

UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Institut für Pathologie

Prof. Dr. Guido Sauter

**Heterogenität von HER2-, EGFR- und Cyclin D1-Amplifikationen
beim Urothelkarzinom der Harnblase**

Dissertation

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

vorgelegt von:

Christoph Handel
aus Magdeburg

Hamburg 2013

**Angenommen von der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 16.05.2013**

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

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: Prof. Dr. Guido Sauter

Prüfungsausschuss, zweite/r Gutachter/in: Prof. Dr. Thorsten Schlomm

Prüfungsausschuss, dritte/r Gutachter/in: Prof. Dr. Margit Fisch

Tag der mündlichen Prüfung: 30.07.2013

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	5
1.1 Epidemiologie	5
1.2 Ätiologie/Risikofaktoren	5
1.3 Klinik	7
1.3.1 Symptome.....	7
1.3.2 Diagnostik.....	7
1.4 Pathologie	8
1.5 Stadieneinteilung	9
1.6 Prognostische und prädiktive Faktoren	10
1.6.1 Klinische Faktoren	10
1.6.2 Morphologische Faktoren.....	10
1.6.3 Genetische Faktoren	10
1.7 Therapie	11
1.7.1 Therapie nicht-invasiver und stromainvasiver Harnblasenkarzinome (pTis, pTa, pT1)	11
1.7.2 Therapie muskelinvasiver Harnblasenkarzinome (\geq pT2).....	12
1.8 Molekulare Grundlagen des Urothelkarzinoms	13
1.9 HER2 und EGFR	14
1.10 Cyclin D1	16
1.11 Ziel der Arbeit	18
2. Material und Methoden	19
2.1 Patientenkollektiv	19
2.2 Kontrollgewebe	19
2.3 TMA-Herstellung	19
2.4 Aufbau der TMAs	21
2.5 Fluoreszenz in-situ Hybridisierung (FISH)	23
2.5.1 Vorbehandlung.....	23
2.5.2 Hybridisierung.....	23
2.5.3 Waschen und Gegenfärbung.....	24
2.5.4 FISH-Auswertung	24
2.6 Statistik	25
3. Ergebnisse	26
3.1 Technische Aspekte der FISH-Untersuchung	26
3.1.1. Auswertung der Prävalenz-TMAs	26
3.1.2 Auswertung der Heterogenitäts-TMAs.....	26
3.2 Auswertung der Prävalenz der Genamplifikation	26
3.2.1 HER2	26
3.2.2 EGFR.....	27
3.2.3 Cyclin D1	28
3.3 Auswertung der Heterogenitäts-TMAs	29
3.3.1 HER2	30
3.3.2 EGFR.....	30
3.3.3 Cyclin D1	31
4. Diskussion	32
5. Zusammenfassung	39
6. Abkürzungsverzeichnis	40
7. Literaturverzeichnis	41
8. Danksagung	49

9. Lebenslauf.....	50
10. Eidesstattliche Versicherung.....	51

1. Einleitung

1.1 Epidemiologie

Das Harnblasenkarzinom ist das siebthäufigste Karzinom weltweit und das zweithäufigste Karzinom des Urogenitaltrakts. In der Bundesrepublik werden jährlich etwa 16.000 Harnblasenkarzinome neu diagnostiziert, 5500 Patienten versterben jedes Jahr (2008) (Robert-Koch-Institut). Weltweit ist das Harnblasenkarzinom für 3,2% aller Krebserkrankungen verantwortlich und tritt deutlich häufiger beim Mann als bei der Frau auf (im Verhältnis 3,5 : 1 weltweit), am häufigsten in Westeuropa, Nordamerika und Australien (DM Parkin, 2003). Der Großteil der Harnblasenkarzinome (Männer 84% und Frauen 79%) geht vom Urothel aus, 70% davon sind bei Erstdiagnose nicht-invasiv. Die Rate an Rezidiven liegt bei etwa 50% und 5-10% gehen in ein invasives Karzinom über (JN Eble, 2004). Andere Entitäten des Harnblasenkarzinoms, wie zum Beispiel das Plattenepithelkarzinom (1,1%) oder das Adenokarzinom (2,8%) kommen weit weniger häufig vor (DM Parkin, 2003). Mit zunehmenden Alter steigt die Inzidenz bis zum Altersmedian von 65 Jahren an (Grignon, 1997).

1.2 Ätiologie/Risikofaktoren

Etliche Risikofaktoren für die Entwicklung des Harnblasenkarzinoms sind bekannt, wobei der wichtigste Risikofaktor das Rauchen ist. Raucher haben ein 2 bis 6-fach erhöhtes Risiko ein Harnblasenkarzinom zu entwickeln (Brennan et al., 2000, Castela et al., 2001, Negri and La Vecchia, 2001). Langjährige Raucher (60 Jahre und länger) haben ein 5-6-fach höheres Risiko an einem Harnblasenkarzinom zu erkranken (Brennan et al., 2000). Auch die Menge an gerauchten Zigaretten erhöht das Risiko signifikant (3-fach bei 40 Zigaretten und mehr pro Tag) (Brennan et al., 2000).

Die Belastung mit verschiedenen Substanzen am Arbeitsplatz ist ebenfalls ein Risikofaktor für die Entwicklung eines Harnblasenkarzinoms, zuerst beschrieben von Rehn 1895 bei Arbeitern in der Anilin-Färbeindustrie (Dietrich and Dietrich, 2001). Darauf folgende Untersuchungen identifizierten die aromatischen Verbindungen Benzidin und 2-Naphtylamin als ursächlich für die Entstehung des Harnblasenkarzinoms (Clayson, 1981). Bis zu 25% der Harnblasenkarzinome werden auf eine berufliche Belastung mit den entsprechenden Karzinogenen zurückgeführt (Pashos et al., 2002).

Bereits in den frühen achtziger Jahren zeigten verschiedene epidemiologische Studien einen Zusammenhang zwischen einem chronischen Analgetikaabusus mit Phenacetin und einem erhöhten Risiko an einem Urothelkarzinom des Nierenbeckens, des Ureters und der Harnblase zu erkranken (Piper et al., 1985).

Das Zytostatikum Cyclophosphamid ist nicht nur an der Entstehung von Leukämien und Lymphomen beteiligt sondern erhöht zusätzlich auch das Risiko für die Entstehung von Plattenepithelkarzinomen und Leiomyosarkomen der Harnblase (Tanguay et al., 2003).

Eine chronische Infektion der Harnblase mit *Schistosoma haematobium* kann die Entstehung eines Plattenepithelkarzinoms ebenfalls begünstigen. Auch chronische Entzündungen der ableitenden Harnwege und Harnleitersteine werden von einigen Autoren als Risikofaktoren genannt.

Als weiterer Risikofaktor für die Entstehung eines Harnblasenkarzinoms gilt die Verwendung von chloriertem Trinkwasser und mit Arsen kontaminiertes Trinkwasser (Cantor et al., 1998, Hopenhayn-Rich et al., 1996, Smith et al., 1998).

