

Medizinische Ausbildung

Herbst 2000	Studium der Humanmedizin am Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Lübeck
Herbst 2002	Ärztliche Vorprüfung
Herbst 2003	1. Staatsexamen
Frühjahr 2006	2. Staatsexamen
Frühjahr 2007	3. Staatsexamen

7.4. Publikationen

Die Ergebnisse der vorliegenden Dissertation wurden wie folgt veröffentlicht:

als Originalarbeit:

Krüger S, Mahnken A, Kausch I, Feller AC (2005) P16 immunoreactivity is an independent predictor of tumor progression in minimally invasive urothelial bladder carcinoma. Eur Urol 47: 463-467

Mahnken A, Kausch I, Feller AC, Krüger S (2005) E-cadherin immunoreactivity correlates with recurrence and progression of minimally invasive transitional cell carcinoma of the urinary bladder. Oncol Rep 14: 1065-1070

Krüger S, Mahnken A, Kausch I, Feller AC (2006) Value of clusterin immunoreactivity as a predictive factor in muscle-invasive urothelial bladder carcinoma. Urology 67: 105-109

als zitierfähige Kurzmitteilung:

Krüger S, Mahnken A, Kausch I, Feller AC (2006) Prognostic value of clusterin expression in muscle-invasive urothelial carcinomas of the urinary bladder. Path Res Pract 202: 337

als Kongressbeitrag (Poster):

Krüger S, Mahnken A, Kausch I, Feller AC (2006) Prognostische Bedeutung der Clusterin-Expression bei muskelinvasiven Urothelkarzinomen der Harnblase.

90. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Pathologie in Berlin, 19.-23.04.2006

Kopien der drei Originalarbeiten sowie der zitierfähigen Kurzmitteilung sind am Anhang beigefügt.