

# UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Institut für Pathologie

Prof. Dr. med. Guido Sauter

## **Assoziationen zwischen genetischen PTEN-Aberrationen und Prognose beim Harnblasenkarzinom**

### **Dissertation**

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
an der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

vorgelegt von:

Inga Cordes  
aus Braunschweig

Hamburg 2013

**Mündliche Verteidigung und Annahme der Dissertation am 7. November 2013**

**Veröffentlicht mit Genehmigung der  
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.**

**Prüfungsausschuss, der Vorsitzende: Prof. Dr. Guido Sauter**

**Prüfungsausschuss, zweiter Gutachter: Prof. Dr. Thorsten Schlomm**

**Prüfungsausschuss, dritter Gutachter: PD Dr. Georg Salomon**

## Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung .....	6
1.1. Epidemiologie des Urothelkarzinoms der Harnblase .....	6
1.2. Ätiologie und Risikofaktoren.....	6
1.3. Klinik.....	6
1.4. Diagnostik .....	7
1.5. Staging .....	7
1.6. Therapie .....	8
1.7. Prognose .....	9
1.7.1. Invasivität und Tumormorphologie .....	9
1.7.2. Infiltration von Blut- und Lymphgefäßen.....	10
1.7.3. Resektionsrand .....	11
1.7.4. Genetische Prognosefaktoren.....	11
1.7.4.1. Invasive und genetisch instabile Harnblasenkarzinome .....	11
1.7.4.1.1. Alterationen auf Chromosomenebene .....	11
1.7.4.1.1.1. Onkogene .....	11
1.7.4.1.1.2. Tumorsuppressorgene.....	12
1.7.4.1.1.3. Proteine für DNA-Reparatur.....	13
1.7.4.2. Genetisch stabile Urothel-Neoplasien (Low Grade).....	13
1.8. Das Tumorsuppressorgen PTEN.....	13
1.8.1. Der PI3-Kinase-Signalweg.....	14
1.8.2. Tumorsuppressorgen Phosphatase and Tensin homolog - PTEN .....	15
1.8.3. Die Bedeutung von PTEN für die Tumorgenese.....	16
1.8.4. Stand der Forschung zu PTEN .....	17
1.8.4.1. LOH-Analysen.....	17
1.8.4.2. FISH-Analysen .....	17
1.8.4.3. Array-CGH .....	17

1.8.4.4. Immunhistochemie/Western Blot-Studien .....	18
1.8.4.5. Mutationsanalysen .....	19
1.8.4.6. Weitere Studien.....	19
1.9. Fragestellung und Zielsetzung .....	20
2. Material und Methoden .....	22
2.1. Gewebe und Patienten .....	22
2.2. Herstellung der Tissue-Microarrays .....	23
2.3. Herstellung der FISH-Sonden.....	25
2.3.1. BAC-Klone .....	25
2.3.2. Vermehrung, Isolation und Reinigung der BAC-DNA .....	26
2.3.3. Markierung der BAC-DNA mit Fluoreszenzfarbstoffen.....	26
2.4. Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH).....	27
2.4.1. Vorbereitung der Paraffin-Gewebeschnitte.....	27
2.4.2. Herstellung des Hybridisierungsansatzes .....	27
2.4.3. Sonden-Hybridisierung .....	28
2.5. Auswertung .....	29
2.6. DNA- Extraktion .....	29
2.7. PCR.....	30
2.8. Gelelektrophorese.....	32
2.9. DNA-Sequenzierung .....	32
2.9.1. Aufreinigung .....	32
2.9.2. Sequenzierreaktion .....	33
2.9.3. DNA-Fällung.....	34
2.10. Statistik .....	34
3. Ergebnisse.....	35
3.1. TMA mit Prognosedaten aus Basel .....	35
3.1.1. pTa nach Grad .....	35

3.1.2. pT1 nach Grad .....	36
3.1.3. Rezidivfreies Überleben bei Patienten mit Stadium pTa.....	36
3.1.4. Progressionsfreies Überleben bei Patienten mit Stadium pT1 .....	37
3.1.5. Rohes Überleben bei Patienten mit Stadium pT2.....	39
3.1.6. Tumorspezifisches Überleben bei Patienten mit Stadium pT2 .....	40
3.2. Ergebnisse der FISH-Analyse des Hamburger TMA.....	41
3.2.1. Deletionen nach Tumorstadium .....	41
3.2.2. Deletionen nach Tumorgrad.....	42
3.3. Sequenzierung der heterozygot deletierten Tumoren.....	43
4. Diskussion .....	44
5. Zusammenfassung.....	50
6. Abkürzungsverzeichnis .....	51
7. Literatur .....	53
7.1. Artikel aus Fachzeitschriften .....	53
7.2. Monographien .....	59
7.3. Internetquellen .....	60
8. Danksagung .....	61
9. Lebenslauf .....	62
10. Eidesstattliche Erklärung.....	63

### 1. Einleitung

#### 1.1. Epidemiologie des Urothelkarzinoms der Harnblase

Das Harnblasenkarzinom ist weltweit die siebthäufigste Krebserkrankung mit 260.000 Neuerkrankungen im Jahr. Männer sind mit einem Verhältnis von 3,5:1 häufiger betroffen als Frauen (Parkin et al. 2005). Die größte Inzidenz des Harnblasenkarzinoms wird in Westeuropa, Nordamerika und Australien beobachtet (Parkin 2008). Insgesamt ist die Prävalenz in Industriestaaten sechsmal höher als in Entwicklungsländern. In Deutschland sind laut Robert-Koch-Institut im Jahre 2006 19.360 Männer und 8.090 Frauen erkrankt. Für das Jahr 2010 ergibt sich einer fünf-Jahres-Prävalenz von 85.800 für Männer und 26.600 für Frauen. Das häufigste Harnblasenkarzinom ist das Urothelkarzinom (Parkin 2008). Das Urothelkarzinom weist eine Vielzahl von histologischen Differenzierungen auf. Die häufigste ist das squamöse gefolgt vom glandulären Urothelkarzinom.

#### 1.2. Ätiologie und Risikofaktoren

Als ein wichtiger Risikofaktor für die Erkrankung am Urothelkarzinom der Harnblase gilt neben einem Patientenalter von über 60 Jahren (Bever et al. 2009) und dem männlichen Geschlecht das Rauchen. Raucher erkranken zwei- bis sechsmal häufiger als Nicht-Raucher (Negri und La Vecchia 2001). Die (berufliche) Exposition gegenüber Schadstoffen wie Benzidin, Naphthylamin, Aminodiphenyl und aromatischen Amine spielt ebenfalls eine wichtige Rolle als Risikofaktor. Der Missbrauch des Schmerzmittels Phenacetin ist assoziiert mit der Entstehung des urothelialen Harnblasenkarzinoms (Cohen et al. 2000).

#### 1.3. Klinik

Die klinische Symptomatik der Erkrankten ist abhängig von der Lokalisation und der Infiltration des Tumors. Klinisch auffällig werden Patienten mit einem Urothelkarzinom der Harnblase zum Beispiel durch Mikrohämaturie, Leukozyturie oder schmerzloser Makrohämaturie, die in ca. 85% der Fälle auftreten. Im Folgenden kann durch geronnenes Blut in der Urethra eine schmerzhafte Miktionsbeschwerden auftreten. Des Weiteren können je nach Tumorausprägung und -lokalisierung Harndrang, Dysurie, Nykturie, Pollakisurie oder auch Nierenstauung und -insuffizienz auftreten. Insgesamt sind die Symptome jedoch meist unspezifisch.

### 1.4. Diagnostik

Diagnostisch sollte zunächst eine körperliche Untersuchung erfolgen. Eine möglichst steril gewonnene Urinprobe sollte mittels Urin-Stix und Urin-Zytologie untersucht werden. Eine Sonographie der Harnwege sollte unbedingt erfolgen. Eine Zystoskopie sollte durchgeführt werden, wobei sichtbare Tumoren durch eine TUR-B (transurethrale Resektion der Harnblase) zur endgültigen Sicherung der Diagnose tiefgehend reseziert werden sollten. Bei der TUR-B sollten auch Gewebeproben aus normal erscheinendem Urothel entnommen werden, um eine mögliche Dysplasie oder ein Carcinoma in situ (CIS) auszuschließen. Beim pathologischen Nachweis eines Harnblasenkarzinoms sollte ein Staging durch Sonographie des Abdomens, i.v. (intravenöse) Urographie, und CT (Computertomographie) oder MRT (Magnetresonanztomographie) erfolgen. Um Fernmetastasen in Lunge oder Skelett zu detektieren, sollten ein Röntgen-Thorax und eine Skelett-Szintigraphie durchgeführt werden. Neuere diagnostische Methoden sind zum Beispiel die Analyse der DNA (Desoxyribonukleinsäure) mittels Flowzytometrie. Immunhistochemisch können tumorassoziierte Antigene auf den Urothelzellen nachgewiesen werden. Schnelltests wie der BTA(Blasentumorantigen)-Test oder ein ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay) können blasentumorassoziierte Proteine detektieren.

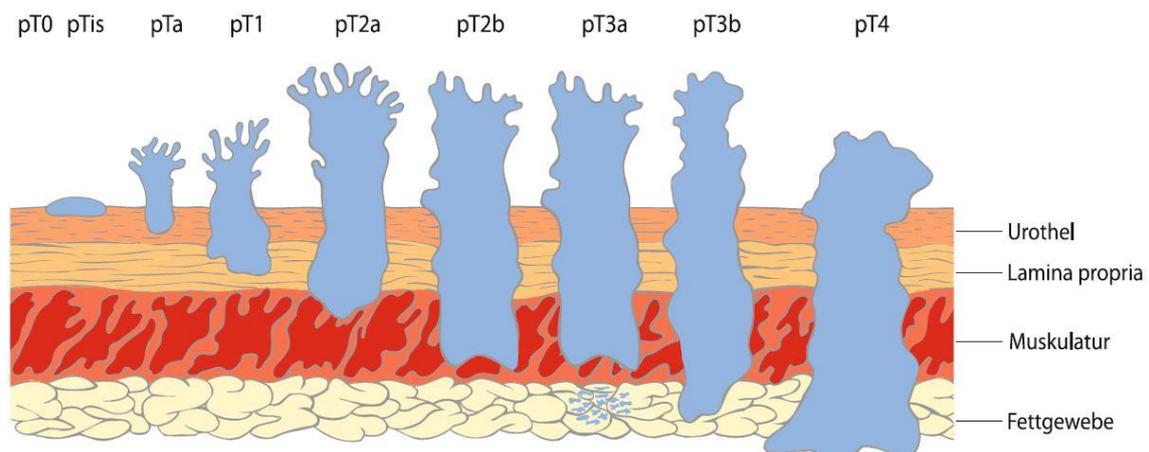
### 1.5. Staging

Die Therapie von Harnblasentumoren richtet sich nach der Tumorklassifikation und dem Staging. Die TNM-Klassifikation (T für Tumor, N für Nodus/Lymphknoten und M für Metastasen) teilt Tumoren im Urothel der Harnblase folgendermaßen ein: Das Stadium CIS bezeichnet maligne entartete Urothelzellen, die sich durch eine flache Ausbreitung auszeichnen und die auf das Urothel begrenzt bleiben, das heißt, die Basalmembran nicht durchbrechen. Als pTa (p für postoperative histopathologische Klassifikation) wird ein exophytisch wachsender, papillärer Tumor, der ebenfalls die Basalmembran nicht durchbricht, bezeichnet. Man unterteilt exophytisch wachsende, nicht invasive Tumoren weiter in das Urothelpapillom, die papilläre Urothel Neoplasie mit niedrigem malignen Potential (PUNLMP), das nicht invasive papilläre Urothelkarzinom (Low Grade; pTa) und das nicht invasive papilläre Urothelkarzinom (High Grade, pTa) (Minner und Sauter 2009). Minimalinvasive Tumoren, die die Basalmembran durchbrechen, nicht aber bis in die Muskelschicht vordringen, werden als pT1 bezeichnet. Tumoren, die bis in die innere Hälfte der glatten Muskelschicht

## 1. Einleitung

vorgedrungen sind, werden als pT2a bezeichnet. Sind sie bis in die äußere Hälfte der Muskelschicht durchgedrungen, nennt man sie pT2b. Ist die perivesikale Fettschicht durch den Tumor erreicht, wird er als pT3a klassifiziert. Ein pT3b Tumor hat das perivesikale Fettgewebe durchbrochen. Das Stadium pT4a bezeichnet die Invasion in die Prostata, den Uterus oder die Vagina. Als pT4b wird ein Tumor klassifiziert, der in das Becken oder die Beckenwand eingebrochen ist.

Der N-Status beschreibt, inwieweit Lymphknotenmetastasen vorliegen: pN1 beschreibt den Befall eines Lymphknotens, der kleiner als 2 cm ist, pN2 den Befall eines Lymphknotens von 2-5 cm oder mehrerer Lymphknoten kleiner als 5 cm und pN3 bezeichnet Lymphknotenmetastasen, die größer als 5 cm sind. Der M-Status bezeichnet das Vorliegen von Fernmetastasen. In Abbildung (Abb.) 1 sind die unterschiedlichen Tumorstadien graphisch dargestellt.



**Abb. 1 TNM-Klassifikation des Harnblasenkarzinoms** (aus: Hertle et al. 2010)

### 1.6. Therapie

Das CIS wird transurethral entfernt und anschließend mit intravesikaler BCG-Instillation (Bacillus-Calmette-Guérin) als Langzeittherapie behandelt. Als Therapiekontrolle dienen Urinzytologie und vierteljährliche Kontrollzystoskopien. Das pTa-Karzinom wird transurethral mittels elektrischer Schlinge komplett reseziert. Tumorrand und -grund werden getrennt reseziert und histologisch untersucht. Im Resektat sollte Muskulatur enthalten sein, um eine tumoröse Muskelinvasion auszuschließen. Des Weiteren sollten randomisierte Biopsien entnommen werden. Bei Grad 2- und Grad 3-Tumoren sollte eine Rezidivprophylaxe mit Mitomycin oder BCG erfolgen. Diskutiert wird auch die komplette Zystektomie beim nicht invasiven papillären Urothelkarzinom (High Grade) und beim CIS. Die Abwägung zwischen

Rezidiv- und Progressionsrisiko und den Risiken dieses stark invasiven und folgenschweren Eingriffs ist jedoch individuell zu treffen. Das Gleiche gilt für pT1-Tumoren. Derzeit steht es zur Diskussion, bei allen histologisch abgesicherten pT1-Tumoren eine radikale Zystektomie im Gegensatz zur nach Grading erfolgenden transurethralen Resektion durchzuführen. Ein Problem dabei stellt jedoch die hohe Interobservervariabilität von bis zu 35% dar (Hautmann et al. 2009; Tosoni et al. 2000). Lokalinvasive Tumorstadien wie pT2, pT3a und pT3b werden mittels radikaler Zystektomie therapiert. Bei Frauen werden vordere Vaginalwand und eventuell Adnexen und Uterus mit entfernt; beim Mann Prostata, Samenblase und Urethra. Dazu erfolgt eine Lymphadenektomie. Eventuell kann die Zystektomie mit adjuvanter oder neoadjuvanter Chemotherapie kombiniert werden. Die Blasenteilresektion spielt nur eine untergeordnete Rolle. Das bereits metastasierte Harnblasenkarzinom kann chemotherapeutisch behandelt werden (Hertle et al. 2010).

### 1.7. Prognose

Es gibt verschiedene morphologische und molekulare Marker, die beim Harnblasenkarzinom prognostisch von Bedeutung sind und im Folgenden beschrieben werden.

#### 1.7.1. Invasivität und Tumormorphologie

Verschiedene Faktoren können Aufschluss über die Prognose eines Erkrankten geben. Die Invasionstiefe, ausgedrückt durch das T-Stadium, ist Teil der TNM-Klassifikation. Um eine Aussage bezüglich der Prognose eines am Harnblasenkarzinom erkrankten Patienten treffen zu können, können in erster Linie diese morphologischen Faktoren herangezogen werden: Zunächst kann in Bezug auf klinische Prognose und zugrunde liegenden molekularen Mechanismen zwischen zwei Gruppen unterschieden werden: Nicht-invasive, papilläre Tumore, deren Wachstum auf dem Mechanismus der Hyperplasie beruht, bilden ca. 80% der Urothelkarzinome. Sie sind zwar häufig multifokal und neigen zu Rezidiven, nicht jedoch zum invasiven Wachstum. Bei frühzeitiger chirurgischer Therapie und intravesikaler Immuntherapie liegt die fünf-Jahres-Überlebensrate bei 90% (Wu 2005). Zu dieser Gruppe gehören das Urothel-Papillom, die PUNLMP und das nicht invasive papilläre Urothelkarzinom (Low Grade; pTa) (Sauter et al. 2004). Dabei hat das Urothel-Papillom die beste Prognose und das niedrigste Risiko des Rezidivs oder der Progression (Cheng et al. 1999; McKenney et

al. 2003), während PUNLMP ein höheres Risiko des Rezidivs aufweisen, jedoch in niedrigerem Ausmaß als nicht invasive papilläre Karzinome (Sauter et al. 2004). Das Risiko des Wiederauftretens des nicht invasiven papillären Karzinoms liegt zwischen 48 und 71% (Alsheikh et al. 2001; Holmang et al. 2001; Holmang und Johansson 2002) eine Progression tritt allerdings eher selten auf (Sauter et al. 2004). Multifokalität und Größe des Tumors verschlechtern ebenfalls die Prognose.

Die zweite Gruppe bilden ca. 20% der Urothelkarzinome. Sie sind muskelinvasiv (pT2-pT4) und entwickeln sich meistens über eine flache Dysplasie oder ein CIS. Trotz Therapie versterben etwa 50% dieser Patienten. Metastasierte invasive Urothelkarzinome haben eine fünf-Jahres-Überlebensrate von nur 6 % (Wu 2005). Schon die alleinige Präsenz von einer flachen Dysplasie oder einem CIS sind mit erhöhtem Risiko der Progression, des Rezidivs und des Versterbens verbunden, wobei primäre CIS mit einer besseren Prognose verbunden sind als sekundäre (Orozco et al. 1994).

Als pT1 klassifizierte Tumore sind prognostisch schwieriger einzuordnen. Sie weisen ähnliche genetische Veränderungen auf wie Tumore, die als pT2 oder höher klassifiziert wurden und haben ein hohes Progressionsrisiko (Reddy et al. 2006). Hinzu kommen regelmäßig diagnostische Probleme in der histopathologischen Differenzierung zwischen nichtinvasiven und minimalinvasiven Tumoren, die die prognostische Aussage beeinträchtigen (Abel et al. 1988; Minner und Sauter 2009; Tosoni et al. 2000; Witjes et al. 1994). Auch ist es von Bedeutung, ob innerhalb der Lamina propria die Muscularis mucosae durchbrochen wurde (Hasui et al. 1994; Younes et al. 1990).

Des Weiteren können aus pTa-Tumoren mit High-Grade-Differenzierung auch invasive Karzinome entstehen, vermutlich über eine parallele Dys- und Hyperplasie des Urothels (Knowles et al. 2009). Diese Tumoren rezidivieren häufig und progressieren in 10-20% der Fälle zu invasiven Karzinomen (Knowles 2006). Sie gehören eher zu der zweiten Gruppe mit schlechterer Prognose.

### **1.7.2. Infiltration von Blut- und Lymphgefäßen**

Lymphovaskuläre Invasion kann ebenfalls als prognostischer Faktor herangezogen werden. Patienten mit nachgewiesener tumoröser Infiltration der Lymph- und Blutgefäße weisen eine signifikant erhöhte Rezidivrate (Hosomi et al. 2009), Progression und vermehrte Metastasierung auf (Cho et al. 2009). Die Form des

Tumorwachstums ist ebenfalls wichtig; wächst der Tumor als einheitliche Front, ist dies prognostisch günstiger als das Wachstum mit Ausläufern (Jimenez et al. 2000).

### **1.7.3. Resektionsrand**

Weiteren Einfluss auf die Prognose hat die Qualität des Resektionsrands nach radikaler Zystektomie: Sind im verbleibenden Gewebe noch Tumorreste vorhanden, ist dies mit einer schlechteren Überlebensrate verbunden (Dotan et al. 2007).