1.3 Klinik

1.3.1 Symptome

Das Ausmaß der klinischen Symptome hängt stark von der Ausbreitung und der Größe des Tumors ab. Das häufigste Symptom ist die schmerzlose Makrohämaturie, die bei 85% der Patienten vorkommt. Bei sehr großen Tumoren kann aufgrund der geringeren Blasenkapazität eine Pollakisurie vorkommen. Je nach Lokalisation der Tumoren können auch Dysurie (bei Tumoren im Blasen Hals) oder eine Hydronephrose (bei Tumoren im Bereich der Uretermündung) auftreten. Bei fortgeschrittenem Tumorleiden kommen auch Gewichtsverlust, Abdominalschmerzen und Knochenschmerzen aufgrund von Metastasen vor.

1.3.2 Diagnostik

Die Diagnose des Harnblasenkarzinoms wird zystoskopisch gestellt. Bei zystoskopischem Verdacht auf ein Carcinoma in-situ des Urothels ist die Urinzytologie erforderlich. In allen anderen Situationen wird die Urinzytologie fakultativ durchgeführt. Bei makroskopisch sichtbaren Tumoren hat die transurethrale Elektroresektion (TUR-B) sowohl diagnostische als auch therapeutische Bedeutung. Es werden getrennte Biopsien aus dem Tumorgrund (inklusive Detrusormuskulatur) und aus den Tumorrändern entnommen. Je nach zystoskopischem Befund erfolgt noch ein sogenanntes „Mapping“ aus verschiedenen Arealen der Harnblase, um unter anderem ein zusätzliches Carcinoma in-situ auszuschließen. Die weitere Diagnostik richtet sich nach dem histologischen Ergebnis (pT-Stadium und Tumorgrad). Bei muskelinvasiven Harnblasenkarzinomen (\geq pT2) und bei klinischem Verdacht auf einen lokal fortgeschrittenen Tumor dienen MRT und CT zur Ausbreitungsdiagnostik und als Entscheidungshilfen bei der weiteren Therapie.

1.4 Pathologie

Die Histologie des Urothelkarzinoms ist sehr variabel. Stromainvasive Tumoren (pT1) können sowohl „low grade“ als auch „high grade“ sein und weisen meist ein papilläres Wachstumsmuster auf. Muskelinvasive Tumoren (pT2-4) sind hingegen fast immer „high grade“ und zeigen meist ein nicht-papilläres Wachstumsmuster.

Die Gradierung der Tumoren erfolgt seit der WHO-Klassifikation 2004 nur in „low grade“ oder „high grade“ und hängt von dem Grad der zytologischen Atypien und der Architektur ab, wobei es hier keine einheitlichen Kriterien gibt.

Die Morphologie des invasiven Urothelkarzinoms ist nicht spezifisch, so dass die eindeutige Zuordnung eines malignen Tumors in Harnblasenbiopsien in manchen Fällen ohne Bezug zum Oberflächenurothel und ohne Veränderungen des Oberflächenurothels im Sinne von Urotheldysplasie bzw. Carcinoma in-situ unmöglich ist.

Es gibt verschiedene histologische Varianten des Urothelkarzinoms, wobei eine squamöse und glanduläre Differenzierung am häufigsten nachweisbar ist. Seltene Typen sind die sogenannte „nested“ Variante, mikrozystische Variante, mikropapilläre Variante, „Lymphoepithelioma-like“ Variante, „Lymphoma-like“ und plasmazytoide Variante, sarkomatoide Variante, das Urothelkarzinom mit Riesenzellen, das Urothelkarzinom mit trophoblastärer Variante, „Clear cell“ Variante, „Lipid-cell“ Variante und das undifferenzierte Karzinom.

1.5 Stadieneinteilung

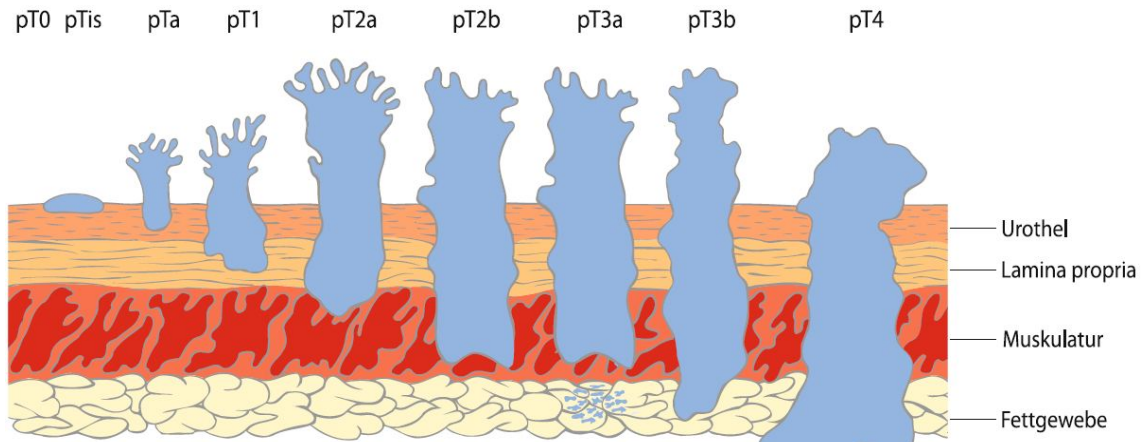


Abb. 1 TNM-Klassifikation des Harnblasenkarzinoms (aus: Hertle et al. 2010)

Die Stadieneinteilung der Harnblasenkarzinome erfolgt je nach Infiltrationstiefe (siehe Abbildung 1). Ein besonderes Tumorstadium stellt das Stadium pTa dar, welches ein nicht-invasives papilläres Urothelkarzinom klassifiziert. Die in älteren und vor allem klinischen Lehrbüchern immer noch anzutreffende Einteilung der Harnblasenkarzinome in oberflächliche (pTa, pT1, Carcinoma in situ) und invasive (pT2 und höhere Stadien) Karzinome ist falsch und sollte heute nicht mehr angewendet werden. Umfassende genetische Untersuchungen haben gezeigt, dass sich pT1- und pT2-4-Urothelkarzinome auf der genetischen Ebene nur marginal unterscheiden (Richter et al., 1998).

Die Unterscheidung zwischen einem nicht-invasiven und einem minimal-invasiven (pT1) Urothelkarzinom kann sehr schwierig sein. Insbesondere bei pTa-Tumoren kommt es immer wieder zur fehlerhaften Diagnose einer oberflächlichen Stromainvasion (Diagnose eines Stadiums pT1 statt pTa). In mehreren Studien wurden ursprünglich als pT1-klassifizierte Urotheltumoren von einem Spezialisten nachbeurteilt. In der bisher größten diesbezüglichen Untersuchung stufte die Arbeitsgruppe Tosoni 35% ihrer initialen pT1-Karzinome zu einem Stadium pTa zurück (Tosoni et al., 2000).

1.6 Prognostische und prädiktive Faktoren

1.6.1 Klinische Faktoren

Tumormultifokalität, Tumorgröße von >3cm und gleichzeitiges Vorkommen eines Carcinoma in-situ sind Risikofaktoren für ein Rezidiv und eine Tumorprogression (Rodriguez-Alonso et al., 2002). Tumorausbreitung außerhalb der Harnblase, Infiltration der Uretermündung (Haleblian et al., 1998), Lymphknotenmetastasen und systemische Tumormanifestation sprechen für eine schlechte Prognose.

1.6.2 Morphologische Faktoren

Tumorstadium und Tumorgrad sind die wichtigsten morphologischen Prognosefaktoren, wobei der Tumorgrad nur bei pT1-Tumoren eine prognostische Aussagekraft hat, da die meisten muskelinvasiven Tumoren ohnehin schlecht differenziert sind.

Einige Varianten des Urothelkarzinoms, wie beispielsweise das mikropapilläre (Johansson et al., 1999) oder das sarkomatoide Urothelkarzinom (Lopez-Beltran et al., 1998) haben eine besonders schlechte Prognose.

Eine Häm- und insbesondere Lymphangioinvasion korreliert zwar mit einer schlechteren 5-Jahres-Überlebensrate (Lapham et al., 1997), ist aber wahrscheinlich aufgrund von Spaltartefakten überdiagnostiziert.

Wie auch in anderen Tumoren spricht ein sogenanntes „pushing front of invasion“ für eine bessere Prognose als eine sogenannte „tentacular invasion“ (Jimenez et al., 2000).

1.6.3 Genetische Faktoren

Trotz zahlreicher Studien gibt es bislang keine genetische Veränderung, die einen überzeugenden prädiktiven Wert besitzt und in die Klinik eingeführt wurde. Einige Studien in den 90er Jahren konnten zeigen, dass Veränderungen des TP53 Tumorsuppressorgens in Form einer immunhistochemisch nachweisbaren Akkumulation des TP53 Proteins mit einer schlechteren Prognose sowohl bei pT1

(Grossman et al., 1998) als auch bei pT2-4 (Esrig et al., 1994) Tumoren korrelierte. Verschiedene darauffolgende Studien konnten jedoch dieses Ergebnis nicht bestätigen (Fleshner et al., 2000, Lianes et al., 1998). Gründe dafür könnten unter anderem die hohe Interobservervariabilität von pTa/pT1-Tumoren sein (p53 negative pTa-Tumoren mit guter Prognose in der Gruppe der pT1) und die schlechte Reproduzierbarkeit von immunhistochemischen Protokollen. Auch die Zellzyklusregulatoren p21 (Stein et al., 1998), p27 (Tiguert et al., 2002), das Tumorsuppressorgen Retinoblastom (Rb) (Cordon-Cardo et al., 1992, Cote et al., 1998), die Rezeptortyrosinkinasen HER2 (Lonn et al., 1995, Sato et al., 1992), EGFR (Mellon et al., 1995, Messing, 1990), das Ausmaß der Angiogenese (Bochner et al., 1995) und das Enzym Cyclooxygenase (COX) (Tiguert et al., 2002) wurden als prognostische Marker in einigen Studien vorgeschlagen, konnten jedoch aufgrund fehlender Validierung in Folgestudien nicht überzeugen (Jahnson et al., 1995, Lipponen, 1993, Thogersen et al., 1999, Lianes et al., 1998, Kim et al., 2002).

1.7 Therapie

Die Therapie des Harnblasenkarzinoms richtet sich nach Tumorstadium, Tumorgrad, Tumorgröße, Tumormultifokalität und begleitendem Carcinoma in-situ. Die nachfolgenden Therapieempfehlungen entsprechen einer Leitlinie erstellt durch die Deutsche Gesellschaft für Urologie (DGU).

1.7.1 Therapie nicht-invasiver und stromainvasiver Harnblasenkarzinome (pTis, pTa, pT1)

Die transurethrale Elektroresektion (TUR-B) hat bei papillären Tumoren diagnostische und therapeutische Bedeutung. Nach der TUR-B wird die Indikation zur adjuvanten Therapie in Form einer intravesikalen Rezidivprophylaxe gestellt. Nur nach kompletter

Resektion eines pTaG1-Tumors entfällt die intravesikale Instillationstherapie. Zur intravesikalen Rezidivprophylaxe stehen Zytostatika (Doxorubicin, Mitomycin C) und der Immunmodulator BCG (Bacillus Calmette-Guérin) zur Verfügung. Bei Patienten mit einem hohen Progressionsrisiko (G3-Tumoren, Rezidivtumoren) wird eine intravesikale Behandlung mit BCG bevorzugt.

pT1G3-Tumoren stellen eine besondere Gruppe dar, da sie genetisch besonders instabil und daher häufig progredient sind. Hier ist zwar nach vollständiger TUR der Versuch der organerhaltenden Therapie mittels intravesikaler BCG-Instillationsprophylaxe gerechtfertigt, bei einem Rezidiv innerhalb von drei bis sechs Monaten ist die radikale Zystektomie jedoch indiziert.

Auch beim Carcinoma in-situ des Urothels (pTis) ist das Rezidiv- und Progressionsrisiko hoch, so dass die adjuvante intravesikale medikamentöse Therapie mit BCG nach der TUR obligat ist und eine radikale Zystektomie bei Therapieversagen indiziert ist.

1.7.2 Therapie muskelinvasiver Harnblasenkarzinome (\geq pT2)

1.7.2.1 Radikale Zystektomie

Die Therapie der Wahl bei organbegrenzten, muskelinvasiven Harnblasenkarzinomen ist die radikale Zystektomie mit pelviner Lymphadenektomie. Das operative Vorgehen der radikalen Zystektomie beim Mann beinhaltet die Entfernung von Harnblase, Prostata und Samenblasen. Die radikale Zystektomie bei der Frau beinhaltet die Entfernung von Harnblase, Uterus, Adnex(en) und vorderer Vaginalwand.

1.7.2.2 Radiotherapie

Eine definitive Strahlentherapie wird nur bei Patienten angewendet, die für eine radikale Zystektomie nicht geeignet sind bzw. diese ablehnen oder einen Organerhalt wünschen.

1.7.2.3 Systemische Chemotherapie

Bei Patienten im metastasierten Stadium stellt die Kombinations-Chemotherapie aus zwei bis vier Substanzen den aktuellen Standard dar. Neben dem klassischen M-VAC-Schema aus Methotrexat, Vinblastin, Doxorubicin (=Adriamycin) und Cisplatin können verschiedene Kombinationsprotokolle aus Cisplatin, Docetaxel, Paclitaxel und Gemcitabine gewählt werden.