### **1.7.4. Genetische Prognosefaktoren**

Genetische Veränderungen stellen einen wichtigen Prognosefaktor in der Onkologie dar. Beim Harnblasenkarzinom weisen invasive oder High-Grade-Tumore (pT1-4, pTaG3, CIS) genetisch unterschiedliche Veränderungen im Gegensatz zu nicht invasiven papillären Neoplasien (pTa G1-G2, PUNLMP, Papillome) auf. Diese papillären Neoplasien haben wenig genetische Veränderungen und werden daher als genetisch stabil bezeichnet (Richter et al. 1998). Im Gegensatz dazu gilt erstgenannte Gruppe als genetisch instabil (Minner und Sauter 2009). Daher soll hier ein separater Überblick der genetischen Veränderungen dieser beiden prognostisch unterschiedlichen Tumorgruppen gegeben werden.

#### **1.7.4.1. Invasive und genetisch instabile Harnblasenkarzinome**

##### **1.7.4.1.1. Alterationen auf Chromosomenebene**

Beim invasiven, genetisch instabilen Harnblasenkarzinom wurden mit Hilfe der CGH (Comparative genomic hybridization) oder cytogenetischen Markern 7-10 Veränderungen festgestellt: Zusammengefasst wurden Veränderungen in 2q, 5q, 8p, 9p, 9q, 10q, 11p, 18q, 1q, 5p, 8q, 17q und auf dem Y-Chromosom nachgewiesen (Richter et al. 1998). Aneuploidie tritt beim Harnblasenkarzinom in mehr als 90% auf (Sauter et al. 1997; Zhang et al. 1997).

##### **1.7.4.1.2. Onkogene**

Obwohl schon einige relevante Onkogene identifiziert wurden, steht die Entdeckung eines charakteristischen Gens, welches eine Aussage über Prognose und Entwicklung des invasiven Harnblasenkarzinoms zulässt, bis heute noch aus. Bisher entdeckte Onkogene, die beim Urothelkarzinom der Harnblase aktiviert sein können, werden im Folgenden zusammenfassend aufgeführt:

Die Transmembranrezeptor-Tyrosinkinase Her2/neu wurde in verschiedenen Studien als überexprimiert nachgewiesen. Die vermehrte Expression beruht teils auf Amplifikation (10-20%), größtenteils (10-50%) ist der Mechanismus noch ungeklärt (Orlando et al. 1996; Ravery et al. 1997). Die prognostische Bedeutung ist unklar, jedoch scheint es einen Zusammenhang zwischen der Expression des Her2-Proteins und einer besseren Überlebensrate bei auf Paclitaxel basierender Chemotherapie zu geben (Gandour-Edwards et al. 2002). Aus der Ras-Onkogen-Familie wurde insbesondere bei H-ras eine Relevanz für das Harnblasenkarzinom festgestellt (Boulalas et al. 2009). H-ras-Mutationen wurden je nach Methode in bis zu 45% der Harnblasenkarzinome nachgewiesen (Orntoft und Wolf 1998). EGFR (Epidermal-Growth-Factor-Receptor) ist eine transmembrane Tyrosinkinase, die beim Harnblasenkarzinom in bis zu 3-5% der untersuchten Fälle amplifiziert und in bis zu 50% überexprimiert ist (Sauter et al. 1994). Auch das auf 11q13 liegende Cyclin-D1-Gen ist häufig amplifiziert (10-20%) oder überexprimiert (30-50%) (Habuchi et al. 1994; Wagner et al. 1999). Das MDM-2 Gen kodiert u.a. für eine indirekte Aktivierung der Transkription. Das dazugehörige Protein wurde in 10-40% der untersuchten Fälle vermehrt detektiert (Pfister et al. 1999; Schmitz-Drager et al. 1997).

### **1.7.4.1.3. Tumorsuppressorgene**

Für die invasiven Harnblasenkarzinome wurden auch einige Tumorsuppressorgene untersucht, die möglicherweise von Relevanz sind.

Mutationen des Gens TP53 wurden mit der Entstehung des Harnblasenkarzinoms in Verbindung gebracht, wobei 90% der Mutationen auf den Exons 4-9 liegen. Laut einer Studie weisen 40-60% der invasiven Harnblasenkarzinome Mutationen in diesem Gen auf (Lu et al. 2002). Der immunhistochemische Nachweis von p53-Positivität findet praktischen Nutzen in der Pathologie und wurde als prognostischer Marker diskutiert. Mehrere Studien zeigten eine Assoziation von Veränderungen in der p53-Expression, Tumorgrad und -stadium sowie Patientenprognose (Cordon-Cardo et al. 1994; Esrig et al. 1994; Lipponen 1993), jedoch konnten andere Studien diese prognostische Bedeutung nicht belegen (Peyromaure et al. 2002). Eine Inaktivierung des auf 13q14 lokalisierte Tumorsuppressorgens RB1 wird in 30-80% der muskelinvasiven Blasenkarzinome nachgewiesen, meist als Kombination aus heterozygoter Deletion und Mutation auf dem anderen Allel (Cordon-Cardo und Reuter 1997). Möglicherweise

spielt seine Alteration eine prognostische Rolle für ein reduziertes Überleben der Patienten (Logothetis et al. 1992).

Das Tumorsuppressorgen PTEN könnte möglicherweise ein wichtiger prognostischer Faktor sein. Da sich diese Arbeit explizit diesem Thema widmet, wird darauf später detailliert eingegangen.

### **1.7.4.1.4. Proteine für DNA-Reparatur**

Die Veränderung von Genen, die für die DNA-Reparatur zuständig sind, scheinen beim Harnblasenkarzinom eher selten betroffen (2,2%) (Hartmann et al. 2002). Zur Diskussion steht auch die prognostische Aussage einer veränderten COX-2-Expression (Wild et al. 2005).

### **1.7.4.2. Genetisch stabile Urothel-Neoplasien (Low Grade)**

Für die nicht-invasiven Urothel-Neoplasien (Low Grade) ist es schwierig, aufgrund von Genveränderungen prognostische Aussagen zu treffen.

Relativ häufig tritt der totale oder partielle Verlust von Chromosom 9 auf (Simon et al. 1998). Dies tritt jedoch auch bei Hyperplasie oder sogar normalem Urothel auf, was diesen Faktor als prognostisch nicht sinnvoll auszeichnet. In papillären Low Grade-Tumoren finden sich häufig Mutationen im FGFR3-Gen (Fibroblast Growth Factor-Receptor-Gen) (Hodges et al. 2010). Der Verlust des Y-Chromosoms ist ebenfalls relativ häufig in Low Grade-Tumoren, seine biologische Signifikanz ist jedoch ebenfalls unklar (Minner et al. 2010). Flache Low Grade-Neoplasien weisen häufig Veränderungen der Inhibitoren der CDK (Zyklus abhängigen Kinasen) wie p15, p16(9q21) und p21 auf (Keen und Knowles 1994). Die Expression von Cytokeratin 20 könnte ebenfalls einen Einfluss auf die Rezidivrate haben (Harnden et al. 1995).

Genetische Anhaltspunkte für Progression von Tumoren dieser nicht invasiven Zellveränderungen sind noch schwieriger zu identifizieren, da die Progressionsrate sehr niedrig ist.

## **1.8. Das Tumorsuppressorgen PTEN**

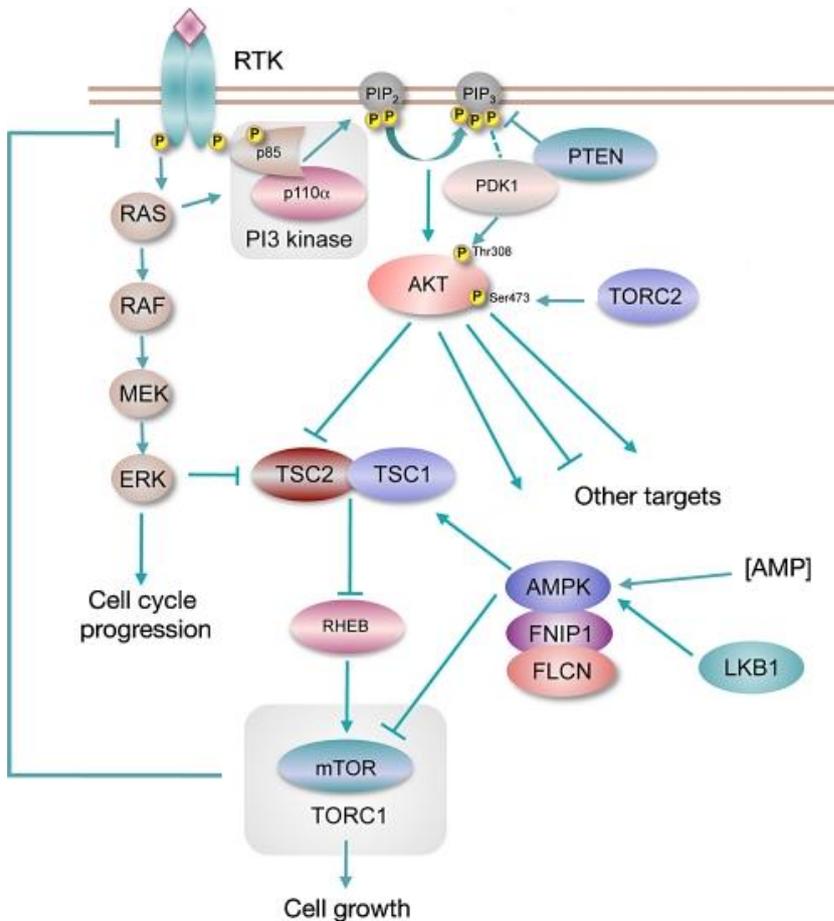
Die molekularen Mechanismen, die der Kanzerogenese zu Grunde liegen, bieten in der modernen Onkologie wichtige Angriffspunkte für Medikamente. Der Bedarf an so genannten genspezifischen Therapeutika, die an besonders relevanten Stellen dieser

Signalkaskaden eingreifen und sie gezielt attackieren, gewinnt für die Stadienspezifische onkologische Therapie immer mehr an Bedeutung.

### 1.8.1. Der PI3-Kinase-Signalweg

Studien haben den PI3(Phosphatidylinositol 3)-Kinase-Signalweg als wichtige molekulare Grundlage von Zellwachstum, -proliferation und -überleben identifiziert. Bei verschiedenen Tumoren wurden spezifische genetische Veränderungen der Bestandteile dieses Signalwegs festgestellt, was für die onkologische Therapie genutzt werden kann.

Die PI3-Kinase ist ein Heterodimer, welches aus einer katalytischen (p110) und einer regulativen (p85) Untereinheit besteht. Sie kann von einer aktivierten Rezeptor-Tyrosinkinase über die p85-UE (Untereinheit) rekrutiert werden. Die daraufhin aktivierte katalytische Untereinheit kann PIP<sub>2</sub> (Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat) zu PIP<sub>3</sub> (Phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphat) phosphorylieren. Das Produkt des Tumorsuppressorgens Phosphatase and Tensin homolog (PTEN) kann die gegenläufige Reaktion katalysieren, also PIP<sub>3</sub> zu PIP<sub>2</sub> dephosphorylieren und so die darauf folgende Signalkaskade bremsen. PIP<sub>3</sub> rekrutiert PKB (AKT) (Proteinkinase B) und PDK 1 zur Plasmamembran. AKT wird hier durch PDK1 oder TORC 2 phosphoryliert. Die Phosphorylierung kann auch im Zellkern durch eine DNA-PK (Proteinkinase) erfolgen. Von hier aus werden weitere Signalwege gehemmt oder aktiviert, die zur Zellproliferation, Stoffwechselaktivität oder Hemmung von Apoptose führen (Knowles et al. 2009). Unter anderem führt die Aktivierung des PI3-Kinase-Signalwegs zur Aktivierung des mTor-Signalwegs. Abb. 2 zeigt den PI3-Kinase-Signalweg.



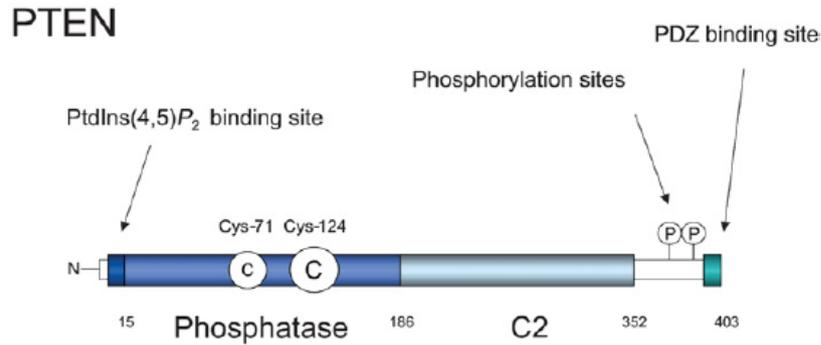
**Abb. 2: Der Phosphatidylinositol 3-Kinase-Signalweg** (aus: (Knowles et al. 2009))

## 1.8.2. Tumorsuppressorgen Phosphatase and Tensin homolog - PTEN

Das Gen PTEN befindet sich auf Chromosom 10q23. Es enthält neun Exons. Das Genprodukt von PTEN ist eine multifunktionelle Phosphatase, deren physiologisches Hauptsubstrat PIP3 ist. Sie kann als Lipidphosphatase sowie als Proteinphosphatase agieren.

Die Hauptfunktion von PTEN ist die katalytische Dephosphorylierung von PIP3 zu PIP2. So kann die darauf folgende Signalkaskade des PI3-Kinase-Signalwegs gebremst werden.

PTEN umfasst 403 Aminosäuren, gehört zu der PTP(Protein-Tyrosin-Phosphatase)-Familie und besitzt eine C- und eine N-Domäne, die gemeinsam eine katalytische Untereinheit bilden (Abb. 3) (Leslie und Downes 2004). Das Protein PTEN kann auch andere Proteine dephosphorylieren. Es ist entweder an der Zellmembran, im Zytoplasma oder auch im Zellkern lokalisiert, wo es zusätzliche tumorsuppressive Funktionen haben könnte (Planchon et al. 2008).



### Abb. 3: Das PTEN-Protein

Dargestellt ist das 403 Aminosäuren große Protein PTEN. Die Phosphatase- und die C2-Domäne haben enzymatische Funktion. Die Cystein-Reste (Cys-71 und Cys-124) bilden bei Oxidierung eine reversible Disulfidbrücke. Der N-Terminus links bindet PIP<sub>2</sub>. Am C-Terminus (rechts) wird PDZ gebunden und phosphoryliert (p) (Leslie und Downes 2004).

### 1.8.3. Die Bedeutung von PTEN für die Tumorgenese

AKT stellt einen Knotenpunkt in der Signalkaskade dar, da seine Aktivierung einen Einfluss auf viele wichtige zelluläre Prozesse wie den Zellzyklus, Zellwachstum, Energiestoffwechsel und Resistenz gegen Apoptose zur Folge hat. (Knowles et al. 2009). PTEN und der PI3-K-Signalweg halten also unter anderem die Zellproliferation im Gleichgewicht. Dieses Gleichgewicht kann durch verschiedene Mechanismen gestört werden, beispielsweise durch eine übermäßig aktive PI3-K (z.B. durch Genamplifikation) oder durch inaktivierende Deletionen oder Mutationen des Genlokus (10q23) von PTEN. Dieses könnte die Tumorentstehung begünstigen. Entsprechende genetische Veränderungen von PTEN wurden bereits unter anderem in Glioblastomen, Mamma- oder Prostata-Karzinomen nachgewiesen.

Eine Reihe von genetischen Erkrankungen, zusammengefasst unter dem Akronym PHTS (PTEN Hamartoma Tumour Syndrome), weist genetische Veränderungen von PTEN auf und ist assoziiert mit dem vermehrten Auftreten von verschiedenen Tumorerkrankungen. Dazu gehören das Cowden Syndrom (CS), das Bannayan-Riley-Ruvalcaba Syndrom (BRRS), das Proteus Syndrom (PS) und das Proteus-like Syndrom. Beim CS treten beispielsweise vermehrt Tumore der Schilddrüse, der Brust und des Endometriums auf (Eng 1993). Dies unterstreicht die Bedeutung von PTEN als Tumorsuppressorgen.

In unserem Institut wurde im Vorfeld eine Array-CGH-Analyse von Harnblasenkarzinomen durchgeführt. Dabei zeigte sich, dass tatsächlich Deletionen bei

PTEN auftreten und dass es somit interessant ist, genauere Studien zur Deletionsfrequenz von PTEN durchzuführen.

### **1.8.4. Stand der Forschung zu PTEN**

Verschiedene Studien haben sich mit der Rolle der Region 10q und PTEN im Besonderen beim Harnblasenkarzinom beschäftigt. Im Folgenden sollen diese nach Methoden geordnet zusammengefasst werden.

#### **1.8.4.1. LOH-Analysen**

Vor allem frühe Studien wurden mittels LOH(Loss of Heterozygosity)-Analyse durchgeführt. In diesen Studien wurde eine recht große Varianz des Vorkommens der Deletionen auf Chromosom 10q, die auch die PTEN-Region einschließen, aufgezeigt. Zwischen 8,5 und 45% LOH wurden in 20-285 Tumoren detektiert (Aveyard et al. 1999; Cairns et al. 1998; Cappellen et al. 1997; Kagan et al. 1998; Knowles et al. 1994; Platt et al. 2009). Manchmal konnte ein vermehrtes Auftreten von Deletionen von PTEN in invasiven Karzinomen, das heißt in höheren Stadien, nachgewiesen werden (Aveyard et al. 1999; Kagan et al. 1998). Bei Low Grade- und nicht invasiven Urothelkarzinomen waren diese nur unregelmäßig zu finden.

#### **1.8.4.2. FISH-Analysen**

Bislang wurde die FISH (Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung)-Analyse kaum als Methode zur Detektion von PTEN-Deletionen beim Harnblasenkarzinom durchgeführt. Wang et al. fanden in zwölf Tumoren eine Deletionsfrequenz von Chromosom 10 von 50% (Wang et al. 1994).

In anderen Geweben, z.B. der Prostata, wurden FISH-Analysen zu PTEN durchgeführt, die in ihren Ergebnissen diskrepant (20,2%-77%) ausfielen (Krohn et al. 2012; Sircar et al. 2009; Verhagen et al. 2006; Yoshimoto et al. 2007).

#### **1.8.4.3. Array-CGH**

Anhand von Array-CGH wurde in Studien bei 22-160 Tumoren der Verlust von 10q23 inklusive PTEN untersucht. Die Deletionsfrequenz schwankte zwischen 3 und 52% (Blaveri et al. 2005; Hurst et al. 2004; Hurst et al. 2012; Platt et al. 2009).

### 1.8.4.4. Immunhistochemie/Western Blot-Studien

Verschiedene Studien haben den Einfluss von PTEN anhand der Proteinexpression des Gens in 29-887 Fällen untersucht. Dies wurde entweder durch Western-Blot oder durch Immunhistochemie (IHC) durchgeführt. Es wurde gezeigt, dass die Expression des PTEN-Proteins beim Urothelkarzinom häufig, jedoch mit starken Schwankungen, reduziert ist (zwischen 13,7 und 53%).

In einer Studie zeigten beispielsweise 20 von 130 invasiven Tumoren eine deutlich verminderte Expression des PTEN-Proteins. Hier konnte gezeigt werden, dass möglicherweise die Mutation von p53 mit genetischen Veränderungen der PTEN-Region assoziiert ist. 41% der Tumore, die Veränderungen in p53 aufwiesen, zeigten ebenfalls Veränderungen in PTEN. Patienten mit diesen kombinierten genetischen Veränderungen hatten auch eine schlechtere Prognose (Puzio-Kuter et al. 2009). In Abhängigkeit von Grad und Stadium konnte auch ein unterschiedliches Maß an PTEN-Expression festgestellt werden (Harris et al. 2008). Besonders bei muskelinvasiven Tumoren konnte eine verminderte Expression des PTEN-Proteins festgestellt werden (Han et al. 2008; Harris et al. 2008; Koksai et al. 2005; Lee et al. 2012). Sun et al. untersuchten eine hohe Tumoranzahl (n=887) und fanden ebenfalls eine signifikante Verminderung der PTEN-Expression abhängig nach Tumorgrad und -stadium (Sun et al. 2011).