1.8 Molekulare Grundlagen des Urothelkarzinoms

Man kann aufgrund genetischer Veränderungen zwei grundsätzlich unterschiedliche Gruppen des Urothelkarzinoms unterscheiden. Die genetisch stabile Gruppe umfasst „low grade“ nicht-invasive papilläre Urothelkarzinome (pTa, G1-G2), welche zwar häufig rezidivieren, jedoch nur ein geringes Progressionsrisiko aufweisen. Dem gegenüber steht die genetisch instabile Gruppe mit nicht-invasiven papillären „high grade“ Urothelkarzinomen (pTa, G3), dem Carcinoma in-situ (pTis) und den invasiven Urothelkarzinomen (pT1-4).

Die erste Gruppe weist nur wenige genetische Veränderungen auf, der DNA-Gehalt ist häufig diploid oder peridiploid. Besonders häufig sind Verluste von Chromosom 9 oder von Teilen von Chromosom 9 und FGFR 3- Mutationen (Tsai et al., 1990, Billerey et al., 2001). Die zweite Gruppe mit „high grade“ Neoplasien und invasiven Urothelkarzinomen zeigt eine Vielzahl von genetischen Veränderungen, einschließlich Chromosom 9-Verlusten. Eine Vielzahl der Tumoren dieser Gruppe weisen p53-Mutationen auf (Cordon-Cardo et al., 1994). Oft bestehen numerische Veränderungen in Form von Zugewinnen bzw. Amplifikationen, über 90% der Tumoren zeigen eine DNA-Aneuploidie (Richter et al., 1997). Ein aktuelles Modell der Entstehung von urothelialen Neoplasien ist in Abb. 2 dargestellt.

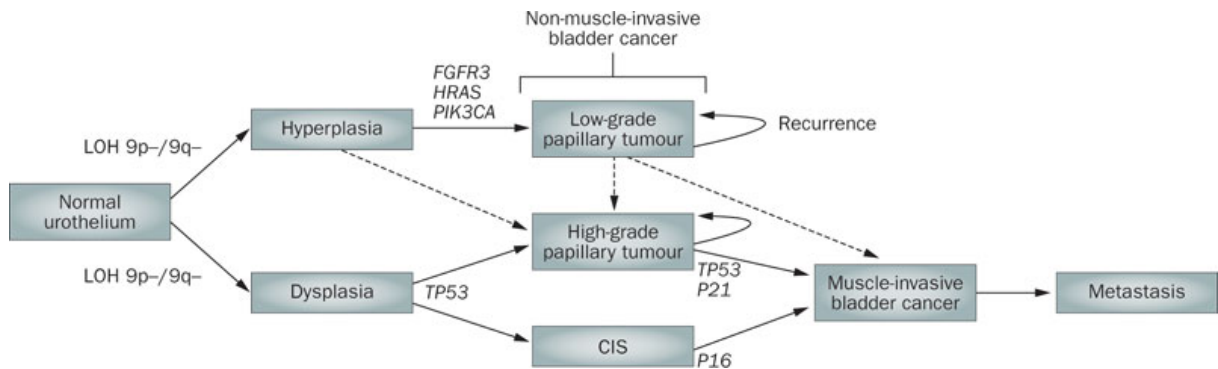


Abbildung 2: Der Entstehungsmechanismus von zwei unterschiedlichen Gruppen von Urothelkarzinomen. (Abbildungsquelle: (Falke and Witjes, 2011))

1.9 HER2 und EGFR

HER2 (Chromosom 17q12) und EGFR (Chromosom 7p11) gehören zu der Gruppe der Rezeptortyrosinkinasen. Rezeptortyrosinkinasen spielen eine zentrale Rolle in der interzellulären Signaltransduktion. Sie sind integrale Membranproteine mit einer extrazellulären Liganden-bindenden Domäne, einer Transmembran-Domäne und einer zytosolischen katalytischen Domäne. Durch die Bindung des Liganden wird die Tyrosin-spezifische Proteinkinaseaktivität des Rezeptors stimuliert und damit eine Kaskade von Signalen ausgelöst, die schließlich eine Änderung der physiologischen Aktivität der Zelle und des Gen-Expressions-Musters bewirken. Die von den verschiedenen RTKs initiierten Signale beeinflussen ein breites Spektrum zellulärer Funktionen, wie die Steuerung von Zellproliferation und -differenzierung, die Förderung des Zellüberlebens und die Änderung des Zellstoffwechsels (Blume-Jensen and Hunter, 2001, Robinson et al., 2000). Aufgrund dieser Funktion tragen deregulierte Kinaseaktivitäten häufig zu einer malignen Transformation bei. Etwas mehr als die Hälfte der bekannten RTKs wurden wiederholt bei malignen Transformationen aberrant ausgeprägt und/oder aktiviert gefunden (Blume-Jensen and Hunter, 2001). Aberrante RTK-Aktivitäten können verschiedene Ursachen haben. Sie können auf sehr starke

Expression, verursacht durch Gen-Amplifikationen oder Translokationen, zurückzuführen sein oder auf konstitutive Aktivierung durch Punktmutationen oder Fusionen mit anderen Genen, die zu einer permanenten Dimerisierung führen. Eine weitere Möglichkeit besteht in einer autokrinen oder parakrinen Ligandenaktivierung. Da RTKs eine zentrale Rolle in der Pathogenese vieler Tumoren spielen, stellen sie einen Angriffspunkt in der Gen-spezifischen Therapie („targeted therapy“) von verschiedenen Neoplasien dar. Gegenwärtig werden überwiegend zwei verschiedene Formen der RTK-Hemmung verwendet: spezifische ATP-Analoga (sog. „small molecule“-RTK Inhibitoren), wie Imatinib, und monoklonale Antikörper, wie Trastuzumab oder Cetuximab (siehe Abbildung 3).

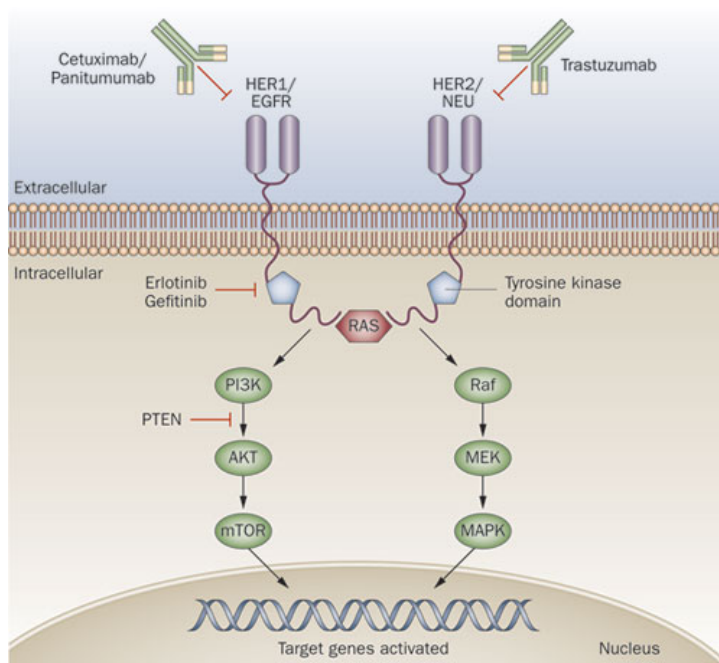


Abbildung 3: Inaktivierung des EGFR- bzw.- HER2-Signaltransduktionskaskade durch die monoklonalen Antikörper Cetuximab/Panitumumab und Trastuzumab in einer Tumorzelle (Abbildungsquelle: (La Thangue and Kerr, 2011))

HER2 wird in 40-75% der invasiven Urothelkarzinome überexprimiert (Gandour-Edwards et al., 2002, Kruger et al., 2002, Wulfing et al., 2005) und stellt damit den Tumor mit der höchsten HER2-Überexpression dar. Im Gegensatz zum

Mammakarzinom ist jedoch die Überexpression nicht Folge einer Genamplifikation. Lediglich 5-16% der Urothelkarzinome weisen eine HER2-Amplifikation (Underwood et al., 1995, Lae et al., 2010, Tapia et al., 2007) auf. Die Ursache für die Überexpression bei den nicht-amplifizierten Fällen ist bislang unklar. Eine Studie konnte zeigen, dass HER2-Überexpression ein unabhängiger Prognosemarker für krankheitsspezifisches Überleben ist (Kruger et al., 2002). Eine Anti-HER2-Therapie mit Trastuzumab hat beim Harnblasenkarzinom insgesamt eher enttäuschende Resultate erbracht.

Eine EGFR-Amplifikation lässt sich in 3–5%, eine EGFR-Expression in 30–74% der Harnblasenkarzinome nachweisen (Berger et al., 1987, Chow et al., 1993, Gorgoulis et al., 1995, Lipponen and Eskelinen, 1994, Nguyen et al., 1994, Sauter et al., 1994, Wright et al., 1991, Chaux et al., 2012). In verschiedenen Studien konnte eine EGFR-Amplifikation/Expression mit Tumorproliferation und schlechter Prognose korreliert werden (Chow et al., 2001, Sauter et al., 1994). In Zelllinien konnte zudem gezeigt werden, dass Zellproliferation durch Gefitinib (ein EGFR-Inhibitor) blockiert wird (Dominguez-Escrig et al., 2004, Shrader et al., 2007). In zwei Phase-II-Studien konnte jedoch kein zusätzlicher Nutzen durch Gefitinib nachgewiesen werden (Philips et al., 2009, Petrylak et al., 2010).

1.10 Cyclin D1

Cycline sind Proteine, die eine wichtige Funktion bei der Steuerung des Zellzyklus spielen. Das CCND1 Gen liegt auf dem Chromosom 11q13 und kodiert für das Cyclin D1 Protein, welches, wie auch Cyclin D2 und Cyclin D3 zu der Familie der D-Typ Cycline gehört. Diese können in Assoziation mit Cyclin-abhängigen Kinasen (CDKs, cyclin-dependent kinases), das Retinoblastom-Tumor-Suppressor-Protein (pRb) inaktivieren und das Zellwachstum von der G1-Phase zur S-Phase beschleunigen

(Abbildung 4). Andererseits kann Cyclin D1, CDK-unabhängig, durch seine Kontrollfunktion in der G1 Phase sämtliche Transkriptionsfaktoren beeinflussen (Ewen and Lamb, 2004). Eine Amplifikation oder Überexpression von Cyclin D1 spielt daher eine wichtige Rolle bei der Kanzerogenese von verschiedenen Tumoren, z. B. beim Mammakarzinom (Arnold and Papanikolaou, 2005), nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinom (Gautschi et al., 2007), Melanom (Li et al., 2006) oder Mantelzelllymphom (Bertoni et al., 2006).

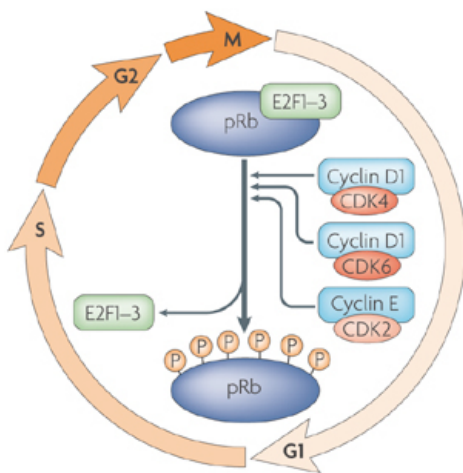


Abbildung 4: Durch Phosphorylierung wird das Retinoblastom-Tumor-Suppressor-Protein pRb, durch Holoenzyme (Cyclin D1-CDK4; Cyclin D1-CDK6, Cyclin E-CDK2) gesteuert inaktiviert. Dadurch wird der Transkriptionsfaktor E2F aus dem pRB-E2F-Komplex gelöst. Der Transkriptionsfaktor E2F führt wiederum zu einer Induktion der Transkription von Genen, die für die Progression von G1-Phase zur S-Phase notwendig sind. (Abbildungsquelle: (Coller, 2007))

Beim Harnblasenkarzinom konnte in 30-70% (Moonen et al., 2001, Suwa et al., 1998, Takagi et al., 2000, Wagner et al., 1999) eine Cyclin D1-Überexpression und in 10-20% (Bringuier et al., 1996, Proctor et al., 1991, Sauter et al., 1993, Schraml et al., 1999) eine Cyclin D1-Amplifikation gefunden werden. In einer Studie mit 392 Harnblasenkarzinomen konnte in 44% der Fälle eine Überexpression, sowie eine signifikante Assoziation mit niedrigem Tumorstadium und histologischem Grad, jedoch nicht mit der Tumorprogression nachgewiesen werden (Wagner et al., 1999). In einer weiteren Studie mit 163 Urothelkarzinomen fand sich weder ein Zusammenhang mit

Tumorstadium noch mit Zellproliferation (Suwa et al., 1998). In der Studie von Liukkonen et al (Liukkonen et al., 2000) mit 207 Urothelkarzinomen konnte Cyclin D1 ebenfalls keine zusätzliche prognostische Aussagekraft erzielen.

Wie alle Onkoproteine stellt auch Cyclin D1 ein attraktives Therapieziel dar. Im Gegensatz zu den Rezeptortyrosinkinasen HER2 und EGFR ist jedoch die Hemmung von Cyclin D1 aufgrund der fehlenden intrinsischen Enzymaktivität und der intrazellulären Lokalisation sehr viel schwieriger. Daher wird eine indirekte Hemmung von Cyclin D1, beispielsweise durch eine Hemmung Zyklin-abhängiger Kinasen CDK4/CDK6 (Fry et al., 2001) und in Kombination mit anderen Kinaseinhibitoren (Kim et al., 2011) in verschiedenen Studien getestet.