Eine Studie zeigte in 42% des untersuchten Tumorgewebes ein Fehlen des PTEN-Proteins und in 7,5% eine reduzierte PTEN-Expression. Die PTEN-Expression korrelierte negativ mit dem Tumorstadium. Fortgeschrittene Tumoren wiesen weniger PTEN-Protein auf als weniger hohe Stadien. Harnblasenkarzinome mit unterschiedlichen Differenzierungen zeigten einen größeren Verlust von PTEN als reine Urothelkarzinome auf. Eine positive Korrelation war mit phosphoryliertem AKT zu beobachten (Schultz et al. 2010).

Die direkte Aktivierung des PI3-Kinase-Signalwegs wurde in einer Studie anhand der Menge von phosphorylierter AKT untersucht. In 55% der untersuchten Fälle wurde eine signifikant größere Menge an phosphorylierter AKT nachgewiesen (Wu et al. 2004).

Bei Untersuchungen bezüglich der unterschiedlichen Expression des PTEN-Proteins im Zellkern und im Zytoplasma wurde festgestellt, dass vor allem die Menge von PTEN-Protein im Zellkern reduziert war. Dabei war das Maß der Expressionsverminderung assoziiert mit höherem Grad, Stadium oder beidem (Platt et al. 2009; Tsuruta et al. 2006).

### 1.8.4.5. Mutationsanalysen

Mit Hilfe von Mutationsanalysen haben verschiedene Studien die genaue Gensequenz der Exons von PTEN in 11-145 Fällen untersucht. Der Anteil an Mutationen variierte zwischen 0 und 27% der Fälle (Aveyard et al. 1999; Cairns et al. 1998; Liu et al. 2000; Sjö Dahl et al.; Wang et al. 2000). Mutationen zeigten häufig einen Zusammenhang mit höherem Grad und Stadium.

Die nur unregelmäßige Detektion von Ausfällen beider Allele von PTEN in oben genannten Studien legt nahe, dass andere molekulare Mechanismen als Punktmutationen zur Inaktivierung der tumorsuppressiven Funktion beitragen könnten. Haploide Insuffizienz könnte dazu führen, dass der Ausfall nur eines Allels ausreicht, um die Funktion von PTEN in der Zelle zu stören. Methylierung als Mechanismus zur Ausschaltung der Expression des Gens wurde bei der Prostata nachgewiesen (Whang et al. 1998) und könnte auch beim Harnblasenkarzinom eine Rolle spielen. Eine simple Erklärung wäre, dass PTEN zwar heterozygot deletiert ist, dies jedoch nicht der Grund für die Tumorentstehung ist und der Fokus der Kanzerogenese an anderer Stelle des Zellzyklus zu suchen ist.

### 1.8.4.6. Weitere Studien

Andere Studien haben den Zusammenhang von PTEN-Aktivierung und -Deaktivierung in Zusammenhang mit anderen für den Zellzyklus wichtigen Bestandteilen von Signalwegen untersucht.

Eine Studie zeigte bei PTEN-defizienten Mäusen eine hohe Zellproliferation im Urothel, welche durch die Induktion von p21 gehemmt werden konnte (Yoo et al. 2006). Ebenfalls konnte eine erhöhte Zellzahl im Urothel nachgewiesen werden, die kompatibel mit mTOR- und PI3K-Signalweg-Aktivierung war. Die Mäuse entwickelten vor allem papilläre, oberflächliche Tumore, was zusätzlich durch den Einsatz von Butyl-N-Nitrosaminen provoziert werden konnte (Tsuruta et al. 2006). Wenn PTEN- und/oder p53-Deletion induziert wurde, führte nur die Deletion beider Gene zugleich zu einer frühzeitigen Entwicklung von aggressiven, häufig metastasierenden Tumoren (Puzio-Kuter et al. 2009). Durch Rapamycin konnte bei Mäusen mit PTEN- und p53-Deletionen der Übergang von CIS zu muskelinvasiven Blasen Tumoren verhindert werden, was auf ein Zusammenspiel des mTOR- mit dem PI3K-Signalweg hindeutet (Seager et al. 2009). Neshat et al. kamen zu ähnlichen Ergebnissen (Neshat et al. 2001). Eine andere Studie zeigte, dass PTEN gemeinsam mit dem Tumorsuppressorgen Lkb1

die Tumorgenese durch Hemmung des mTOR-Signalwegs blockieren könnte (Shorning et al. 2011).

Auch ein Zusammenhang mit dem Wnt-Signalweg wurde aufgezeigt: Die Aktivierung des Signalwegs bei gleichzeitiger Deaktivierung von PTEN führte bei Mäusen zur Entstehung von papillären Urothelkarzinomen (Ahmad et al. 2012).

Diese Studien legen nahe, dass eine alleinige Repression von PTEN nicht ausreicht, um Tumorentstehung zu verursachen. Wahrscheinlicher scheint hier die Kombination des Funktionsverlusts von zwei oder mehreren Tumorsuppressorgenen.

Weiterführende Studien, die bereits mehr auf die Verwendung der tumorsuppressiven Funktion von PTEN in der Gentherapie abzielten, haben durch Induktion die therapeutische Relevanz von PTEN getestet. In einer Studie ist es gelungen, das PTEN-Protein in Zelllinien einzuschleusen, wobei eine Reduktion der Tumorentstehung von 40% beobachtet werden konnte. Auch konnte die Empfindlichkeit einer Doxorubicin-resistenten Zelllinie gegenüber dem Chemotherapeutikum dadurch gesteigert werden (Tanaka et al. 2000). Mit Hilfe eines Adenovirus eingeschleustes PTEN führte zur Induktion von Caspasen und somit zur Apoptose (Wu et al. 2007). Das Einschleusen des PI3K-Inhibitors LY294002 hemmte in unabhängigen Studien die Invasivität von mehreren Zellreihen, die alle PTEN-Defekte hatten (Kanda et al. 2009; Wu et al. 2004).

### **1.9. Fragestellung und Zielsetzung**

Die Bedeutung von PTEN in den molekularen Mechanismen der Tumorentstehung ist also noch nicht geklärt. Viele Studien jedoch weisen auf seine Relevanz im Prozess der Tumorentstehung beim Harnblasenkarzinom hin. Sollte das Tumorsuppressorgen eine entscheidende Rolle in der Tumorgenese spielen, könnten sich dadurch interessante Angriffspunkte für die moderne onkologische Therapie ergeben.

Die Bedeutung von PTEN als klinisch wichtiger prognostischer Faktor ist noch nicht absehbar. Bisher wurde seine Bedeutung mit Hinblick auf längerfristige prognostische Daten nicht ausreichend untersucht.

Nach der Knudson-Hypothese reicht bei Tumorsuppressorgenen die Deletion eines Allels nicht aus, um ein Funktionsverlust des zugehörigen Proteins in der Zelle zu verursachen. Beide Allele müssen außer Kraft gesetzt sein, damit das jeweilige Protein seine Funktion nicht mehr ausführen kann. Im Falle von PTEN weisen jedoch einige Studien darauf hin, dass bereits die Deletion eines Allels ausreicht, um seine Funktion als Antagonist zum PI3-Kinase-Signalweg außer Kraft zu setzen. Diese Unfähigkeit

eines diploiden Gens, bei Funktionsverlust eines Allels für ein regelrechtes Protein zu kodieren, wird als Haploinsuffizienz bezeichnet. Eventuell könnten Punktmutationen oder Methylierung der DNA zu einem Funktionsverlust des verbliebenen Allels beitragen. Welche Mechanismen genau zu diesem Funktionsverlust beitragen könnten, ist aber ebenfalls noch unklar.

In dieser Arbeit soll die Bedeutung der Deletion von PTEN für die klinische Prognose beim Harnblasenkarzinom untersucht werden. Dafür soll eine retrospektive Studie von Patienten mit Harnblasenkarzinom in Form eines TMA (Tissue-Microarray) mit vorhandenen klinischen Prognosedaten in Hinblick auf Überleben, Progression und Rezidiv mittels der FISH-Analyse untersucht werden.

Mit der FISH-Analyse sollen homo- oder heterozygote Deletionen von PTEN in Tumorgewebespots nachgewiesen und eventuelle Zusammenhänge mit Tumorstadium, -grad und den klinischen Verlaufsdaten der Patienten aufgezeigt werden.

Zusätzlich soll aus ausgewählten, mittels FISH als heterozygot deletiert definierten Tumorgeweben DNA isoliert werden. Um Aufschluss über die Rolle des verbliebenen Allels zu erhalten, soll anschließend eine Analyse der Basensequenz aller Exons von PTEN durchgeführt werden. So können eventuelle Punktmutationen detektiert werden.

### 2. Material und Methoden

#### 2.1. Gewebe und Patienten

Zur Herstellung der TMAs wurden 304 in Paraffinblöcke eingebettete Urothelkarzinome der Harnblase aus dem Archiv des Instituts für Pathologie des UKE (Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf) verwendet. Tab. (Tabelle) 1 zeigt die Zusammensetzung des TMAs.

**Tab. 1: Harnblasen TMA (Hamburg, BLA 1.2 A1)**

		<i>n (Anzahl) auf TMA</i>
Alle Tumoren		304
Histologie	urothelial	304
Stadium	pT1	147
	pT2	157
Grad	G1	1
	G2	100
	G3	203

Zusätzlich wurde ein bereits fertiger TMA aus dem Universitätsspital Basel mit Harnblasenkarzinomen aller Stadien als Prognose-Array hinzugezogen. Zu diesem TMA sind klinische Verlaufsdaten bezüglich Tumorstadium, Grad, Rezidiv, Progression, Überleben (roh) und tumorspezifisches Überleben der PatientInnen vorhanden. Tumoren mit Stromainvasion aber ohne Anschnitt der Muskelschicht im Präparat wurden als pT1 bezeichnet. Die pTa-Tumoren wurden unter dem prognostischen Gesichtspunkt des Auftretens eines Rezidivs beurteilt. Ein Rezidiv wurde als in der Zystoskopie sichtbarer neuauftretener Tumor definiert. Für die pT1-Tumoren wurde die Zeit bis zur Progression, d.h. Veränderung des Tumorstadiums zu pT2 oder höher, als Endpunkt der Studie betrachtet. Die Tumoren wurden nach der alten WHO-Klassifikation (World Health Organization-Klassifikation) gradiert, da diese vor 2004 vorgenommen wurde. Tab. 2 stellt die Zusammensetzung dieses TMAs dar.

**Tab. 2: Harnblasen TMA (Basel)**

\*nur Urothelkarzinome

		<i>n auf TMA</i>
Alle Tumoren		759
Histologie	urothelial	686
	plattenepithelial	29
	kleinzellig	19
	sarkomatoid	14
	adeno	11

## 2. Material und Methoden

		<i>n auf TMA</i>
Stadium	pTa	316
	pT1	180
	pT2-4	268
Grad*	G1	82
	G2	300
	G3	304
Stadium und Grad*	pTa G1	82
	pTa G2	185
	pTa G3	48
	pT1 G2	70
	pT1 G3	94
	pT2-4 G2	45
	pT2-4 G3	162

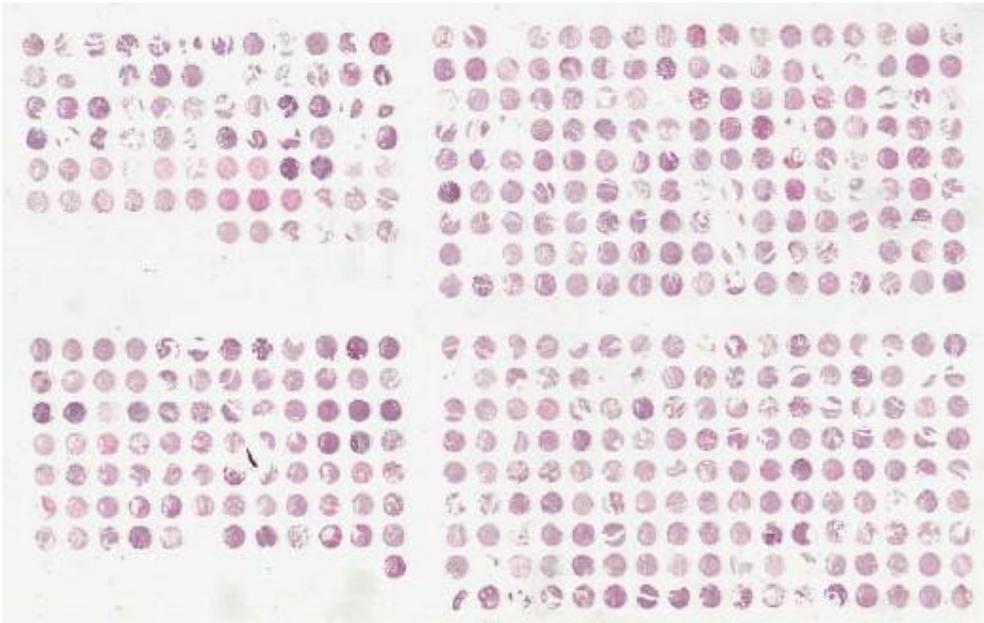
### 2.2. Herstellung der Tissue-Microarrays

Zu jedem in Paraffin eingebetteten Tumorgewebe existiert ein mit HE (Hämatoxylin-Eosin) gefärbter Schnitt, auf dem das Tumorareal eingezeichnet wurde.

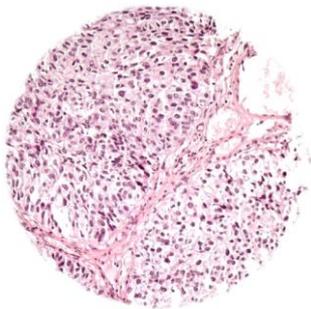
Zu den geeigneten, aus den Archiven der Pathologie herausgesuchten Tumorschnitten und -blöcken wurde eine Tabelle, ein sogenanntes „Punchfile“ erstellt, indem die Anordnung der Gewebe-Spots auf dem TMA festgelegt wurde. Dazu wurde ein mit Koordinaten beschriftetes Raster, ein „Cartoon“, angefertigt, das die geplante Anordnung der Gewebe-Spots auf dem Slide zeigt. Im Punchfile werden sowohl Identifikationsnummern des Gewebes, deren Lokalisation und die realen Koordinaten auf dem TMA angegeben.

Mit Hilfe der spitzen Kanüle eines Array-Stanzgeräts wurde in einen leeren Empfängerblock aus „Peel-A-Way“ (Polysciences Inc., Pennsylvania, USA (United States of America)) bei Zimmertemperatur ein Hohlzylinder mit 600µm äußerem Durchmesser ausgestanzt. Aus dem jeweiligen Tumorblock, dem Donor-Block, wurde aus dem auf dem dazugehörigen Tumorschnitt markierten Areal ebenfalls ein Zylinder von 600µm innerem Durchmesser mit der zweiten Kanüle ausgestanzt. Mit Hilfe des Stanzgeräts wurde dieser genau in das vorgefertigte Loch im Empfängerblock platziert. Die exakte Positionierung in Tiefe und Breite ist dabei von großer Wichtigkeit für die Qualität des TMAs. Dieser Vorgang, dargestellt in Abb. 4, wurde für alle im Punchfile aufgeführten Gewebe wiederholt.





**Abb. 5: Harnblasen TMA**



**Abb. 6: Tumorgewebsspot aus Harnblasenkarzinom**

### 2.3. Herstellung der FISH-Sonden

#### 2.3.1. BAC-Klone

Die FISH-Sonden wurden mit Hilfe von BACs (bacterial artificial chromosome) hergestellt. BACs sind genomische Vektoren, mit denen man DNA Fragmente einer Länge von 100.000-300.000 Basenpaaren in Bakterien vermehren kann. In kommerziellen BAC-Bibliotheken ist mittlerweile das gesamte humane Genom verfügbar. BACs mit einer komplementären Sequenz zum Gen PTEN (RP11-380G05, RP11-813O3) sind von der Firma SourceBioScience, Cambridge, UK (United Kingdom) transformiert in *E. coli* DH10B erhältlich. Die verwendeten BACs sind resistent gegen das Antibiotikum Chloramphenicol.

### 2.3.2. Vermehrung, Isolation und Reinigung der BAC-DNA

Zur Vermehrung der BACs wurde ein Teil der Stabkultur für 8 bis 10 Stunden in 10 ml LB-Medium mit dem Zusatz von 100 µg/ml Chloramphenicol bei 37°C geschüttelt (220 rpm (rounds per minute)). Anschließend wurden 2 ml dieser Kultur in 250 ml LB-Medium mit oben genannter Chloramphenicol-Konzentration gegeben und nochmals bei 37°C für 12 Stunden geschüttelt (220 rpm). Die Isolation der BAC-DNA erfolgte mit Hilfe des NucleoBond BAC100 Kits von Macherey-Nagel, Deutschland. Zunächst wurden die Bakterienkulturen für 15 Minuten bei 6000g und 4°C zentrifugiert. Dann wurde das Pellet resuspendiert. Mit Hilfe einer NaOH/SDS-Lösung wurden die Bakterien lysiert und sowohl die enthaltene chromosomale bakterielle DNA als auch die Plasmid-DNA denaturiert. Durch Neutralisation wurden anschließend Proteine und bakterielle chromosomale DNA gefällt und abzentrifugiert. Anschließend wurde das Lysat auf eine Silika-Gel-Säule gegeben, die durch ionische Wechselwirkungen die BAC-DNA bindet. Durch Auswaschen wurde die Säule von RNA, Proteinen, Metaboliten und niedermolekularen Verunreinigungen gesäubert. Die Eluierung der BAC-Sonden erfolgte mit Hilfe eines Puffers mit geringer Ionenkonzentration. Anschließend wurde die Präzipitation mit Isopropanol durchgeführt. Nach dem Waschen der DNA mit 70%igem Ethanol wurde sie bei Raumtemperatur getrocknet. Schließlich wurde die DNA in 150 µl dH<sub>2</sub>O gelöst. Der DNA-Gehalt wurde mit Hilfe des NanoDrop ND-1000 bestimmt.

### 2.3.3. Markierung der BAC-DNA mit Fluoreszenzfarbstoffen

Um die isolierte BAC-DNA mit Fluoreszenzfarbstoff zu markieren, wurden das Nick Translation Kit und Vysis® Green dUTP (Abbott Laboratories, Illinois, U.S.A.) verwendet.

1000 ng DNA wurden 2,5 µl 0,2 mM Green dUTP (Desoxyuridintriphosphat), 5 µl 0,1 mM dTTP (Desoxythymidintriphosphat), 10 µl dNTP (Desoxynukleosidtriphosphat) (dATP (Desoxyadenosintriphosphat), dGTP (Desoxyguanosintriphosphat) und dCTP (Desoxycytidintriphosphat)), 5 µl 10x Nick Translation Buffer und 10 µl Nick Translation Enzyme Mix (DNA Polymerase I, DNase I) zugesetzt. Bei Raumtemperatur wurde der Ansatz für 1 Minute bei 2000 g zentrifugiert und anschließend bei 15°C für 8 Stunden inkubiert. Zum Beenden der Amplifikationsreaktion wurde der Ansatz bei 70°C für 10 Minuten erhitzt. Zur Reinigung der DNA von verbliebenen, nicht eingebauten fluoreszenzmarkierten dUTPs wurde das QIAquick® Nucleotide Removal Kit

verwendet. Um die überschüssigen Nukleotide zu entfernen, wurden nach dem Prinzip der Säulenfiltration die größeren fluoreszenzmarkierten Nukleotide in einem feinporigen Filter aus Silikatfasern gebunden und die kleineren Moleküle abfiltriert. Anschließend wurde die in den Poren verbliebene fluoreszenzmarkierte DNA mit Hilfe von dH<sub>2</sub>O eluiert und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

### **2.4. Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH)**

Die FISH ist eine Methode zum Nachweis von Chromosomenaberrationen, wie zum Beispiel Deletionen oder Amplifikationen. Sie basiert auf der Basenpaarung fluoreszenzmarkierter DNA-Sonden mit einer Ziel-DNA, um diese nachzuweisen bzw. sichtbar zu machen.