1.11 Ziel der Arbeit

HER2, EGFR und Cyclin D1 sind bekannte Ziele in der onkologischen Therapie. Eine wichtige Voraussetzung an ein solches Therapieziel ist, dass die genetische Veränderung im gesamten Tumor homogen vorhanden ist, andernfalls würde nur ein Subklon des Tumors therapiert werden. Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung der Prävalenz und der Heterogenität von HER2-, EGFR- und Cyclin D1-Amplifikationen mittels der Fluoreszenz in-situ Hybridisierung (FISH) an zwei unterschiedlichen Gewebemicroarray (TMA) mit insgesamt 302 Urothelkarzinomen der Harnblase.

2. Material und Methoden

2.1 Patientenkollektiv

Es wurden insgesamt 302 Patienten, die an einem Urothelkarzinom der Harnblase im Zeitraum von 1994-2008 operiert wurden, analysiert. Bei diesen Patienten wurde entweder eine Zystektomie oder eine transurethrale Resektion durchgeführt. Bei 146 Tumoren handelte es sich um ein Stadium pT1 (Infiltration der Lamina propria), bei den restlichen Tumoren um ein Stadium mindestens pT2 (Infiltration der Lamina muscularis propria), da bei einer transurethralen Resektion höchstens ein Stadium pT2 diagnostiziert werden kann.

2.2 Kontrollgewebe

Das Kontrollgewebe (n=68) beinhaltete normales Urothel der Harnblase (n=9), normales Urothel des Nierenbeckens (n=6), Nierenparenchym (n=2), Herzmuskulatur (n=2), Kolonschleimhaut (n=2), Lunge (n=2), Endometrium (n=2), Lymphknoten (n=2), Prostata (n=2); Skelettmuskulatur (n=2) und Haut (n=2).

2.3 TMA-Herstellung

Das Tumorarray-Verfahren macht es möglich bis zu 600 Gewebezylinder (Durchmesser 0,6mm – Abbildung 5) von histologisch definierten Regionen verschiedener Tumoren in einem einzigen Paraffinblock zu untersuchen.

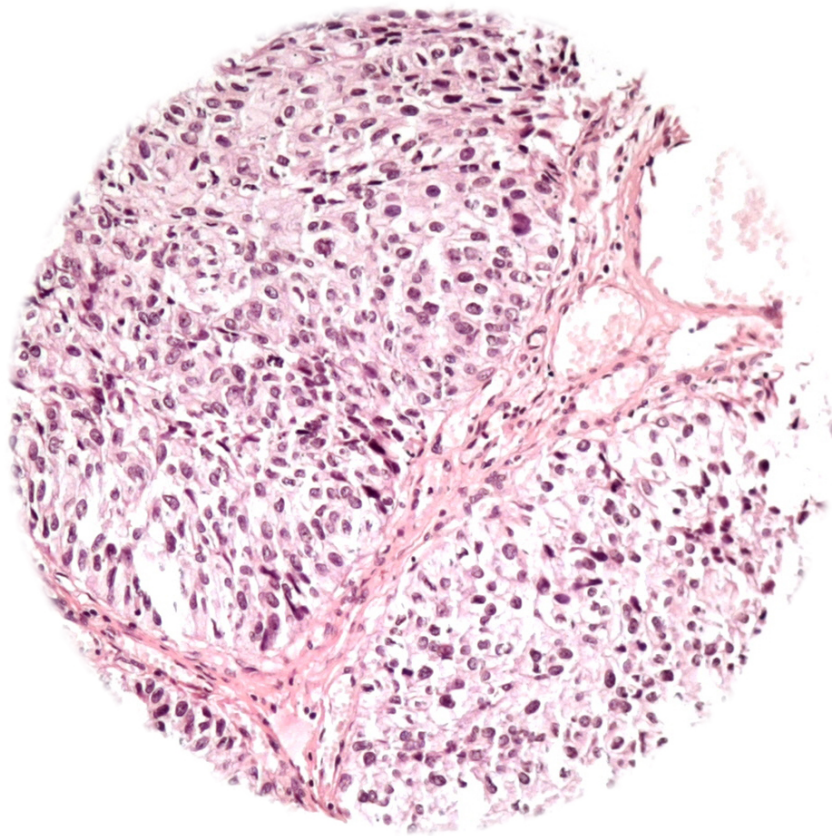


Abbildung 5: Beispiel für ein Urothelkarzinom, Durchmesser 0,6mm.

Mit Hilfe eines Array-Stanzgerätes (Abbildung 6) wird der TMA hergestellt. Das Array-Stanzgerät besteht aus zwei Nadeln. Eine dünnere Nadel ermöglicht es Löcher in die Empfängerblöcke zu stanzen; die dickere Nadel dient der Entnahme von Tumorgewebestücken aus den Spenderblöcken und deren Einbringen in den Empfängerblock.

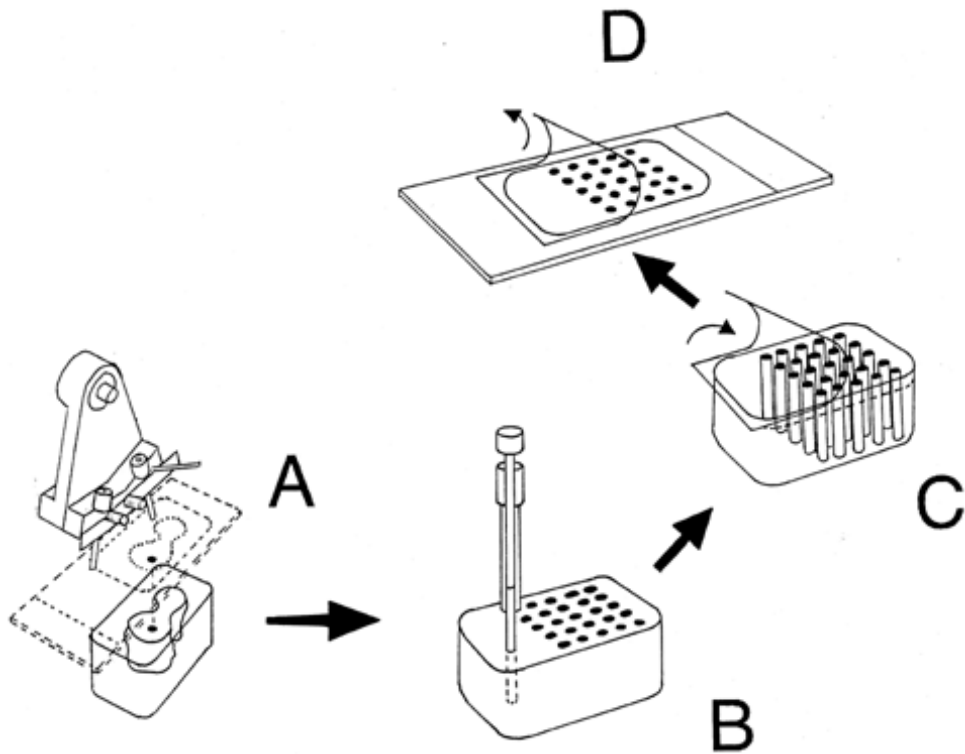


Abbildung 6. Das Instrument besteht aus einem dünnen, an der Spitze geschärften Hohlzylinder (innerer Durchmesser ca. 600 μ m), welcher in einem X-Y-Achsen Präzisionsgerät gehalten wird. Ein genau in den Hohlzylinder passender Stahldraht ermöglicht das Ausstoßen von gestanzten Gewebestücken in mit einem analogen Instrument (äußerer Durchmesser ca. 600 μ m) vorgefertigte Löcher im Empfängerblock (Tumor-Array).