#### **2.4.1. Vorbereitung der Paraffin-Gewebeschnitte**

Die Paraffin-Gewebsschnitte wurden für die zweifarbige FISH-Analyse vor der Hybridisierung mit Xylol und 96% Ethanol entparaffiniert und proteolytisch vorbehandelt. Die Arbeitsschritte wurden nach dem Protokoll des „Paraffin Pretreatment Kit“ (Vysis, Downers Grove, IL (Illinois), USA) durchgeführt, die Zusammensetzung der genutzten Reagenzien und das genaue Prozedere ist diesem zu entnehmen.

Die Slides wurden auf der auf 48°C vorgewärmten Heizplatte luftgetrocknet und für 15 Minuten bei 80°C in die Pretreatment-Lösung gestellt. Anschließend wurden sie mit destilliertem Wasser gewaschen und mit einer Protease-Lösung behandelt.

Nach nochmaligem Waschen wurden die Slides durch 70%, 80% und 96% Ethanol entwässert.

Schließlich wurde die DNA bei 74°C in 70% Formamid und SSC(Saline Sodium Citrate)-Lösung denaturiert.

#### **2.4.2. Herstellung des Hybridisierungsansatzes**

Entsprechend Tab. 3 wurde der Sondenhybridisierungsansatz hergestellt. Cot-DNA stammt aus humaner Plazenta und besteht aus DNA-Fragmenten einer Länge von ca. 50-300bp (Basenpaaren). Durch die Zugabe von Cot-DNA zu der fluoreszenzmarkierten BAC-DNA werden unspezifische Hybridisierungen besonders von repetitiven Sequenzen verhindert.

## 2. Material und Methoden

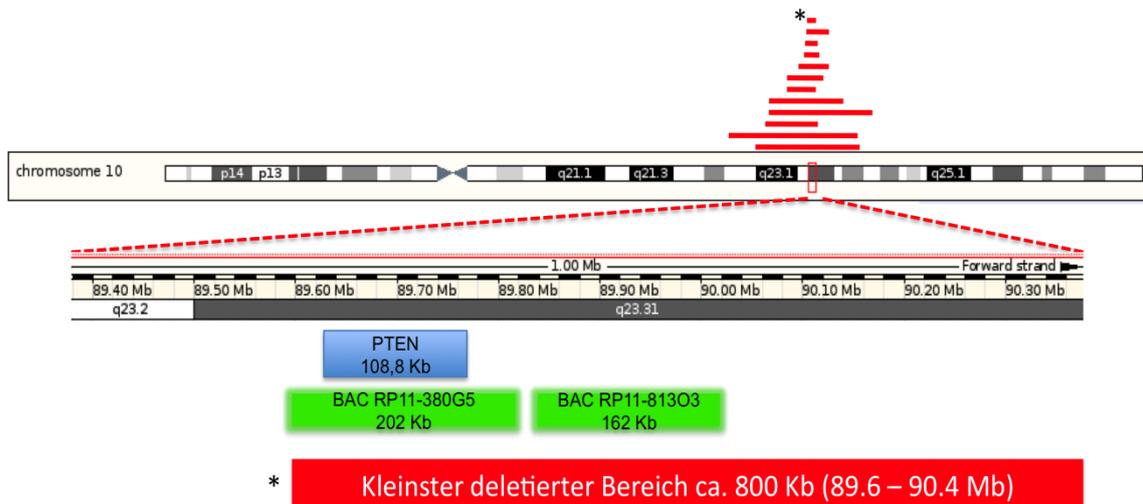
**Tab. 3: Sonden-Hybridisierungsmix für 2,4 × 3,2 cm (10 µl) 20 µl**

	<i>10 µl</i>	<i>20 µl</i>
Basismix	7 µl	14,0 µl
Cot-DNA (1 µg/µl)	1 µl	2 µl
Sonden DNA aus DIG-Nick-Translation ≈ 0,03 µg/µl	2 µl bzw. 1,75 µl + 0,25 µl *CEP-Sonde (Vysis)	4 µl bzw. 3,5 µl + 0,5 µl *CEP-Sonde (Vysis)
ddH <sub>2</sub> O	ad auf 10 µl	ad auf 20 µl

### 2.4.3. Sonden-Hybridisierung

10-20 µl Sonden-Hybridisierungsmix wurden auf das Gewebe pipettiert und mit einem Deckgläschen eingedeckt. Für die Hybridisierung wurde eine für die PTEN-Region spezifische DNA-Sonde aus zwei nebeneinander liegenden BAC-Klonen (RP11-380G5 und RP11-813O3) verwendet, um das Tumorsuppressorgen PTEN zu detektieren. Als Referenz wurden die Zentromerregionen von Chromosom 10 mit Hilfe einer kommerziell hergestellten DNA-Sonde (06J36-090; Abbott, Wiesbaden, Germany) hybridisiert. Mit Hilfe des "Fluorescent Antibody Enhancer Sets" (Roche) wurden die hybridisierten TMA-Slides detektiert. Eventuelle Luftbläschen wurden herausgestrichen. Die Deckgläschen wurden mit Fixogum (Marabu, Tamm, Deutschland) versiegelt.

Die Gewebeschnitte wurden in ein Hybrite-Gerät gelegt und 10 Minuten bei 72°C denaturiert. Direkt anschließend wurden sie über Nacht (bzw. bis zu 3 Tage) bei 37°C inkubiert. Ein Waschpuffer wurde temperiert, nachdem der pH-Wert kontrolliert wurde. Die Slides wurden in einen Hybridisierungswaschpuffer (100 ml 20x SSC, 3ml NP40 und 897 ml dH<sub>2</sub>O, pH=7,25) gestellt und im Wasserbad bei 72°C inkubiert. Die Slides wurden kurz in destilliertem Wasser gewaschen, anschließend bei Dunkelheit getrocknet und mit DAPI (4',6-Diamidino-2-Phenylindol) eingedeckt. DAPI bindet als Fluoreszenzfarbstoff unspezifisch an die DNA und färbt die Zellkerne in der Fluoreszenzmikroskopie blau. In Abb. 7 ist die auf dem PTEN-Genlocus gebundene BAC-Sonde dargestellt.



**Abb. 7: Verwendete BAC-Sonde auf Genlokus von PTEN**

### 2.5. Auswertung

Die FISH-Analyse wurde mit Hilfe eines Lichtmikroskops (Axio Zeiss Imager A1) durchgeführt. Die Spots wurden mit entsprechenden Filtern (AHF) betrachtet. Spots, die keine PTEN-Signale in Tumorzellen und gesunden Zellen zeigten oder Spots, die keine normalen Zellen aufwiesen, wurden aus der Analyse ausgeschlossen.

Als homozygote Deletion wurde das Fehlen von PTEN-Signalen bei vorhandenen Zentromer-Signalen in mindestens 60% der Tumorzellkerne definiert, wenn in den normalen Zellkernen PTEN-Signale zusehen waren. Als heterozygote Deletion wurde das Vorhandensein von weniger PTEN- als Zentromer-Signalen in mehr als 60% der Zellkerne gewertet.

Die Dokumentation erfolgte mit der ISIS-Software (In Situ Imaging System - Version 1.5.5 von MetaSystems).

### 2.6. DNA- Extraktion

Um eine Sequenzanalyse des Tumorsuppressorgens PTEN durchführen zu können, wurde aus dem Tumorgewebe DNA isoliert.

16 heterozygot deletierte Fälle wurden anhand der FISH-Analyse aus dem TMA der T1- und T2-Tumoren ausgewählt. Aus den zugehörigen in Paraffin eingebetteten Tumorböcken wurde jeweils ein Gewebezylinder (0,6mm Durchmesser, 5 mm Länge) mit Hilfe einer Hohlnadel ausgestanzt. Durch mehrfache Behandlung mit Xylol und 80% Ethanol wurde das Gewebe entparaffiniert.

## 2. Material und Methoden

---

Über Nacht wurde das Tumorgewebe mit Proteinase K im Wärmebad bei 56°C lysiert. Anschließend wurde das Gewebe auf 90 °C erhitzt, um das gebundene Formalin zu entfernen. Im nächsten Schritt muss die DNA an die Membran einer Eluationsssäule binden, um kontaminierende Partikel von ihr zu lösen. Diese wurden ausgewaschen. Schließlich wurde die reine, konzentrierte DNA von der Membran eluiert.

Die DNA-Isolation erfolgte nach Protokoll eines kommerziell erwerblichen Kits (QIAamp DNA FFPE kit, Qiagen, Hilden, Germany), dem das genaue Prozedere zu entnehmen ist.

### 2.7. PCR

Die PCR (Polymerase Chain Reaction, Polymerasekettenreaktion) ist eine Methode, mit der sich spezifische DNA-Sequenzen in vitro amplifizieren lassen. Durch die PCR können kleinste Mengen DNA nachgewiesen werden.

Die neun Exons von PTEN sollten aus der gewonnenen DNA der 16 ausgewählten Harnblasenkarzinome einzeln vervielfältigt werden, um im nächsten Schritt die Sequenz jedes Exons von jedem Tumorgewebe analysieren zu können.

Beispielhaft werden in Tab. 4 die Reagenzien für die Vervielfältigung von 1µl DNA aufgeführt:

**Tab. 4: Reagenzien für PCR**

Destillierte Wasser	18,2 µl
GeneAmp 10x PCR Buffer (Applied Biosystems)	2,5 µl
2 mM dNTPs (Promega)	2 µl
Primermix	1 µl
AmpliAmp Gold Polymerase (Applied Biosystems, Darmstadt, Germany)	0,3 µl
DNA	1 µl

Das Volumen der eingesetzten DNA wurde variiert, entsprechend wurde den Ansätzen dann destilliertes Wasser hinzugefügt, um ein Zielvolumen von 25µl pro PCR-Ansatz zu erreichen. Für die dNTPs wurden je 25µl dATP, dGTP, dCTP und dTTP mit 900µl destilliertem Wasser gelöst.

Die Sequenzen der verwendeten Primer sind wie folgt (Tab. 5):

## 2. Material und Methoden

**Tab. 5: Verwendete Primer für PCR**

<i>Exon</i>	<i>Forward</i>	<i>Reverse</i>
1	5'-ttccatcctgcagaagaagc- 3'	5'-cccacgttctaagagagtgaca- 3'
2	5'-ctccagctatagtggggaaaa- 3'	5'-cttttctgtggcttagaaatc- 3'
3	5'-cccatagaaggggtattgttg- 3'	5'-ctctacctactctaacaagcaga- 3'
4	5'-cacattataaagattcaggcaatgt- 3'	5'-aagatacagtctatcgggttaagtt-3'
5	5'-cttattctgaggttatcttttaccac- 3'	5'-tccaggaagaggaaaggaaaa- 3'
6	5'-ggctacgaccagttaccat- 3'	5'-ggaaggatgagaatttcaagca- 3'
7	5'-cagttaaaggcatttcctgtg- 3'	5'-tggatatttctccaatgaaag- 3'
8, outer fragment	5'-tgtttaacataggtgacagatttc- 3'	5'-aagtcaacaacccccacaaa- 3'
8, inner fragment	5'- aggtgacagattttcttttta- 3'	5'-aagtcaacaacccccacaaa- 3'
9	5'-gatgagtcataattgtgggttttc- 3'	5'-ggtcattttcagttattcaagt- 3'

Eine PCR läuft nach folgendem Schema ab:

- Denaturierung: Die Matrizen-DNA wird erhitzt und damit in Einzelstränge getrennt.
- Annealing: Die Primer hybridisieren mit der entsprechenden Sequenz auf den DNA-Einzelsträngen.
- DNA-Synthese: An dem freien 3'-OH-Ende der Primer werden die komplementären DNA-Stränge synthetisiert. Eine thermostabile DNA-Polymerase verlängert mit den Substraten dATP, dGTP, dCTP und dTTP den komplementären Strang zur Matrix. Die neu entstandenen Doppelstränge durchlaufen dann in den weiteren Zyklen immer wieder die gleiche Prozedur.

Die PCR wurde mithilfe von PCR-Cyclern zum Beispiel vom Typus C 1000 Thermal Cycler (Bio-Rad) durchgeführt. Die Etablierung der PCR auf unsere speziellen Konditionen erfolgte durch Variation der Annealingtemperatur und der Zyklenzahl. Als günstig erwies sich dabei folgendes Programm (Tab. 6):

**Tab. 6: Verwendetes Programm des PCR-Cyclers**

<i>Temperatur [°C]</i>	<i>Zeit</i>
95	10 min
95	20 s
55/53,5	20 s
72	40 s
72	7 min
10	beliebig

} 44 Zyklen

### 2.8. Gelelektrophorese

Die Gelelektrophorese ist eine Methode zur Trennung geladener Teilchen, in diesem Fall von DNA-Fragmenten, nach Größe und Ladung.

Die negativ geladenen DNA-Fragmente wandern durch ein auf ein Agarosegel gelegtes Spannungsfeld zur Anode. Je nach Größe und Ladung wandern die Fragmente eine bestimmte Strecke, die umgekehrt proportional zur Fragmentlänge ist. Die so entstandenen Banden werden mit Fluoreszenzfarbstoff angefärbt und unter UV-Licht sichtbar gemacht.

Die Gelelektrophorese wurde mit dem Gerät QIAxcel System (Qiagen) nach Protokoll durchgeführt.

Mit Hilfe der Gelelektrophorese wurde die in der PCR amplifizierte DNA nachgewiesen.

### 2.9. DNA-Sequenzierung

Durch Sequenzierung ist es möglich, die genaue Basensequenz der untersuchten DNA zu bestimmen. So können durch den Vergleich mit einer Mustersequenz des betreffenden Exons eventuelle Mutationen in DNA-Abschnitten nachgewiesen werden.

Die Sequenzierung erfolgte nach der Didesoxymethode nach Sanger, die leicht modifiziert wurde.

Das Prinzip beruht auf der *in vitro*-Replikation eines DNA-Moleküls. Ein Oligonukleotidprimer bindet dabei an einen bereits bekannten Sequenzbereich der DNA. Von dort aus synthetisiert eine Polymerase in vier parallelen Ansätzen jeweils den komplementären DNA-Strang. In den vier Ansätzen befindet sich zu den dNTPs eine unterschiedliche Base als ddNTP (2'-3'-Didesoxynukleotidtriphosphat). Sobald diese kompetitiv an verschiedenen Stellen eingebaut wird, bricht die DNA-Synthese nach dem Zufallsprinzip an dieser Stelle ab.

So ergibt sich eine Serie an Syntheseprodukten unterschiedlicher Länge, die anschließend gelelektrophoretisch getrennt werden. Anhand des entstandenen Bandenmusters lässt sich nun die Sequenz ablesen.

#### 2.9.1. Aufreinigung

Die in der Gelelektrophorese nachgewiesenen PCR-Produkte wurden mit Hilfe von ExoSAP-IT (usb) aufgereinigt. Je nach Stärke der Bande wurde 0,5 bis 5µl PCR-

## 2. Material und Methoden

Produkt eingesetzt, das mit 2 µl ExoSAP-Reagenz und destilliertem Wasser auf insgesamt 7 µl Ansatz aufgefüllt wurde.

Tab. 7 zeigt das gewählte Programm auf dem Biorad-Cycler.

**Tab. 7: Programm zur Aufreinigung des PCR-Produkts für Sequenzierung**

<i>Temperatur [°C]</i>	<i>Zeit [min]</i>
37	15
80	15
10	beliebig

### 2.9.2. Sequenzierreaktion

Folgende Reagenzien wurden zur Sequenzierung von 7 µl ExoSAP-Ansatz gebraucht (Tab. 8):

**Tab. 8: Reagenzien für Sequenzierreaktion**

<i>Reagenz</i>	<i>Volumen [µl]</i>
H2O (steril)	4 µl
ABI Prism Big Dye Terminator v1.1 Ready Reaction Mix (Applied Biosystems)	6 µl
<i>Reagenz</i>	<i>Volumen [µl]</i>
Big Dye Terminator v1.1, v3.1, 5x Sequencing Buffer (Applied Biosystems)	2 µl
Primer	1 µl

Tab. 9 zeigt das ausgewählte Programm des Cyclers.

**Tab. 9: Verwendetes Programm des Cyclers für Sequenzierung**

<i>Temperatur [°C]</i>	<i>Zeit</i>
95	10 min
95	10 s
55	10 s
60	2 min
10	beliebig

} 35 Zyklen

Die verwendeten Sequenzierprimer werden in Tab. 10 dargestellt.

**Tab. 10: Verwendete Primer für Sequenzierung**

<i>Exon</i>	<i>Primer-Sequenz</i>
1	Forward 5'-ttccatcctgcagaagaagc- 3'
2	Forward 5'-ctccagctatagtggggaaaa- 3'

## 2. Material und Methoden

<i>Exon</i>	<i>Primer-Sequenz</i>
3	Forward 5'-cccatagaaggggtatttggtg- 3'
4	Forward 5'-cacattataaagattcaggcaatgtt- 3'
5	Reverse 5'-tccaggaagaggaaaggaaaa- 3'
6	Forward 5'-ggctacgaccagttaccat- 3'
7	Forward 5'-cagttaaaggcatttctgtg- 3'
8	Reverse 5'-aagtcaacaacccccacaaa- 3'
9	Reverse 5'-ggtccattttcagttattcaagt- 3'

### 2.9.3. DNA-Fällung

Mit der Fällung wird das DNA-Pellet durch Aussalzen von dem wässrigen Ansatz getrennt. Tab. 11 zeigt die benutzten Reagenzien.

**Tab. 11: Verwendete Reagenzien zur DNA-Fällung**

H <sub>2</sub> O	170 $\mu$ l
3M Natriumacetat	17 $\mu$ l
Ansatz aus Sequenzierung	20 $\mu$ l
Ethanol	500 $\mu$ l
Gesamt	707 $\mu$ l

Anschließend wurde das DNA-Pellet durch Zentrifugation für 20 Minuten bei 4° C mit 14 000 rpm mit Centrifuge 5804R (Eppendorf) vom flüssigen Medium getrennt. Anschließend wurde die Flüssigkeit vom DNA-Pellet abgesaugt. Die Sequenz wurde durch Elektrophorese mit Hilfe des Genetic Analyzer 3100 (Applied Biosystems) abgelesen. Für die Arbeitsschritte der Sequenzierung wurde das Big Dye Terminator Kit (Applied Biosystems) verwendet.

### 2.10. Statistik

Die statistischen Analysen wurden mit Hilfe des Statistik-Programms JMP 8.0 (SAS Institute Inc, NC (North Carolina), USA) durchgeführt. Die Beziehungen zwischen den verschiedenen pathologisch-anatomischen und molekularen Parametern und PTEN-Deletionen wurden mittels Kreuztabelle über Chi-Quadrat-Test (Likelihood) ausgewertet. Die „Überlebenskurven“ wurden durch Kaplan-Meier-Kurven dargestellt. Für die statistische Beurteilung der Beziehung zwischen molekularen Parametern und Gesamtüberleben/tumorspezifischem Überleben (in Tumoren mit Stadium pT2 und höher), rezidivfreiem Überleben (in Tumoren mit Stadium pTa) und progressionsfreiem Überleben (in Tumoren mit Stadium pT1) wurde ein „Log-rank-test“ durchgeführt.

**3. Ergebnisse**

**3.1. TMA mit Prognosedaten aus Basel**

Der mit Hilfe der FISH-Analyse ausgewertete TMA aus Basel beinhaltete insgesamt 469 Urothelkarzinome der Harnblase mit vorhandenen Prognosedaten. 45% dieser Gewebespots aus Urothelkarzinomen wurden als Stadium pTa, 24,3% als pT1 und 30,7% als pT2 klassifiziert. Für die Auswertung wurden nur die Urothelkarzinome berücksichtigt.

**Tab.12: Heterozygote Deletionen von PTEN nach Tumorstadium (p= 0,0726)**

<i>Stadium</i>	<i>Deletion % (n)</i>	<i>Keine Deletion % (n)</i>	<i>Gesamt % (n)</i>
pTa	12,3 (26)	87,7 (185)	45 (211)
pT1	20,2 (23)	79,8 (91)	24,3 (114)
pT2-4	20,1 (29)	79,9 (115)	30,7 (144)
Gesamt % (n)	16,6 (78)	83,4 (391)	469 (469)

Die FISH-Analyse des TMA's aus Basel zeigte insgesamt 16,6% heterozygote Deletionen. Homozygote Deletionen wurden nicht gefunden.

Tab. 12 zeigt das Vorkommen von Deletionen in PTEN nach Tumorstadium. 12,3% der Tumorgewebe mit dem Stadium pTa waren deletiert. Je 20,2% der Tumorspots des Stadiums pT1 und 20,1% der Stadien pT2-4 waren deletiert.

In den Stadien pT1 und pT2-4 waren also jeweils fast doppelt so viele Tumorspots mit Deletionen wie in nichtinvasiven Urothelkarzinomen (pTa). Die Beziehung zwischen Deletionen und Tumorstadium zeigte sich jedoch als statistisch nicht signifikant.

**3.1.1. pTa nach Grad**

**Tab. 13: Heterozygote Deletionen in PTEN der pTa-Tumoren nach Tumorgrad (p=0,0119)**

<i>Grad</i>	<i>Deletion % (n)</i>	<i>Keine Deletion % (n)</i>	<i>Gesamt % (n)</i>
G1	5,8 (3)	94,2 (49)	24,6 (52)
G2	10,9 (14)	89,1 (114)	60,7 (128)
G3	29,0 (9)	71,0 (22)	14,7 (31)
Gesamt % (n)	12,3 (26)	87,7 (185)	100 (211)

Etwa 45% der in der FISH analysierten Urothelkarzinome wurden im Vorfeld als pTa klassifiziert. Betrachtet man nur diese Tumorspots, ist es interessant, die Aufteilung der deletierten Fälle abhängig vom Tumor-Grad zu betrachten (Tab. 13).

24,6% wurden als G1, 60,7% als G2 und 14,7% als G3 definiert.

### 3. Ergebnisse

Nur 5,8% der Tumorspots mit G1 waren deletiert. Von den als G2 klassifizierten Tumoren waren 10,9% deletiert. Die Tumore mit dem höchsten Grading (G3) waren in 29% der Fälle deletiert.

Je höher also der Grad der Tumoren, desto mehr Deletionen waren auch vorhanden. Es besteht eine signifikante Assoziation zwischen Tumorgrad und Deletionen ( $p = 0,0119$ ).

#### 3.1.2. pT1 nach Grad

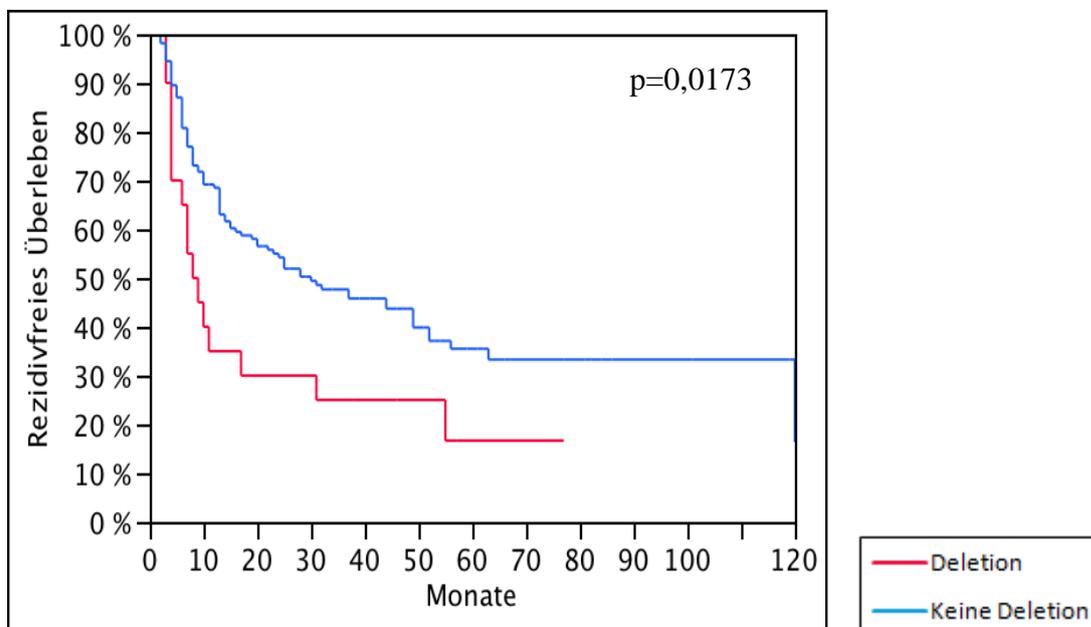
**Tab.14: Heterozygote Deletionen in PTEN in pT1-Tumoren nach Grad ( $p=0,2825$ )**

Grad	Deletion % (n)	Keine Deletion % (n)	Gesamt % (n)
G2	15,2 (9)	84,8 (50)	49,2 (59)
G3	23,0 (14)	77,0 (47)	50,8 (61)
Gesamt % (n)	19,2 (23)	80,8 (97)	100 (120)

Die G2-Tumore waren in 15,2% der Fälle deletiert. Bei den G3-Spots war mit 23% ein höherer Anteil deletiert.

Auch hier waren bei höherem Grad auch mehr Deletionen vorhanden, das heißt es konnte eine positive Korrelation zwischen Tumorgrad und Menge der PTEN-Deletionen beobachtet werden, jedoch ohne statistische Signifikanz ( $p=0,2825$ ).

#### 3.1.3. Rezidivfreies Überleben bei Patienten mit Stadium pTa



**Abb. 8: Rezidivfreies Überleben pTa (n=183), Del (Deletion)=20, keine Del=163**

In der Graphik (Abb. 8) wird die Zeit in Monaten auf der Abszisse in Abhängigkeit von dem prozentualen Anteil der rezidivfreien Patienten mit Harnblasenkarzinomen des Stadiums pTa mit und ohne Deletion auf der Ordinate gezeigt. Die blaue Kurve stellt

### 3. Ergebnisse

die Patienten ohne Deletion in PTEN dar, die rote zeigt die Patienten mit Deletion in PTEN. Die Prognosedaten über das rezidivfreie Überleben sind dem TMA aus Basel entnommen. Als rezidivfreies Überleben versteht man die Zeitspanne von Therapiebeginn bis zu einem nachweisbaren Erkrankungsrückfall.

In den ersten 20 Monaten fallen beide Kurven steil ab, wobei die blaue Kurve einen flacheren Verlauf nimmt als die rote. Zu diesem Zeitpunkt leben noch etwa 57% der Patienten ohne Deletion rezidivfrei. Von den Patienten mit Deletion leben nur noch ca. 30% ohne Rezidiv. Dann verlaufen beide Kurven flacher. Nach 35 Monaten leben von den Patienten ohne Deletion noch ca. 49% ohne Rezidiv, während von den Patienten mit Deletion in PTEN nur noch etwa 25 % ohne Rezidiv überleben. Nach 50 Monaten leben von den Patienten ohne Deletion noch etwa 41% rezidivfrei. Von den Patienten mit Deletion leben zum gleichen Zeitpunkt immer noch 25% ohne Rezidiv. Nach 60 Monaten leben von den Patienten ohne PTEN-Deletion noch 36% ohne Rezidiv, während von den Patienten mit Deletion nur noch etwa 16% rezidivfrei leben. Nach 120 Monaten bleibt die Kurve der Patienten ohne PTEN-Deletion gleich. Für die Patienten mit Deletion waren nur Prognosedaten über 76 Monate verfügbar.

Betrachtet man also die Patienten über einen längeren Zeitraum, fällt auf, dass die Patienten ohne Deletion in PTEN deutlich länger ohne Rezidiv leben als die mit Deletion in PTEN. Mit einem p-Wert von 0,0173 ist dieses Ergebnis signifikant.

#### 3.1.4. Progressionsfreies Überleben bei Patienten mit Stadium pT1

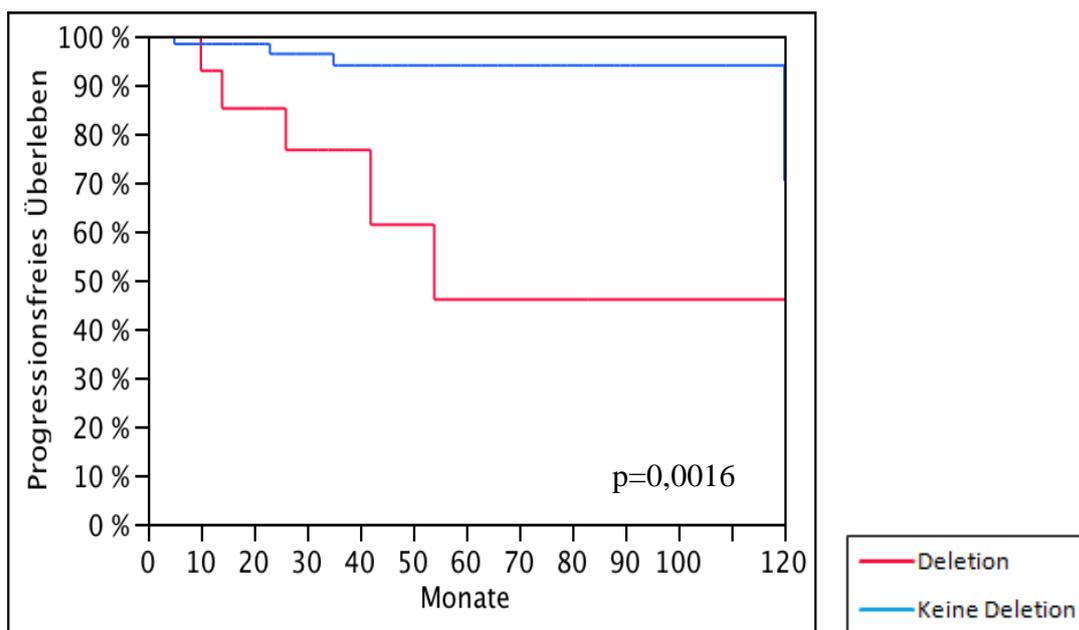


Abb.9: Progressionsfreies Überleben pT1 (n=74), Del=14, keine Del=60

### 3. Ergebnisse

---

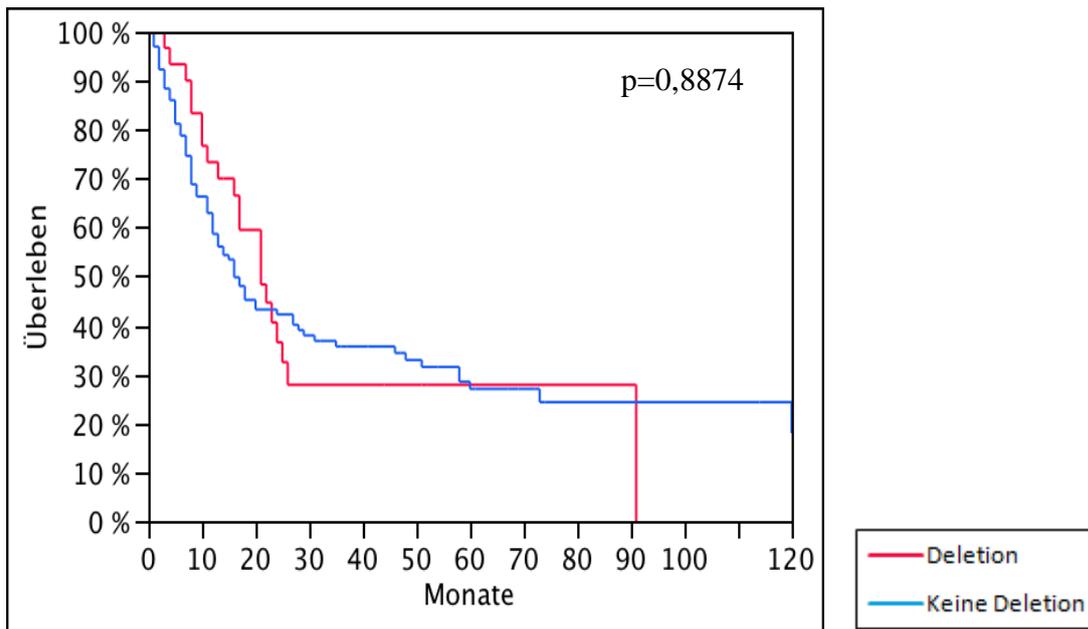
In Abb. 9 wird die Zeit in Monaten auf der Abszisse in Abhängigkeit von dem prozentualen Anteil der progressionsfreien Patienten mit Harnblasenkarzinomen des Stadiums pT1 mit und ohne Deletion auf der Ordinate gezeigt. Die blaue Kurve stellt die Patienten ohne Deletion in PTEN dar, die rote Kurve zeigt die Patienten mit Deletion in PTEN. Die Prognosedaten über das progressionsfreie Überleben sind dem TMA aus Basel entnommen. Unter Progression versteht man den Übergang in ein muskelinvasives Wachstum.

Die Kurve der Patienten ohne Deletion verläuft fast waagrecht, während der Kurvenverlauf der Patienten mit Deletion deutlich abfällt. Nach zehn Monaten hat erst ca. 1% der Patienten ohne Deletion eine Progression erlitten, während von den Patienten mit Deletion bereits 5% eine Progression erlitten haben. Nach 25 Monaten leben noch 98% der Patienten ohne Deletion ohne Progression, von den Patienten mit Deletion dahingegen nur noch 78%. Nach 40 Monaten leben noch 95% der Patienten ohne PTEN-Deletion progressionsfrei, während nur noch etwa 61% der Patienten mit Deletion progressionsfrei leben. Nach 52 Monaten leben noch 46% der Patienten mit Deletionen in PTEN progressionsfrei.

Nach 120 Monaten haben immer noch 5% der Patienten ohne PTEN-Deletion eine Progression erlitten, während 54% der Patienten mit PTEN-Deletion eine Progression erlitten haben.

Die Patientengruppe mit nachgewiesenen Deletionen in PTEN erleidet in dem betrachteten Zeitraum also fast elf Mal häufiger eine Progression als die Patientengruppe ohne Deletion. Das Ergebnis ist mit  $p=0,0016$  statistisch signifikant.

#### 3.1.5. Rohes Überleben bei Patienten mit Stadium pT2



**Abb. 10: Überleben (roh) pT2 (n=160), Del=30, keine Del=130**

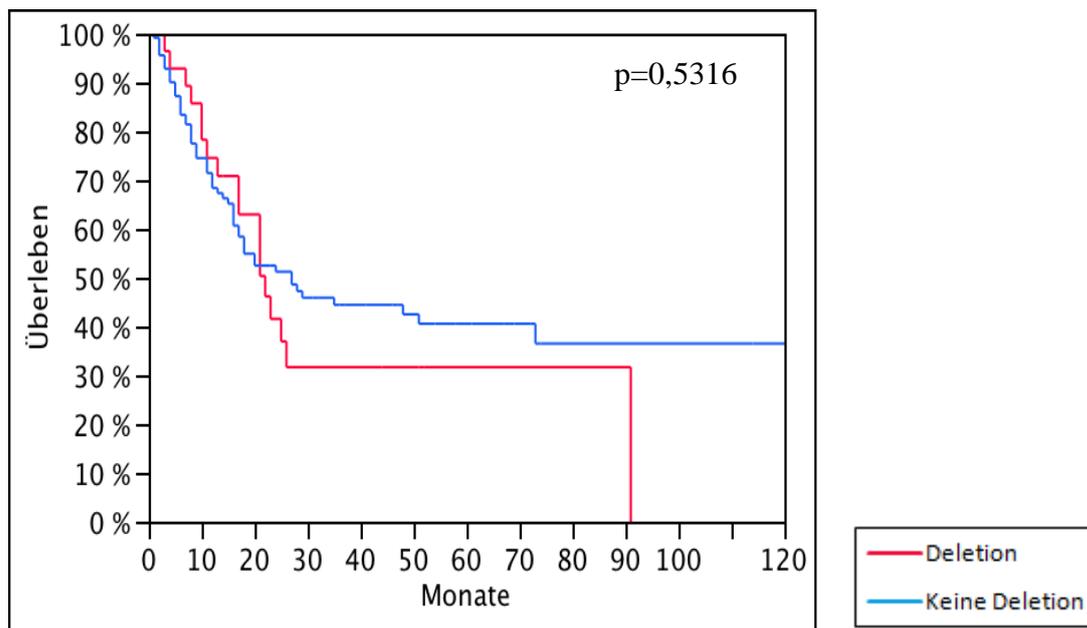
In der Graphik (Abb. 10) wird die Zeit in Monaten auf der Abszisse in Abhängigkeit von dem prozentualen Anteil der überlebenden Patienten mit Harnblasenkarzinomen des Stadiums pT2 mit und ohne Deletion auf der Ordinate gezeigt. Die blaue Kurve stellt die Patienten ohne Deletion in PTEN dar, die rote zeigt die Patienten mit Deletion in PTEN. Die Prognosedaten über das rohe Überleben sind dem TMA aus Basel entnommen. Es wird das rohe Überleben betrachtet. Das heißt, alle verstorbenen Patienten wurden mit einbezogen, unabhängig von der Todesursache.

In den ersten 26 Monaten fallen beide Kurven steil ab. Nach 10 Monate leben noch knapp 70% der Patienten mit Harnblasenkarzinom ohne Deletion von PTEN und noch 85% der Patientenkohorte mit PTEN-Deletion. Nach 20 Monaten leben noch etwa 45% der Patienten ohne Deletion und noch etwa 60% mit Deletion. Nach etwa 22 Monaten verläuft die Kurve, die die Patienten ohne Deletionen zeigt, flacher, während die der Patienten mit Deletion weiter steil abfällt. Nach 30 Monaten haben 39% der Patienten ohne Deletion überlebt; gleichzeitig leben nur noch 29% der Patienten mit PTEN-Deletion. Nach 50 Monaten leben noch etwa 32% der Patienten ohne PTEN-Deletion. Die Kurve für die Patienten mit PTEN-deletierten Harnblasenkarzinomen verläuft bis zum 90sten Monat waagrecht, um dann plötzlich auf 0% abzufallen. Zu diesem Zeitpunkt leben noch 25% der betrachteten Patientenkohorte ohne Deletion. Auch nach 120 Monaten leben noch 25% dieser Kohorte.

### 3. Ergebnisse

Zusammenfassend lässt sich also sagen, dass innerhalb der ersten 22 Monate nach Therapiebeginn die Patienten ohne Deletionen in PTEN vermehrt versterben. Erst ab diesem Zeitpunkt versterben die Patienten mit Deletion häufiger. Am Ende der betrachteten Periode leben noch einige Patienten ohne Deletion, während alle am Harnblasenkarzinom Erkrankten mit Deletion von PTEN bereits verstorben sind. Eine Signifikanz besteht mit  $p=0,8874$  jedoch nicht.

#### 3.1.6. Tumorspezifisches Überleben bei Patienten mit Stadium pT2



**Abb. 11: Überleben (tumorspezifisch) pT2 (n=143), Del=28, keine Del=115**

Abb. 11 zeigt die Zeit in Monaten auf der Abszisse in Abhängigkeit von dem prozentualen Anteil der tumorspezifisch überlebenden Patienten mit Harnblasenkarzinomen des Stadiums pT2 mit und ohne Deletion auf der Ordinate. Die blaue Kurve stellt die Patienten ohne Deletion in PTEN dar, die rote zeigt die Patienten mit Deletion in PTEN. Die Prognosedaten über das tumorspezifische Überleben sind dem TMA aus Basel entnommen. Es wurden nur die Patienten betrachtet, die an den Folgen des Harnblasenkarzinoms verstorben sind.

Beide Kurven fallen zunächst steil ab. Die Kurve, die die Patienten ohne detektierter PTEN-Deletion darstellt, verläuft knapp unter der, die die Patienten mit Deletion darstellt. Nach zehn Monaten leben von beiden Kohorten jeweils noch 75%. Nach etwa 20 Monaten unterschreitet die Kurve für die Patientenkohorte mit Deletion die Kurve der Patienten ohne Deletion. Zu diesem Zeitpunkt leben aus beiden Kohorten noch etwa

52%. Zehn Monate später leben von den Patienten ohne Deletion noch 46%, von den Patienten mit Deletion noch 32%. Ab diesem Zeitpunkt fällt die Kurve, die die Kohorte ohne Deletion zeigt, flach ab, sodass nach 40 Monaten noch etwa 43%, nach 60 Monaten noch etwa 40% und schließlich nach 80 Monaten nur noch 38% der Patienten leben. 38% der Patienten leben auch am Ende des betrachteten Zeitraums noch. Bis zum 90sten Monat überleben weiterhin 32% der Patienten mit Harnblasenkarzinom, die Deletionen in PTEN aufwiesen. Zu diesem Zeitpunkt versterben plötzlich alle bis dato Überlebenden dieser Kohorte.