2.4 Aufbau der TMAs

Zwei unterschiedliche TMAs wurden hergestellt:

A) Prävalenz-TMA:

Dieser TMA besteht aus 302 Tumoren und dient der Untersuchung der Prävalenz von molekularen Veränderungen.

		n auf TMA
Gesamt		302
Tumorstadium	pT1	146
	pT2 mind.	156
Tumorgrad	G1	1
	G2	100
	G3	201

Tabelle 1: Zusammensetzung des Prävalenz-TMAs

B) Heterogenitäts-TMA:

Dieser TMA besteht aus insgesamt 6 Blöcken mit jeweils 97 pT2 (mind.)-Tumoren und dient der Untersuchung der Heterogenität von molekularen Veränderungen. Von jedem dieser 97 Tumoren wurden jeweils aus 6 unterschiedlichen Gewebestücken eine Stanze entnommen und auf 6 Blöcken verteilt. Der Aufbau des Heterogenitäts-TMA ist in Abbildung 7 dargestellt.

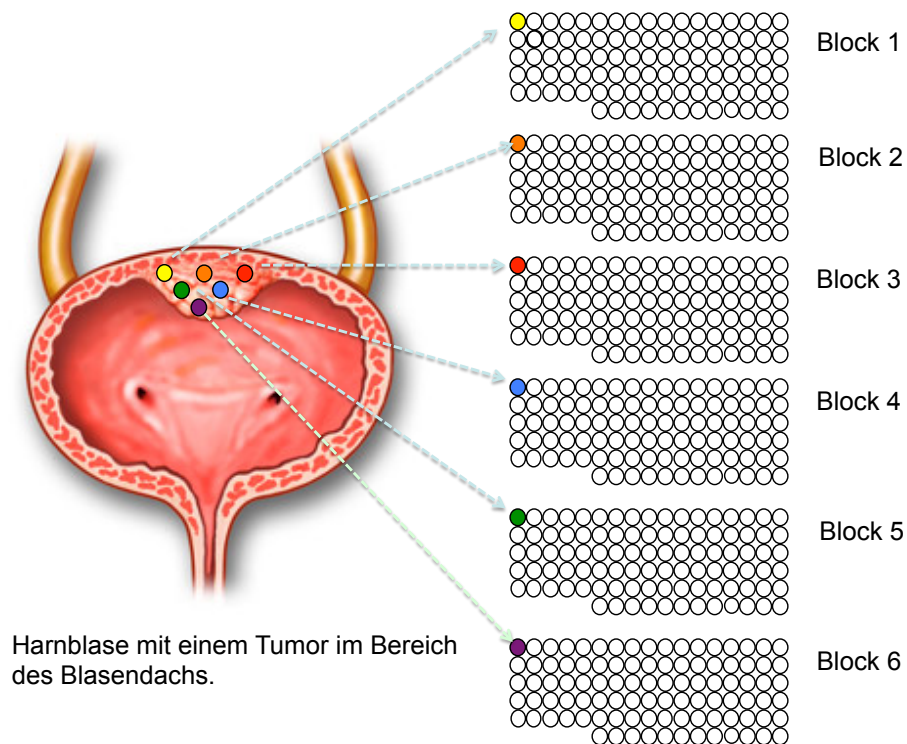


Abbildung 7: Übersichtsaufnahme des Harnblasen-Heterogenitäts-TMA. Jeder Tumor ist jeweils einmal auf einem Block repräsentiert.

2.5 Fluoreszenz in-situ Hybridisierung (FISH)

Mit der FISH-Technik können ausgewählte Gene selektiv markiert und im Fluoreszenzmikroskop erkannt werden. FISH basiert auf dem Prinzip, dass sich Einzelstrang-DNA an komplementäre DNA-Sequenzen spezifisch anlagert. Diese Methode ermöglicht bei gleichzeitiger Hybridisierung mit einer Zentromersonde, die das Chromosom markiert auf dem das zu untersuchende Gen sich in normalen Zellen befindet, numerische Aberrationen zu erfassen.

2.5.1 Vorbehandlung

Die Paraffinschnitte werden auf einem Objektträger, Superfrost plus, bei 56° C über Nacht im Brutschrank gebacken, anschließend 3 x 10 Minuten in Xylol und 2 x 5 Minuten in 96% Ethanol entparaffiniert und 3 Minuten auf der Heizplatte (48° C) luftgetrocknet.

Bevor die Zellen mit den FISH-Sonden hybridisiert werden konnten, mussten die Präparate vorbehandelt werden. Die Vorbehandlung dient dazu, die DNA für die Sonden zugänglich zu machen und die Zellen zu fixieren. Dazu wurden die Objektträger 15 Minuten in Pretreatment Reagent (Abbott, USA) bei 80° C im Wasserbad geschüttelt und danach mit H₂O gespült. Anschließend wurden die Präparate 45 bzw. 150 min in Proteaselösung bei 37° C geschüttelt und danach mit H₂O gespült.

In einer aufsteigenden Alkoholreihe (70% - 80% - 100% Ethanol, je 2 min) wurden die Präparate zum Schluss dehydriert und 20 min getrocknet.

2.5.2 Hybridisierung

Nach dieser Vorbehandlung wurden 10 µl Sondenansatz (Gensonde und Zentromersonde) auf das Präparat gegeben, mit einem Deckgläschen abgedeckt und mit Fixogum™ (Marabu, Tamm/Germany) abgedichtet. Die Präparate wurden dann bei

72°C im Thermobrite (Abbott, Wiesbaden-Delkenheim) für 5 min denaturiert und schließlich über Nacht bei 37°C (Brutschrank) hybridisiert.