Zunächst versterben also die Patienten ohne Deletionen in PTEN rascher. Nach einer Periode von 20 Monaten jedoch ändert sich dies und die Personen mit nachgewiesener Deletion versterben vermehrt, bis schließlich alle der Erkrankung erlegen sind. Mit  $P=0,5316$  kann jedoch keine Signifikanz nachgewiesen werden.

#### 3.2. Ergebnisse der FISH-Analyse des Hamburger TMAs

Dieser mit Hilfe der FISH-Analyse ausgewertete TMA bestand insgesamt aus 304 Urothelkarzinomen der Harnblase. 47,8% dieser Gewebesots aus Urothelkarzinomen wurden als Stadium pT1 und 52,2% als mindestens pT2 klassifiziert. Auswertbar waren insgesamt 209 Tumorspots.

Insgesamt wurden 22,0% heterozygote Deletionen beobachtet. Zwei homozygote Deletionen (1,0%) wurden entdeckt.

##### 3.2.1. Deletionen nach Tumorstadium

**Tab. 15: Deletionen in PTEN nach Tumorstadium ( $p= 0,7979$ )**

<i>Stadium</i>	<i>Homozygote Deletionen % (n)</i>	<i>Heterozygote Deletionen % (n)</i>	<i>Keine Deletionen % (n)</i>	<i>Gesamt % (n)</i>
pT1	1,0 (1)	24 (24)	75 (75)	47,8 (100)
pT2 oder >	0,9 (1)	20,2 (22)	78,9 (86)	52,2 (109)
Gesamt % (n)	1,0 (2)	22,0 (46)	77,0 (161)	100 (209)

In Tab. 15 werden die hetero- und homozygoten Deletionen in PTEN nach Tumorstadium dargestellt. Die Tumorspots mit dem Stadium pT1 wiesen in 24 % heterozygote Deletionen und in 1 % homozygote Deletionen auf. Die als pT2 klassifizierten Tumorspots waren zu 20,2% heterozygot und zu 0,9% homozygot deletiert.

### 3. Ergebnisse

Der Anteil der Deletionen an den pT1-Tumoren war also geringfügig höher als an den pT2-Tumoren. Das Ergebnis ist mit  $p=0,7979$  nicht signifikant.

#### 3.2.2. Deletionen nach Tumorgrad

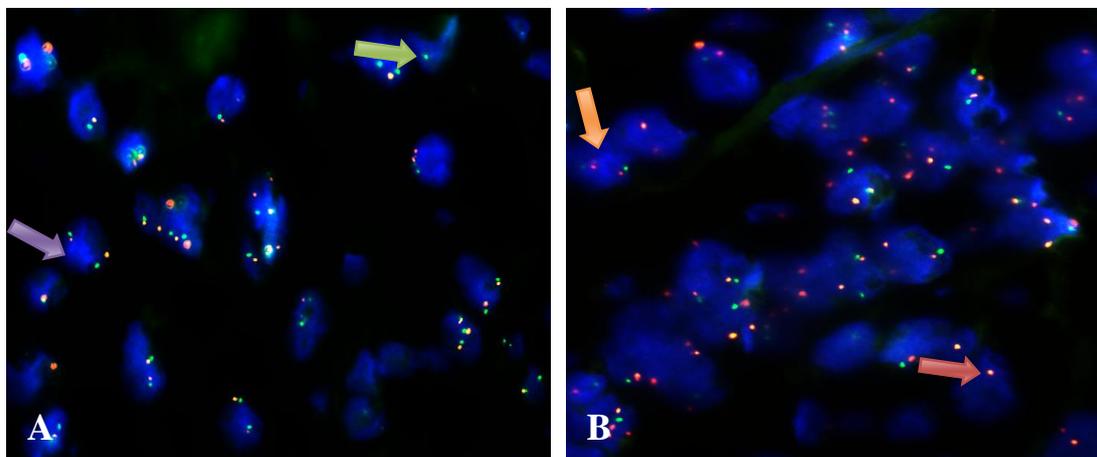
**Tab. 16: PTEN-Deletionen nach Tumorgrad**

Grad	Homozygote Deletionen % (n)	Heterozygote Deletionen % (n)	Keine Deletionen % (n)	Gesamt % (n)
G2	0 (0)	15,1 (11)	84,9 (62)	34,9 (73)
G3	1,5 (2)	25,7 (35)	72,8 (99)	65,1 (136)
Gesamt % (n)	1,0 (2)	22,0 (46)	77,0 (161)	100 (209)

Tab. 16 zeigt die PTEN-Deletionen nach Tumorgrad. Der Anteil heterozygoter Deletionen an den G2-Tumoren ist 15,1%. Es konnten keine homozygoten Deletionen gefunden werden. Bei den G3-Tumoren wurden in 25,7% heterozygote und in 1,5% homozygote Deletionen gefunden.

Tumoren höheren Tumorgrades hatten also mehr heterozygote Deletionen.

Abb.12 zeigt Photographien von heterozygot deletierten und nicht deletierten Tumorspots in der FISH-Analyse.



**Abb. 12: Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung:** Die Sonde für PTEN zeigt ein grünes Signal, die Referenzsonde für die Zentromerregion ein rotes Signal. A) Tumorgewebe ohne Deletion in PTEN. B) Tumorgewebe mit heterozygoter Deletion in PTEN.  = Gensignal,  = Zentromersignal,  = deletierte Zelle,  = normale Zelle

#### 3.3. Sequenzierung der heterozygot deletierten Tumoren

Es wurden bei der FISH-Analyse 16 Fälle ausgewählt, die heterozygote Deletionen aufwiesen.

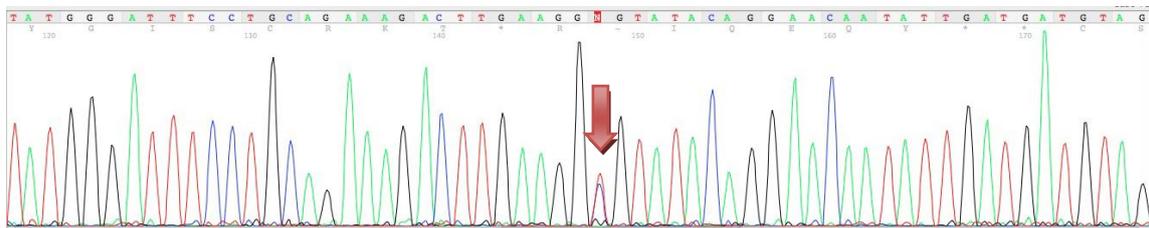
Nur bei 9 von den 16 Tumoren gelang es, alle neun Exons von PTEN zu sequenzieren. Als problematisch erwies sich die PCR. Besonders bei Exon 2 und Exon 8 stellte sich die DNA-Amplifikation schwierig dar. Die Forward- und Reverse-Primer von Exon 2 haben unterschiedliche Schmelztemperaturen. Aufgrund einer repetitiven Sequenz aus Adenin im Forward- und einer Folge von mehreren Thymin-Basen im Reverse-Primer kam es zur Bindung der Primer untereinander. Zusätzlich verfügt der Reverse-Primer über einen geringen GC-Gehalt. Exon 8 verfügt über eine sehr lange Basensequenz (378 bp). Aufgrund der Fragmentierung des Exons wurde eine Nested-PCR durchgeführt.

In den 9 Tumorgeweben wurde in 11% der Fälle eine Punktmutation gefunden. Es handelte sich dabei um einen Basenaustausch von Adenin gegen Thymin in Exon 2 (Abb. 13):

- c(A1163T), Exon 2
- p(G44G): stumme Mutation, kein bekannter SNP (Single Nucleotide Polymorphism)

Dieser Basenaustausch hat keine Auswirkung auf die Proteinbiosynthese, da das entstandene Triplet weiterhin für dieselbe Aminosäure, Glycin, kodiert. Es handelt sich somit um eine stumme Mutation, die keine Auswirkung auf das Protein PTEN hat.

Insgesamt wurde also keine Mutationen mit Auswirkung auf das Genprodukt PTEN entdeckt.



**Abb. 13: Basensequenz Exon 2:** Stumme Mutation ((c(A1163T), exon 2 p(G44G)), durch Pfeil markiert

### 4. Diskussion

In unserer Studie ergab sich eine heterozygote Deletionsfrequenz von 16,6% bei der Auswertung des TMAs aus Basel bzw. von 22,0% bei der Auswertung des TMAs aus Hamburg. Diese Ergebnisse befinden sich innerhalb der Ergebnisspanne von 3-52% verschiedener vorangegangener Studien, die Deletionen von PTEN im Harnblasenkarzinom untersucht haben (Aveyard et al. 1999; Blaveri et al. 2005; Cairns et al. 1998; Cappellen et al. 1997; Hurst et al. 2004; Hurst et al. 2012; Kagan et al. 1998; Knowles et al. 1994; Knowles et al. 2009; Platt et al. 2009).

Ein wesentliches Ziel unserer Studie war, einen Zusammenhang zwischen Deletionen in PTEN und morphologischen Merkmalen wie Invasionstiefe und Tumorgrad des Harnblasenkarzinoms zu detektieren. Bei dem Hamburger TMA konnte kein signifikanter Zusammenhang zwischen Deletionen und Tumorgrad oder -stadium nachgewiesen werden. Bei dem Baseler TMA hingegen zeigte sich dabei eine Korrelation der Alterationen von PTEN mit dem Tumorgrad, nicht jedoch mit dem Tumorstadium.

Das zweite wichtige Ziel war, eine Assoziation zwischen Deletionen in PTEN und klinischen Prognosedaten zu untersuchen. So konnten wir in Blasentumoren des Stadiums pTa eine signifikante Assoziation mit der Rezidivwahrscheinlichkeit zeigen. In pT1 Tumoren ließ sich eine signifikante Assoziation der Deletionen mit Tumorprogression zeigen. Für den Zusammenhang von Überleben (roh und tumorspezifisch) und PTEN-Veränderung in muskelinvasiven Tumoren konnten wir keine signifikante Korrelation zeigen.

In den letzten 20 Jahren wurden über 70 Studien durchgeführt, die sich mit dem Tumorsuppressorgen PTEN beim Harnblasenkarzinom beschäftigt haben. Die Ergebnisse dieser Studien sind kontrovers, zum Teil sogar widersprüchlich.

Bisher wurden vor allem LOH-Analysen durchgeführt, um Deletionen von PTEN nachzuweisen. Es konnte allgemein ein Verlust des Genlocus von PTEN auf Chromosom 10q in 8,5-45% nachgewiesen werden (Cappellen et al. 1997; Kagan et al. 1998; Knowles et al. 1994). Cairns et al. konnten eine Frequenz von homozygoten Deletionen von PTEN in 6% von 65 Blasentumoren feststellen, wobei Deletionen mit höherem Tumorgrad und -stadium assoziiert waren. In 23% von 285 Harnblasentumoren konnte eine LOH festgestellt werden (Cairns et al. 1998). Aveyard et al. fanden in 123 Tumoren einen Allelverlust der PTEN-Region in 13,6%, wobei vor

allem muskelinvasive Tumoren betroffen waren (Aveyard et al. 1999). Platt et al. wiesen einen Verlust der Heterozygotie in 12% von 89 Tumorgeweben nach. In dieser Studie konnte auch in 46% der Zelllinien Veränderungen in PTEN festgestellt werden (Platt et al. 2009).

Die großen Unterschiede in den Ergebnissen der genannten Studien können auf Probleme der Methode LOH zurückgeführt werden, die zwei Nachteile aufweist: Erstens können bei der für die Analyse isolierten DNA Kontaminationen mit Normalgewebe auftreten. Da Blasentumore häufig genetisch heterogen sind, kann auch hierdurch die verwendete DNA verunreinigt werden und somit zu ungenauen Ergebnissen führen.

Zweitens kann ein Allelverlust auch durch Amplifikationen (z.B. Trisomien von Chromosom 10) vorgetäuscht werden und somit in der LOH-Analyse als Deletion interpretiert werden. Hierdurch können hohe, falsch positive Werte für Deletionen entstehen.

Auf Ebene der Proteinexpression von PTEN wurden viele immunhistologische Studien durchgeführt, die in ihren Ergebnissen ebenfalls stark variieren. Eine Arbeitsgruppe konnte bei 29 Blasentumoren in 13,7% eine Reduktion der Proteinexpression von PTEN nachweisen. Dabei war diese meistens in muskelinvasiven Tumoren vorzufinden (Koksäl et al. 2005). Auch Schultz et al. konnten in 119 Tumoren eine verminderte Expression von 35% assoziiert mit Invasivität feststellen (Schultz et al. 2010).

Platt et al. fanden in 49% von 89 Tumoren eine verminderte PTEN-Expression, in 8% sogar gar keine Expression, assoziiert mit hohem Tumorgrad (Platt et al. 2009).

Tsuruta et al. konnten in 68 untersuchten Blasentumoren bei 53% eine verminderte PTEN-Expression finden, wobei in 8% der CIS-, in 42% der pTa- und in 94% der pT2-4-Tumoren reduzierte Expression zu finden war. Auch fand sich eine negative Korrelation mit dem Tumorgrad (Tsuruta et al. 2006). Eine andere Studie konnte zwar in 52% von 161 oberflächlichen Blasentumoren eine Assoziation zwischen reduzierter Proteinexpression und Stadium sowie Grad feststellen, jedoch keine Korrelation mit der Prognose (Han et al. 2008). Sun et al. untersuchten mit 887 eine große Anzahl von Harnblasentumoren und konnten eine negative Korrelation der PTEN Expression mit höherem Tumorstadium und -grad detektieren: In Low Grade-Tumoren fanden sie in 10,8% eine reduzierte Proteinmenge, in High-Grade-Tumoren in 20,5% (Sun et al. 2011). Die Arbeitsgruppe um Lee et al. konnte in 63,7% von 102 Harnblasentumoren eine verminderte PTEN Expression assoziiert mit Tumorgrad und -stadium zeigen (Lee

et al. 2012). Puzio-Kuter et al. konnten in 135 Urothelkarzinomen aller Stadien eine Assoziation von PTEN-Verlust mit dem Tumorstadium zeigen: nur 5,6% der pT1- und pT2-Tumoren (n=53) zeigten eine niedrige PTEN-Expression, während 21,8% der pT3- und pT4-Tumoren eine verminderte Expression zeigten (n=78). 41% der Tumore, die Veränderungen in der Expression von p53 zeigten, hatten auch eine verminderte Expression von PTEN, sodass eine prognostische Relevanz der Kombination der beiden Mutationen vermutet wurde (n=67). Die Vermutung wurde durch die Analyse von 85 muskelinvasiven Urothelkarzinomen mit klinischen Verlaufsdaten unterstützt, die zeigte, dass Patienten mit veränderter PTEN-Expression kürzer überlebten als Patienten mit regelrechter Expression. Patienten mit kombinierter Alteration von PTEN und p53 zeigten noch schlechtere Überlebenskurven (Puzio-Kuter et al. 2009).

Andere Arbeitsgruppen konnten keine Korrelationen mit Tumorstadium oder -grad finden: Gonzales-Roibon et al. untersuchten 19 Urothelkarzinome mit plasmazytoider Differenzierung und detektierten in 28% eine Reduktion der PTEN-Proteinmenge, jedoch keine Korrelation mit klinischen oder pathologischen Kategorien wie Geschlecht oder dem Tumorstadium (Gonzalez-Roibon et al. 2013). In einer Langzeitstudie von 1932 bis 2004 konnten Litlekalsoy et al. in 144 invasiven Harnblasentumoren der Tumorgrade 2 und 3 zwar eine Zunahme der PTEN-Expression, auch in Kombination mit der Expression von K-ras, zeigen, jedoch keine Korrelation mit Tumorgrad oder Metastasierung (Litlekalsoy et al. 2012).

Bei der Immunhistochemie können unterschiedliche Durchführungen von Studien in Hinblick auf Material und Methoden Auswirkungen auf die Ergebnisse haben: Die Verwendung von unterschiedlich fixiertem Ausgangsmaterial, anderen Laborprotokollen und unterschiedlichen Antikörpern können solche Diskrepanzen bewirken.

In einer Studie zu PTEN-Deletionen beim Prostatakarzinom wurden verschiedene Antikörper zur Immunhistochemie getestet (Krohn et al. 2012). Hierbei zeigte sich, dass nur ein Antikörper zu reproduzierbaren Ergebnissen der immunhistochemischen Analyse führte. Dieser Antikörper zeigte eine mindestens leichte nukleäre Anfärbung in 95% der untersuchten Prostatakarzinome. Daher sind für Studien zur PTEN-Expression beim Harnblasenkarzinom mittels Immunhistochemie ähnlich unzuverlässige Ergebnisse zu erwarten.

Die FISH gilt als Goldstandard zum Nachweis genetischer Deletionen in Tumoren. Dennoch wurde die FISH bisher nur in einer Studie angewendet, um Deletionen in der

Region von PTEN beim Harnblasenkarzinom zu detektieren: Wang et al. untersuchten 12 Tumoren. Von 7 pTa-Tumoren waren 28% deletiert, während in 5 Tumoren der Stadien pT1-3 in 80% Deletionen von 10q vorhanden waren (Wang et al. 1994).

Obwohl manche Studien (Gonzalez-Roibon et al. 2013; Platt et al. 2009) keinen Zusammenhang zwischen tumormorphologischen Merkmalen wie Tumorgrad und -stadium mit PTEN-Aberrationen finden konnten, unterstützen unsere Ergebnisse die These, dass PTEN-Deletionen vor allem in invasiven und hochgradigen Tumoren vorkommen wie auch in anderen Studien, z.B. Aveyard et al., Schultz et al. oder Sun et al., gezeigt werden konnte.

Unseren Ergebnissen nach könnten Deletionen von PTEN die klinische Prognose verschlechtern. Auch Puzio-Kuter et al. kamen zu diesem Ergebnis. Andere Arbeitsgruppen wie Han et al. konnten keinen Zusammenhang mit Prognosedaten zeigen. Die Position von PTEN als Tumorsuppressorgen, das zur Vorhersage der klinischen Prognose von am Harnblasenkarzinom Erkrankten herangezogen werden kann, bleibt also fraglich. Wahrscheinlicher scheint es, dass PTEN gemeinsam mit anderen Bestandteilen der zellulären Signalwege wie p53, p21 oder Lkb1 eine prognostische Bedeutung haben könnte, wie manche Arbeitsgruppen vorschlagen (Puzio-Kuter et al. 2009; Shorning et al. 2011; Yoo et al. 2006).

Mutationen in PTEN wurden bisher nur in wenigen Studien untersucht. Liu et al. konnten in elf Urothelkarzinom-Zelllinien in 18% Punktmutationen finden, in 33 Harnblasentumoren (pT1-pT4) allerdings keine (Liu et al. 2000). Eine andere Arbeitsgruppe konnte in 35 Harnblasentumoren hohen Stadiums (pT3a-pT4) eine Mutationsfrequenz von 17% feststellen sowie in 16 Zelllinien ebenfalls eine Punktmutationsfrequenz von 18,8% (Wang et al. 2000). Cairns et al. konnten in 8% von 25 Harnblasentumoren Punktmutationen feststellen (Cairns et al. 1998). Andere Arbeitsgruppen konnten keine Mutationen in PTEN finden (Aveyard et al. 1999; Sjö Dahl et al. 2011).

Auch in Studien, die zu PTEN-Mutationen im Prostatakarzinom durchgeführt wurden, konnten Mutationen festgestellt werden: Pourmand et al. fanden in 11,6% von 51 Prostatatumoren Mutationen in PTEN, die gleichzeitig mit schlechten Prognoseparametern assoziiert waren (Pourmand et al. 2007). Krohn et al. konnten bei 97 Prostatatumoren in 7,2% Mutationen finden (Krohn et al. 2012).

Wir dagegen konnten in neun heterozygot deletierten Harnblasentumoren nur eine stille Mutation finden, die keine Auswirkung auf die Proteinexpression hatte.

Bei Tumorsuppressorgenen ist normalerweise der Ausfall von beiden Allelen nötig, um zu einem Funktionsverlust der Funktion im Zellzyklus zu führen. Andere Mechanismen wie Mutationen könnten eine Rolle spielen, um das zweite Allel des Gens auszuschalten. DNA-Methylierung könnte ein weiterer Mechanismus sein, um das zweite Allel außer Kraft zu setzen (Whang et al. 1998).

Mehrere Studien haben gezeigt, dass bei PTEN der Funktionsverlust eines Allels genügen kann, um Tumorentstehung zu begünstigen (Berger und Pandolfi 2011). Experimente mit Knockout-Mäusen legen das Konzept der Haploinsuffizienz bei PTEN-Dysregulation nahe (Di Cristofano et al. 1999; Kwabi-Addo et al. 2001). Somit ist es wahrscheinlich, dass heterozygote Deletionen in PTEN ausreichen, um den Tumorzellen einen Selektionsvorteil zu verschaffen.

Unsere Ergebnisse unterstützen Aveyard et al. und Sjødahl et al. und weisen darauf hin, dass Veränderungen von PTEN im Harnblasenkarzinom nur ein Allel betreffen und somit genügend sind, um die tumorsuppressive Funktion von PTEN auszuschalten. Das genannte Konzept der Haploinsuffizienz könnte hier also greifen.

Eine weitere Möglichkeit wäre, dass Alterationen in PTEN bei Entstehung und Progression des Harnblasenkarzinoms eine untergeordnete Rolle spielen und der Fokus der Tumorgenese an anderen Stellen molekularer Signalkaskaden liegt.

Die Inaktivierung von PTEN führt zur Aktivierung des PI3-Kinase-Signalwegs und damit auch zu einer Aktivierung von mTor. In einigen präklinischen Studien wurde gezeigt, dass PTEN-inaktive Mäuse und auch humane Tumorzelllinien sensibel auf eine Therapie mit dem mTor-Inhibitor Rapamycin (Sirolimus) reagieren (Neshat et al. 2001; Seager et al. 2009). Seager et al. konnten sogar zeigen, dass eine intravesikale Therapie mit Rapamycin die Progression von CIS zu invasiven Harnblasentumoren verhindern kann.

In einer Phase-II-Studie konnte die klinische Relevanz der Hemmung von mTor mit dem Sirolimus-Derivat Everolimus unterstützt werden: 37 Patienten mit fortgeschrittenem Harnblasenkarzinom wurden nach Therapieversagen einer platinhaltigen Chemotherapie mit Everolimus über acht Wochen behandelt. Nach acht Wochen war die Tumorerkrankung bei 27% der Patienten kontrolliert, welches entweder als stabile Erkrankung, partielles Ansprechen oder vollständiges Ansprechen auf die Therapie definiert war. Der Verlust von PTEN konnte ausschließlich in Tumorzellen von Patienten nachgewiesen werden, die nicht auf den Einsatz von Everolimus ansprachen (Seront et al. 2012). Dies legt nahe, dass Alterationen in PTEN

mit einer Resistenzbildung gegen Everolimus einhergehen. In dieser Studie wurde Immunhistochemie angewendet, um die PTEN-Expression nachzuweisen. 57% der 14 Patienten mit unkontrollierbarer Erkrankung wiesen eine reduzierte Proteinexpression von PTEN auf, während keiner von den Patienten mit kontrollierter Erkrankung eine reduzierte Expression zeigte. Da aus oben erwähnten Gründen die Immunhistochemie eine störungsanfällige Methode ist, könnte hier die Analyse von PTEN-Deletionen mit FISH eine exaktere Alternative darstellen, um Patienten, bei denen eine Resistenz gegen Everolimus vorhanden sein könnte, zu identifizieren.

Dagegen spricht eine Studie von Trédan et al., die in 44 Endometriumkarzinomen verschiedene Biomarker des mTor-Signalwegs mit FISH, Immunhistochemie und Mutationsanalyse untersuchten, um zu prüfen, ob so das Ansprechen auf eine Everolimus-Therapie kalkulierbar ist. Dabei konnte PTEN nicht als Biomarker identifiziert werden, der ein Ansprechen auf Everolimus vorhersagen kann (Tredan et al. 2012).

Insgesamt lässt sich sagen, dass die Bedeutung von PTEN in der Kanzerogenese bei Harnblasentumoren nicht vollständig geklärt ist. Unsere Daten weisen auf eine Relevanz des Tumorsuppressorgens besonders bei invasiven Harnblasenkarzinomen hin. Dennoch ist insbesondere die FISH als Goldstandard in der Detektion von Deletionen noch nicht ausgeschöpft worden. Weitere Studien mit großer Tumoranzahl könnten unsere Ergebnisse untermauern.

Obwohl unsere Ergebnisse eine Signifikanz für klinische Prognosedaten aufweisen, besteht weiterhin Forschungsbedarf, um den Stellenwert von PTEN in der Tumorentstehung zu klären. Besonders der Zusammenhang von PTEN mit anderen den Zellzyklus regulierenden Proteinen wie p53 und die Bedeutung von PTEN-Alterationen als prognostischer Faktor für Therapiestrategien könnten im Fokus weiterer Projekte stehen.

Auch ist der Zusammenhang zwischen einer PTEN-Inaktivierung auf lediglich einem Allel und dessen Bedeutung für die Kanzerogenese weiter zu klären.

### 5. Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurde die Rolle von PTEN-Deletionen beim Harnblasenkarzinom untersucht. Mit Hilfe der FISH wurde der Zusammenhang zwischen PTEN-Deletionen und phänotypischen Charakteristika wie Tumorstadium und -grad und klinischen Prognosedaten untersucht. Zusätzlich wurde bei heterozygot deletierten Tumoren eine DNA-Sequenzierung durchgeführt, um weitere Mechanismen der Geninaktivierung zu untersuchen.

Bei heterozygoter PTEN-Deletion von 16,6% bzw. 22,0% konnten wir eine signifikante Assoziation zwischen Deletionen und Tumorgrad feststellen.

In Hinblick auf klinische Prognoseparameter konnte bei Harnblasentumoren des Stadiums pTa ein Zusammenhang der PTEN-Deletionen mit der Rezidivwahrscheinlichkeit und in pT1-Tumoren eine Assoziation mit Tumorprogression gezeigt werden. Unsere Ergebnisse unterstützen die These, dass Veränderungen in dem Tumorsuppressorgen vor allem in hochgradigen, genetisch instabilen Harnblasentumoren vorkommen. Deletionen von PTEN erscheinen als klinischer Prognoseparameter relevant.

In der Sequenzierung konnten keine relevanten Mutationen festgestellt werden, was das Konzept der Haploinsuffizienz bei Tumorsuppressorgen unterstützt.

Um die Bedeutung von PTEN-Deletionen beim Harnblasenkarzinom endgültig zu klären, besteht weiter Forschungsbedarf.

## 6. Abkürzungsverzeichnis

BAC	bacterial artificial chromosome
BCG	Bacillus-Calmette-Guérin
bp	Basenpaare
BRRS	Bannayan-Riley-Ruvalcaba Syndrom
BTA	Blasentumorantigen
CDK	Cyclin dependent Kinase
CGH	Comparative genomic hybridization
CIS	Carcinoma in situ
CS	Cowden Syndrom
CT	Computertomographie
Cys	Cystein
DAPI	4',6-Diamidino-2-Phenylindol
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
ddDNA	Dedesoxygenierte DNA
Del	Deletion
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
DNA	Desoxyribonukleine Acid
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
dUTP	Desoxyuridintriphosphat
EGF	Epidermal-Growth-Factor-Receptor
ELISA	Enzym Linked Immunosorbent Assay
FGFR3	Fibroblast Growth Factor-Receptor
FISH	Fluoreszens-in situ-Hybridisierung
G	Grad
HE	Hämatoxylin-Eosin
i.v.	intravenös
IHC	Immunhistochemie
IL	Illinois
Inc.	Incorporation
LOH	Loss of Heterozygosity

M	Metastasen
MRT	Magnetresonanztomographie
N	Anzahl
N	Lymphknoten
NC	North Carolina
NJ	New Jersey
P	postoperative histopathologische Klassifikation
PCR	Polymerase Chain Reaction
PHTS	PTEN Hamartoma Tumour Syndrome
PI3-K	Phosphatidylinositol 3-Kinase
PIP2	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PIP3	Phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphat
PK	Proteinkinase
PKB	Proteinkinase B
PS	Proteus Syndrom
PTEN	Phosphatase and Tensin homolog
PTP	Protein-Tyrosin-Phosphatase
PUNLMP	papilläre Urothel Neoplasie mit niedrigem malignen Potential
Rpm	rounds per minute
RTK	Rezeptortyrosinkinase
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
SSC	Saline Sodium Citrate
T	Tumor
TMA	Tissue-Microarray
TNM	T=Tumour, N= Nodes, M= Metastasis
TUR-B	Transurethrale Resektion der Harnblase
UE	Untereinheit
UK	United Kingdom
UKE	Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf
USA	United States of America
UV	ultraviolett
WHO	World Health Organization

## 7. Literatur

### 7.1. Artikel aus Fachzeitschriften

- Abel, P. D., D. Henderson, M. K. Bennett, R. R. Hall und G. Williams. 1988. Differing interpretations by pathologists of the pT category and grade of transitional cell cancer of the bladder. *Br J Urol* 62(4):339-342.
- Ahmad, I., J. P. Morton, L. B. Singh, S. M. Radulescu, R. A. Ridgway, S. Patel, J. Woodgett, D. J. Winton, M. M. Taketo, X. R. Wu, H. Y. Leung und O. J. Sansom. 2012. beta-Catenin activation synergizes with PTEN loss to cause bladder cancer formation. *Oncogene* 30(2):178-189.
- Alsheikh, A., Z. Mohamedali, E. Jones, J. Masterson und C. B. Gilks. 2001. Comparison of the WHO/ISUP classification and cytokeratin 20 expression in predicting the behavior of low-grade papillary urothelial tumors. *World/Health Organization/International Society of Urologic Pathology. Mod Pathol* 14(4):267-272.
- Aveyard, J. S., A. Skilleter, T. Habuchi und M. A. Knowles. 1999. Somatic mutation of PTEN in bladder carcinoma. *Br J Cancer* 80(5-6):904-908.
- Berger, A. H. und P. P. Pandolfi. 2011. Haplo-insufficiency: a driving force in cancer. *J Pathol* 223(2):137-146.
- Bevers, R. F., J. J. Battermann, J. A. Gietema, C. A. Hulsbergen-Van de Kaa, T. M. de Reijke, N. Feller und J. A. Witjes. 2009. [Guideline on urothelial carcinoma of the bladder]. *Ned Tijdschr Geneesk* 153:A956.
- Blaveri, E., J. L. Brewer, R. Roydasgupta, J. Fridlyand, S. DeVries, T. Koppie, S. Pejavar, K. Mehta, P. Carroll, J. P. Simko und F. M. Waldman. 2005. Bladder cancer stage and outcome by array-based comparative genomic hybridization. *Clin Cancer Res* 11(19 Pt 1):7012-7022.
- Boulalas, I., A. Zaravinos, I. Karyotis, D. Delakas und D. A. Spandidos. 2009. Activation of RAS family genes in urothelial carcinoma. *J Urol* 181(5):2312-2319.
- Cairns, P., E. Evron, K. Okami, N. Halachmi, M. Esteller, J. G. Herman, S. Bose, S. I. Wang, R. Parsons und D. Sidransky. 1998. Point mutation and homozygous deletion of PTEN/MMAC1 in primary bladder cancers. *Oncogene* 16(24):3215-3218.
- Cappellen, D., S. Gil Diez de Medina, D. Chopin, J. P. Thiery und F. Radvanyi. 1997. Frequent loss of heterozygosity on chromosome 10q in muscle-invasive transitional cell carcinomas of the bladder. *Oncogene* 14(25):3059-3066.
- Cheng, L., R. M. Neumann und D. G. Bostwick. 1999. Papillary urothelial neoplasms of low malignant potential. Clinical and biologic implications. *Cancer* 86(10):2102-2108.
- Cho, K. S., H. K. Seo, J. Y. Joung, W. S. Park, J. Y. Ro, K. S. Han, J. Chung und K. H. Lee. 2009. Lymphovascular invasion in transurethral resection specimens as predictor of progression and metastasis in patients with newly diagnosed T1 bladder urothelial cancer. *J Urol* 182(6):2625-2630.
- Cohen, S. M., T. Shirai und G. Steineck. 2000. Epidemiology and etiology of premalignant and malignant urothelial changes. *Scand J Urol Nephrol Suppl*(205):105-115.
- Cordon-Cardo, C., G. Dalbagni, G. T. Saez, M. R. Oliva, Z. F. Zhang, J. Rosai, V. E. Reuter und A. Pellicer. 1994. p53 mutations in human bladder cancer: genotypic versus phenotypic patterns. *Int J Cancer* 56(3):347-353.

- Cordon-Cardo, C. und V. E. Reuter. 1997. Alterations of tumor suppressor genes in bladder cancer. *Semin Diagn Pathol* 14(2):123-132.
- Di Cristofano, A., P. Kotsi, Y. F. Peng, C. Cordon-Cardo, K. B. Elkon und P. P. Pandolfi. 1999. Impaired Fas response and autoimmunity in Pten<sup>+/-</sup> mice. *Science* 285(5436):2122-2125.
- Dotan, Z. A., K. Kavanagh, O. Yossepowitch, M. Kaag, S. Olgac, M. Donat und H. W. Herr. 2007. Positive surgical margins in soft tissue following radical cystectomy for bladder cancer and cancer specific survival. *J Urol* 178(6):2308-2312; discussion 2313.
- Eng, C. 1993. PTEN Hamartoma Tumor Syndrome (PHTS).
- Esrig, D., D. Elmajian, S. Groshen, J. A. Freeman, J. P. Stein, S. C. Chen, P. W. Nichols, D. G. Skinner, P. A. Jones und R. J. Cote. 1994. Accumulation of nuclear p53 and tumor progression in bladder cancer. *N Engl J Med* 331(19):1259-1264.
- Gandour-Edwards, R., P. N. Lara, Jr., A. K. Folkins, J. M. LaSalle, L. Beckett, Y. Li, F. J. Meyers und R. DeVere-White. 2002. Does HER2/neu expression provide prognostic information in patients with advanced urothelial carcinoma? *Cancer* 95(5):1009-1015.
- Gonzalez-Roibon, N. D., A. Chau, T. Al-Hussain, A. O. Osunkoya, S. M. Bezerra, J. Hicks, J. I. Epstein und G. J. Netto. 2013. Dysregulation of mammalian target of rapamycin pathway in plasmacytoid variant of urothelial carcinoma of the urinary bladder. *Hum Pathol*.
- Habuchi, T., H. Kinoshita, H. Yamada, Y. Takehi, O. Ogawa, W. J. Wu, R. Takahashi, T. Sugiyama und O. Yoshida. 1994. Oncogene amplification in urothelial cancers with p53 gene mutation or MDM2 amplification. *J Natl Cancer Inst* 86(17):1331-1335.
- Han, K. S., I. G. Jeong, J. Y. Joung, S. O. Yang, J. Chung, H. K. Seo, K. S. Kwon, W. S. Park und K. H. Lee. 2008. Clinical value of PTEN in patients with superficial bladder cancer. *Urol Int* 80(3):264-269.
- Harnden, P., A. Allam, A. D. Joyce, A. Patel, P. Selby und J. Southgate. 1995. Cytokeratin 20 expression by non-invasive transitional cell carcinomas: potential for distinguishing recurrent from non-recurrent disease. *Histopathology* 27(2):169-174.
- Harris, L. D., J. De La Cerda, T. Tuziak, D. Rosen, L. Xiao, Y. Shen, A. L. Sabichi, B. Czerniak und H. B. Grossman. 2008. Analysis of the expression of biomarkers in urinary bladder cancer using a tissue microarray. *Mol Carcinog* 47(9):678-685.
- Hartmann, A., L. Zanardo, T. Bocker-Edmonston, H. Blaszyk, W. Dietmaier, R. Stoehr, J. C. Cheville, K. Junker, W. Wieland, R. Knuechel, J. Rueschoff, F. Hofstaedter und R. Fishel. 2002. Frequent microsatellite instability in sporadic tumors of the upper urinary tract. *Cancer Res* 62(23):6796-6802.
- Hasui, Y., Y. Osada, S. Kitada und S. Nishi. 1994. Significance of invasion to the muscularis mucosae on the progression of superficial bladder cancer. *Urology* 43(6):782-786.
- Hautmann, R. E., B. G. Volkmer und K. Gust. 2009. Quantification of the survival benefit of early versus deferred cystectomy in high-risk non-muscle invasive bladder cancer (T1 G3). *World J Urol* 27(3):347-351.
- Hodges, K. B., A. Lopez-Beltran, D. D. Davidson, R. Montironi und L. Cheng. 2010. Urothelial dysplasia and other flat lesions of the urinary bladder: clinicopathologic and molecular features. *Hum Pathol* 41(2):155-162.

- Holmang, S., P. Andius, H. Hedelin, K. Wester, C. Busch und S. L. Johansson. 2001. Stage progression in Ta papillary urothelial tumors: relationship to grade, immunohistochemical expression of tumor markers, mitotic frequency and DNA ploidy. *J Urol* 165(4):1124-1128; discussion 1128-1130.
- Holmang, S. und S. L. Johansson. 2002. Stage Ta-T1 bladder cancer: the relationship between findings at first followup cystoscopy and subsequent recurrence and progression. *J Urol* 167(4):1634-1637.
- Hosomi, M., S. Yoneda, K. Madono, G. Tanigawa, K. Yazawa und S. Yamaguchi. 2009. [Prognostic significance of vascular invasion in patients with urothelial carcinoma treated with radical cystectomy]. *Hinyokika Kyo* 55(11):665-669.
- Hurst, C. D., H. Fiegler, P. Carr, S. Williams, N. P. Carter und M. A. Knowles. 2004. High-resolution analysis of genomic copy number alterations in bladder cancer by microarray-based comparative genomic hybridization. *Oncogene* 23(12):2250-2263.
- Hurst, C. D., F. M. Platt, C. F. Taylor und M. A. Knowles. 2012. Novel tumor subgroups of urothelial carcinoma of the bladder defined by integrated genomic analysis. *Clin Cancer Res* 18(21):5865-5877.
- Jimenez, R. E., E. Gheiler, P. Oskanian, R. Tiguert, W. Sakr, D. P. Wood, Jr., J. E. Pontes und D. J. Grignon. 2000. Grading the invasive component of urothelial carcinoma of the bladder and its relationship with progression-free survival. *Am J Surg Pathol* 24(7):980-987.
- Kagan, J., J. Liu, J. D. Stein, S. S. Wagner, R. Babkowski, B. H. Grossman und R. L. Katz. 1998. Cluster of allele losses within a 2.5 cM region of chromosome 10 in high-grade invasive bladder cancer. *Oncogene* 16(7):909-913.
- Kanda, S., H. Kanetake und Y. Miyata. 2009. Loss of PTEN function may account for reduced proliferation pathway sensitivity to LY294002 in human prostate und bladder cancer cells. *J Cancer Res Clin Oncol* 135(2):303-311.
- Keen, A. J. und M. A. Knowles. 1994. Definition of two regions of deletion on chromosome 9 in carcinoma of the bladder. *Oncogene* 9(7):2083-2088.
- Knowles, M. A. 2006. Molecular subtypes of bladder cancer: Jekyll and Hyde or chalk and cheese? *Carcinogenesis* 27(3):361-373.
- Knowles, M. A., P. A. Elder, M. Williamson, J. P. Cairns, M. E. Shaw und M. G. Law. 1994. Allelotype of human bladder cancer. *Cancer Res* 54(2):531-538.
- Knowles, M. A., F. M. Platt, R. L. Ross und C. D. Hurst. 2009. Phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) pathway activation in bladder cancer. *Cancer Metastasis Rev* 28(3-4):305-316.
- Koksal, I. T., D. Yasar, E. Dirice, M. F. Usta, S. Karauzum, G. Luleci, M. Baykara und S. Sanlioglu. 2005. Differential PTEN protein expression profiles in superficial versus invasive bladder cancers. *Urol Int* 75(2):102-106.
- Krohn, A., T. Diedler, L. Burkhardt, P. S. Mayer, C. De Silva, M. Meyer-Kornblum, D. Kotschau, P. Tennstedt, J. Huang, C. Gerhauser, M. Mader, S. Kurtz, H. Sirma, F. Saad, T. Steuber, M. Graefen, C. Plass, G. Sauter, R. Simon, S. Minner und T. Schlomm. 2012. Genomic deletion of PTEN is associated with tumor progression and early PSA recurrence in ERG fusion-positive and fusion-negative prostate cancer. *Am J Pathol* 181(2):401-412.
- Kwabi-Addo, B., D. Giri, K. Schmidt, K. Podsypanina, R. Parsons, N. Greenberg und M. Ittmann. 2001. Haploinsufficiency of the Pten tumor suppressor gene promotes prostate cancer progression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(20):11563-11568.

- Lee, H., S. K. Choi und J. Y. Ro. 2012. Overexpression of DJ-1 and HSP90alpha, and loss of PTEN associated with invasive urothelial carcinoma of urinary bladder: Possible prognostic markers. *Oncol Lett* 3(3):507-512.
- Leslie, N. R. und C. P. Downes. 2004. PTEN function: how normal cells control it and tumour cells lose it. *Biochem J* 382(Pt 1):1-11.
- Lipponen, P. K. 1993. Over-expression of p53 nuclear oncoprotein in transitional-cell bladder cancer and its prognostic value. *Int J Cancer* 53(3):365-370.
- Litlekalsoy, J., J. G. Hostmark, D. E. Costea, M. Illemann und O. D. Laerum. 2012. Time-dependent biological differences in molecular markers of high-grade urothelial cancer over 7 decades (ras proteins, pTEN, uPAR, PAI-1 and MMP-9). *Virchows Arch* 461(5):541-551.
- Liu, J., D. C. Babiian, M. Liebert, P. A. Steck und J. Kagan. 2000. Inactivation of MMAC1 in bladder transitional-cell carcinoma cell lines and specimens. *Mol Carcinog* 29(3):143-150.
- Logothetis, C. J., H. J. Xu, J. Y. Ro, S. X. Hu, A. Sahin, N. Ordonez und W. F. Benedict. 1992. Altered expression of retinoblastoma protein and known prognostic variables in locally advanced bladder cancer. *J Natl Cancer Inst* 84(16):1256-1261.
- Lu, M. L., F. Wikman, T. F. Orntoft, E. Charytonowicz, F. Rabbani, Z. Zhang, G. Dalbagni, K. S. Pohar, G. Yu und C. Cordon-Cardo. 2002. Impact of alterations affecting the p53 pathway in bladder cancer on clinical outcome, assessed by conventional and array-based methods. *Clin Cancer Res* 8(1):171-179.
- McKenney, J. K., M. B. Amin und R. H. Young. 2003. Urothelial (transitional cell) papilloma of the urinary bladder: a clinicopathologic study of 26 cases. *Mod Pathol* 16(7):623-629.
- Minner, S., A. Kilgus, P. Stahl, S. Weikert, M. Rink, R. Dahlem, M. Fisch, W. Hoppner, W. Wagner, C. Bokemeyer, L. Terracciano, R. Simon, G. Sauter und W. Wilczak. 2010. Y chromosome loss is a frequent early event in urothelial bladder cancer. *Pathology* 42(4):356-359.
- Minner, S. und G. Sauter. 2009. [Tumors of the urinary system. Current and old problems]. *Pathologe* 30 Suppl 2:179-184.
- Negri, E. und C. La Vecchia. 2001. Epidemiology and prevention of bladder cancer. *Eur J Cancer Prev* 10(1):7-14.
- Neshat, M. S., I. K. Mellinghoff, C. Tran, B. Stiles, G. Thomas, R. Petersen, P. Frost, J. J. Gibbons, H. Wu und C. L. Sawyers. 2001. Enhanced sensitivity of PTEN-deficient tumors to inhibition of FRAP/mTOR. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(18):10314-10319.
- Orlando, C., R. Sestini, G. Vona, P. Pinzani, S. Bianchi, M. Giacca, M. Pazzagli und C. Selli. 1996. Detection of c-erbB-2 amplification in transitional cell bladder carcinoma using competitive PCR technique. *J Urol* 156(6):2089-2093.
- Orntoft, T. F. und H. Wolf. 1998. Molecular alterations in bladder cancer. *Urol Res* 26(4):223-233.
- Orozco, R. E., A. A. Martin und W. M. Murphy. 1994. Carcinoma in situ of the urinary bladder. Clues to host involvement in human carcinogenesis. *Cancer* 74(1):115-122.
- Parkin, D. M. 2008. The global burden of urinary bladder cancer. *Scand J Urol Nephrol Suppl*(218):12-20.
- Parkin, D. M., F. Bray, J. Ferlay und P. Pisani. 2005. Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin* 55(2):74-108.

- Peyromaure, M., S. Weibing, P. Sebe, P. Verpillat, M. Toublanc, M. C. Dauge, L. Boccon-Gibod und V. Ravery. 2002. Prognostic value of p53 overexpression in T1G3 bladder tumors treated with bacillus Calmette-Guerin therapy. *Urology* 59(3):409-413.
- Pfister, C., L. Moore, P. Allard, H. Larue, L. Lacombe, B. Tetu, F. Meyer und Y. Fradet. 1999. Predictive value of cell cycle markers p53, MDM2, p21, and Ki-67 in superficial bladder tumor recurrence. *Clin Cancer Res* 5(12):4079-4084.
- Planchon, S. M., K. A. Waite und C. Eng. 2008. The nuclear affairs of PTEN. *J Cell Sci* 121(Pt 3):249-253.
- Platt, F. M., C. D. Hurst, C. F. Taylor, W. M. Gregory, P. Harnden und M. A. Knowles. 2009. Spectrum of phosphatidylinositol 3-kinase pathway gene alterations in bladder cancer. *Clin Cancer Res* 15(19):6008-6017.
- Pourmand, G., A. A. Ziaee, A. R. Abedi, A. Mehraei, H. A. Alavi, A. Ahmadi und H. R. Saadati. 2007. Role of PTEN gene in progression of prostate cancer. *Urol J* 4(2):95-100.
- Puzio-Kuter, A. M., M. Castillo-Martin, C. W. Kinkade, X. Wang, T. H. Shen, T. Matos, M. M. Shen, C. Cordon-Cardo und C. Abate-Shen. 2009. Inactivation of p53 and Pten promotes invasive bladder cancer. *Genes Dev* 23(6):675-680.
- Ravery, V., D. Grignon, J. Angulo, E. Pontes, J. Montie, J. Crissman und D. Chopin. 1997. Evaluation of epidermal growth factor receptor, transforming growth factor alpha, epidermal growth factor and c-erbB2 in the progression of invasive bladder cancer. *Urol Res* 25(1):9-17.
- Reddy, P. S., S. Ganesh, N. J. Knowles, M. Kaleko, S. Connelly und A. Bristol. 2006. Complete sequence and organization of the human adenovirus serotype 46 genome. *Virus Res* 116(1-2):119-128.
- Richter, J., L. Beffa, U. Wagner, P. Schraml, T. C. Gasser, H. Moch, M. J. Mihatsch und G. Sauter. 1998. Patterns of chromosomal imbalances in advanced urinary bladder cancer detected by comparative genomic hybridization. *Am J Pathol* 153(5):1615-1621.
- Sauter, G., T. C. Gasser, H. Moch, J. Richter, F. Jiang, R. Albrecht, H. Novotny, U. Wagner, L. Bubendorf und M. J. Mihatsch. 1997. DNA aberrations in urinary bladder cancer detected by flow cytometry and FISH. *Urol Res* 25 Suppl 1:S37-43.
- Sauter, G., J. Haley, K. Chew, R. Kerschmann, D. Moore, P. Carroll, H. Moch, F. Gudat, M. J. Mihatsch und F. Waldman. 1994. Epidermal-growth-factor-receptor expression is associated with rapid tumor proliferation in bladder cancer. *Int J Cancer* 57(4):508-514.
- Schmitz-Drager, B. J., M. Kushima, P. Goebell, T. W. Jax, C. D. Gerharz, H. Bultel, W. A. Schulz, T. Ebert und R. Ackermann. 1997. p53 and MDM2 in the development and progression of bladder cancer. *Eur Urol* 32(4):487-493.
- Schultz, L., R. Albadine, J. Hicks, S. Jadallah, A. M. DeMarzo, Y. B. Chen, M. E. Nielsen, M. L. Gonzalgo, D. Sidransky, M. Schoenberg und G. J. Netto. 2010. Expression status and prognostic significance of mammalian target of rapamycin pathway members in urothelial carcinoma of urinary bladder after cystectomy. *Cancer* 116(23):5517-5526.
- Seager, C. M., A. M. Puzio-Kuter, T. Patel, S. Jain, C. Cordon-Cardo, J. Mc Kiernan und C. Abate-Shen. 2009. Intravesical delivery of rapamycin suppresses tumorigenesis in a mouse model of progressive bladder cancer. *Cancer Prev Res (Phila)* 2(12):1008-1014.

- Seront, E., S. Rottey, B. Sautois, J. Kerger, L. A. D'Hondt, V. Verschaeve, J. L. Canon, C. Dopchie, J. M. Vandebulcke, N. Whenham, J. C. Goeminne, M. Clause, D. Verhoeven, P. Glorieux, S. Branders, P. Dupont, J. Schoonjans, O. Feron and J. P. Machiels. 2012. Phase II study of everolimus in patients with locally advanced or metastatic transitional cell carcinoma of the urothelial tract: clinical activity, molecular response, and biomarkers. *Ann Oncol* 23(10):2663-2670.
- Shorning, B. Y., D. Griffiths and A. R. Clarke. 2011. Lkb1 and Pten synergise to suppress mTOR-mediated tumorigenesis and epithelial-mesenchymal transition in the mouse bladder. *PLoS One* 6(1):e16209.
- Simon, R., H. Burger, C. Brinkschmidt, W. Bocker, L. Hertle and H. J. Terpe. 1998. Chromosomal aberrations associated with invasion in papillary superficial bladder cancer. *J Pathol* 185(4):345-351.
- Sircar, K., M. Yoshimoto, F. A. Monzon, I. H. Koumakpayi, R. L. Katz, A. Khanna, K. Alvarez, G. Chen, A. D. Darnel, A. G. Aprikian, F. Saad, T. A. Bismar and J. A. Squire. 2009. PTEN genomic deletion is associated with p-Akt and AR signalling in poorer outcome, hormone refractory prostate cancer. *J Pathol* 218(4):505-513.
- Sjödahl, G., M. Lauss, S. Gudjonsson, F. Liedberg, C. Hallden, G. Chebil, W. Mansson, M. Hoglund and D. Lindgren. 2011. A systematic study of gene mutations in urothelial carcinoma; inactivating mutations in TSC2 and PIK3R1. *PLoS One* 6(4):e18583.
- Sun, C. H., Y. H. Chang and C. C. Pan. 2011. Activation of the PI3K/Akt/mTOR pathway correlates with tumour progression and reduced survival in patients with urothelial carcinoma of the urinary bladder. *Histopathology* 58(7):1054-1063.
- Tanaka, M., D. Koul, M. A. Davies, M. Liebert, P. A. Steck and H. B. Grossman. 2000. MMAC1/PTEN inhibits cell growth and induces chemosensitivity to doxorubicin in human bladder cancer cells. *Oncogene* 19(47):5406-5412.
- Tosoni, I., U. Wagner, G. Sauter, M. Egloff, H. Knonagel, G. Alund, F. Bannwart, M. J. Mihatsch, T. C. Gasser and R. Maurer. 2000. Clinical significance of interobserver differences in the staging and grading of superficial bladder cancer. *BJU Int* 85(1):48-53.
- Tredan, O., I. Treilleux, Q. Wang, N. Gane, D. Pissaloux, N. Bonnin, T. Petit, J. Cretin, N. Bonichon-Lamichhane, F. Priou, S. Lavau-Denes, V. Mari, G. Freyer, D. Lebrun, J. Alexandre and I. Ray-Coquard. 2012. Predicting everolimus treatment efficacy in patients with advanced endometrial carcinoma: a GINECO group study. *Target Oncol*.
- Tsuruta, H., H. Kishimoto, T. Sasaki, Y. Horie, M. Natsui, Y. Shibata, K. Hamada, N. Yajima, K. Kawahara, M. Sasaki, N. Tsuchiya, K. Enomoto, T. W. Mak, T. Nakano, T. Habuchi and A. Suzuki. 2006. Hyperplasia and carcinomas in Pten-deficient mice and reduced PTEN protein in human bladder cancer patients. *Cancer Res* 66(17):8389-8396.
- Verhagen, P. C., P. W. van Duijn, K. G. Hermans, L. H. Looijenga, R. J. van Gurp, H. Stoop, T. H. van der Kwast and J. Trapman. 2006. The PTEN gene in locally progressive prostate cancer is preferentially inactivated by bi-allelic gene deletion. *J Pathol* 208(5):699-707.
- Wagner, U., K. Suess, T. Luginbuhl, U. Schmid, D. Ackermann, T. Zellweger, R. Maurer, G. Alund, H. Knonagel, M. Rist, P. Jordan, H. Moch, M. J. Mihatsch, T. C. Gasser and G. Sauter. 1999. Cyclin D1 overexpression lacks prognostic significance in superficial urinary bladder cancer. *J Pathol* 188(1):44-50.

- Wang, D. S., K. Rieger-Christ, J. M. Latini, A. Moinzadeh, J. Stoffel, J. A. Pezza, K. Saini, J. A. Libertino und I. C. Summerhayes. 2000. Molecular analysis of PTEN and MXI1 in primary bladder carcinoma. *Int J Cancer* 88(4):620-625.
- Wang, M. R., B. Perissel, J. Taillandier, J. L. Kemeny, Y. Fonck, A. Lautier, M. Benkhalifa und P. Malet. 1994. Nonrandom changes of chromosome 10 in bladder cancer. Detection by FISH to interphase nuclei. *Cancer Genet Cytogenet* 73(1):8-10.
- Whang, Y. E., X. Wu, H. Suzuki, R. E. Reiter, C. Tran, R. L. Vessella, J. W. Said, W. B. Isaacs und C. L. Sawyers. 1998. Inactivation of the tumor suppressor PTEN/MMAC1 in advanced human prostate cancer through loss of expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(9):5246-5250.
- Wild, P. J., L. A. Kunz-Schughart, R. Stoehr, M. Burger, H. Blaszyk, R. Simon, T. Gasser, M. Mihatsch, G. Sauter und A. Hartmann. 2005. High-throughput tissue microarray analysis of COX2 expression in urinary bladder cancer. *Int J Oncol* 27(2):385-391.
- Witjes, J. A., L. A. Kiemeney, H. E. Schaafsma und F. M. Debruyne. 1994. The influence of review pathology on study outcome of a randomized multicentre superficial bladder cancer trial. Members of the Dutch South East Cooperative Urological Group. *Br J Urol* 73(2):172-176.
- Wu, X., T. Obata, Q. Khan, R. A. Highshaw, R. De Vere White und C. Sweeney. 2004. The phosphatidylinositol-3 kinase pathway regulates bladder cancer cell invasion. *BJU Int* 93(1):143-150.
- Wu, X. R. 2005. Urothelial tumorigenesis: a tale of divergent pathways. *Nat Rev Cancer* 5(9):713-725.
- Wu, Z. X., T. B. Song, D. M. Li, X. T. Zhang und X. L. Wu. 2007. Overexpression of PTEN suppresses growth and induces apoptosis by inhibiting the expression of survivin in bladder cancer cells. *Tumour Biol* 28(1):9-15.
- Yoo, L. I., D. W. Liu, S. Le Vu, R. T. Bronson, H. Wu und J. Yuan. 2006. Pten deficiency activates distinct downstream signaling pathways in a tissue-specific manner. *Cancer Res* 66(4):1929-1939.
- Yoshimoto, M., I. W. Cunha, R. A. Coudry, F. P. Fonseca, C. H. Torres, F. A. Soares und J. A. Squire. 2007. FISH analysis of 107 prostate cancers shows that PTEN genomic deletion is associated with poor clinical outcome. *Br J Cancer* 97(5):678-685.
- Younes, M., J. Sussman und L. D. True. 1990. The usefulness of the level of the muscularis mucosae in the staging of invasive transitional cell carcinoma of the urinary bladder. *Cancer* 66(3):543-548.
- Zhang, F. F., D. A. Arber, T. G. Wilson, M. H. Kawachi und M. L. Slovak. 1997. Toward the validation of aneusomy detection by fluorescence in situ hybridization in bladder cancer: comparative analysis with cytology, cytogenetics, and clinical features predicts recurrence and defines clinical testing limitations. *Clin Cancer Res* 3(12 Pt 1):2317-2328.

## 7.2. Monographien

- Sauter, G., F. Algaba, M.B. Amin, C. Busch, J. Cheville, T. Gasser, D.J. Grignon, F. Hofstadter, A. Lopez-Beltran und J.I. Epstein. 2004. Non-invasive urothelial tumours. In: *World Health Organization Classification of Tumors. Pathology and Genetics: Tumors of the Urinary System and Male Genital Organs*. Eble, J.

N., Sauter, G., Epstein, J. I. & Sesterhenn, I.(Hrsg.), PP110 IARCC Press, Lyon, 2004.

Hertle, L., S. Bierer, J. Gschwend, V. Dorp, S. Hautmann, R. Hautmann, H. Rübber, G. Börgermann, K.-P. Dieckmann, H. Huland, M. Graefen, R. de Petriconi und M. Meilinger. 2010. Tumoren. In: Urologie. Hautmann (Hrg.) Springer, Berlin, Heidelberg 189-267.

### **7.3. Internetquellen**

Raphael Schmidt. 2005. Tissue Microarrays. Hamburg

[online im Internet.] URL:

<http://www.uke.de/institute/pathologie/downloads/institut-pathologie/abb05.jpg>

[Stand: 03.12.2012, 14.45].

## **8. Danksagung**

Ich bedanke mich ganz herzlich bei allen Menschen, die mich während der Arbeit an meiner Dissertation unterstützt haben und ohne die diese nicht möglich gewesen wäre.

An erster Stelle danke ich Herrn Prof. Dr. med. Guido Sauter, Direktor des Instituts für Pathologie am UKE, für die Möglichkeit, diese Arbeit zu verfassen und seine volle Unterstützung.

Ganz besonders danke ich Frau Dr. med. Sarah Minner für eine außergewöhnlich herzliche Betreuung und besondere Förderung meiner Arbeit.

Ich danke Herrn Dr. rer. nat. Ronald Simon, Lia Burkhardt, Antje Krohn, Martina Kluth, Gabi Rieck, Silvia Schnöger, Sascha Eghtessadi, Christina Koop und allen anderen Mitarbeitern des Instituts für Pathologie, die mich immer hilfsbereit und geduldig bei meiner Arbeit unterstützt haben und bei denen ich viel gelernt habe.

Vielen Dank auch an Sawinee Pandamau für die Zeit und Geduld, die sie für mich aufgewendet hat.

Ich möchte mich bei meinen Eltern Arno und Cornelia Cordes bedanken, die mir durch ihre bedingungslose Unterstützung das Studium und diese Arbeit ermöglicht haben.

Zuletzt danke ich Lisa und Lotta Cordes, Kira Renzelmann, Livia Fuhrmann, Malte Franz und ganz besonders Axel Rienhoff dafür, dass sie in den letzten Jahren immer, in jeglicher Hinsicht, für mich da waren.

## **9. Lebenslauf**

*(entfällt aus datenschutzrechtlichen Gründen)*

## **10. Eidesstattliche Erklärung**

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Ich erkläre mich einverstanden, dass meine Dissertation vom Dekanat der Medizinischen Fakultät mit einer gängigen Software zur Erkennung von Plagiaten überprüft werden kann.

Unterschrift: .....