2.5.3 Waschen und Gegenfärbung

Nach einer ca. 12-stündigen Hybridisierungszeit wurden die Präparate gewaschen. Fixogum™ wird entfernt und Objektträger in 2 X SSC (Sodium Chloride Sodium Citrate)/ 0,3% NP40 (Nonyl Phenoxy polythoxyethanol) pH 7,2-7,4, 2 Minuten bei 72°C gewaschen, kurz mit H₂O gespült und im Dunkeln luftgetrocknet. Die Zellkerne wurden im nächsten Schritt mit 10 µl DAPI (4',6-Diamidin-Phenylindol-Dihydrochlorid; 1000ng/ml, Abbott) 30 s gegengefärbt und dann nochmals 5 min mit 2xSSC gewaschen. DAPI ist ein Fluoreszenzfarbstoff, der unspezifisch an DNA bindet und für die Fluoreszenzmikroskopie blau färbt. Die Präparate wurden zum Schluss mit Vectashield®, welches ein Ausbleichen der Fluoreszenzfarbstoffe während der Fluoreszenzmikroskopie verhindert, eingedeckt.

2.5.4 FISH-Auswertung

Für jede Gewebeprobe auf dem Array wurde die Zahl der Gen (HER2, EGFR, Cyclin D1)- und Zentromer 17, 7, 11- Signale pro Tumorzellkern untersucht. Die Auswertung erfolgt mit einem Zeiss Fluoreszenzmikroskop (40x-100x- Objektiv), welches einen Doppelfilter zur gleichzeitigen Visualisierung der Spectrum Orange und Spectrum Green Signale (Vysis) besitzt. Die Anzahl der Gensignale in Relation zu den Zentromersignalen wurden, wenn möglich ausgezählt, bei Vorhandensein von Clustern geschätzt. Ein Überwiegen der Gen-spezifischen Sonde im Vergleich zur Zentromersonde bedeutet eine numerische Aberration in Form eines Zugewinnes bzw. Amplifikation des untersuchten genomischen Locus. Eine Ratio >1 und < 2 galt als Zugewinn. Als Kriterium für eine Amplifikation galt eine Gen/Zentromer Ratio ≥ 2 oder das Vorhandensein von Clustern.

2.6 Statistik

Für unsere Untersuchungen haben wir das Statistik-Programm JMP 8.0 (SAS Institute INC, NC, USA) verwendet. Die Beziehungen zwischen den verschiedenen pathologisch-anatomischen Parametern und den HER2, EGFR und Cyclin D1-Alterationen wurden mittels Kreuztabelle über Chi-quadrat-Tests (Likelihood) ausgewertet.

3. Ergebnisse

3.1 Technische Aspekte der FISH-Untersuchung

3.1.1. Auswertung der Prävalenz-TMAs

Insgesamt waren 203 (67,2%), 221 (73,2%) bzw. 251 (83,1%) Tumoren für HER2, EGFR bzw. Cyclin D1 auswertbar. Bei den übrigen Spots konnte aufgrund von fehlendem Gewebe/Tumorzellen oder schlechter Hybridisierung keine Aussage gemacht werden.

3.1.2 Auswertung der Heterogenitäts-TMAs

Insgesamt waren 80 (82,5%), 83 (85,6%) bzw. 87/97 (89,7%) Tumoren für HER2, EGFR bzw. Cyclin D1 auswertbar. Bei den übrigen Spots konnte aufgrund von fehlendem Gewebe/Tumorzellen oder schlechter Hybridisierung keine Aussage gemacht werden

3.2 Auswertung der Prävalenz der Genamplifikation

3.2.1 HER2

Insgesamt 8,4% (n=17) der Tumoren zeigten eine HER2-Amplifikation (Abb. 8). In höheren Tumorstadien könnten zwar vermehrt HER2-Amplifikationen nachgewiesen werden, dies erreichte jedoch keine statistische Signifikanz (p=0,2419). HER2-Amplifikation wurden jedoch ausschließlich in G3-Tumoren (p=0,0005) nachgewiesen.

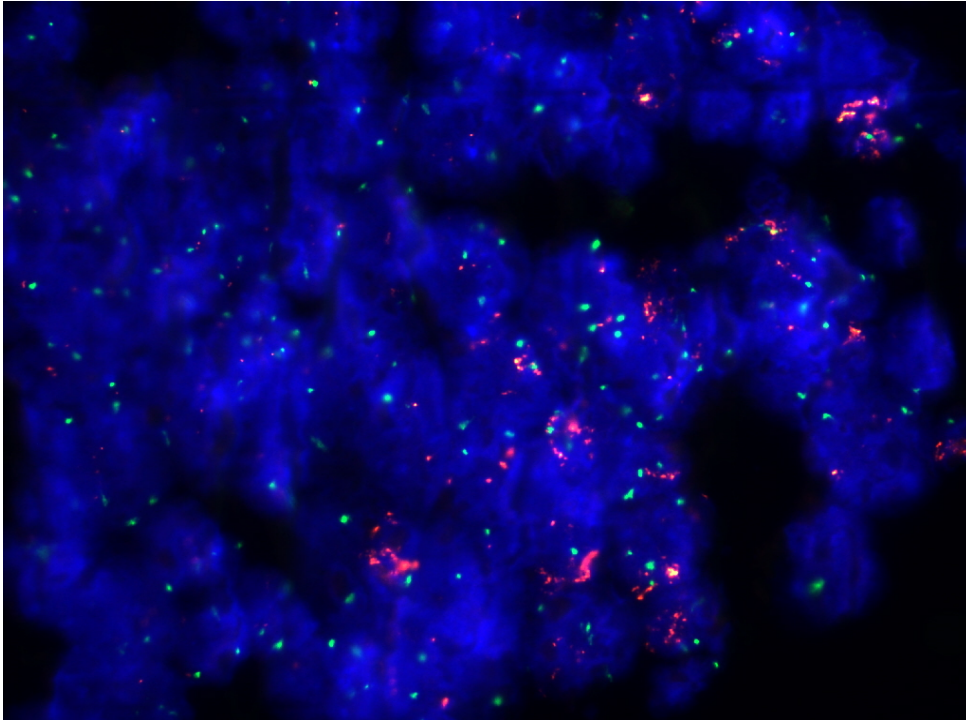


Abbildung 8: HER2 Amplifikation. Rotes Signal: HER2. Grünes Signal: Zentromersonde für Chromosom 17. DNA-Färbung durch DAPI (blau). Rote Signale weisen „Clusterbildung“ – Genamplifikation auf.

		HER 2 Amplifikation (n)	HER 2 Amplifikation (%)	p-Wert
auswertbar	n=203	17	8,4	
Tumorstadium	pT1	6	6,1	0,2419
	pT2 mind.	11	10,6	
Tumorgrad	G1	0	0	0,0005
	G2	0	0	
	G3	17	12,8	

Tabelle 2: Korrelation zwischen HER2-Amplifikation und pathologischen Parametern.

3.2.2 EGFR

Insgesamt 2,7% (n=6) der Tumoren zeigten eine EGFR-Amplifikation (Abb. 9). EGFR-Amplifikation konnten vermehrt in höheren Tumorstadien und in höhergradigen Tumoren nachgewiesen werden, wobei diese Korrelation nur für das Tumorstadium eine statistische Signifikanz erreichte (p=0,0042).

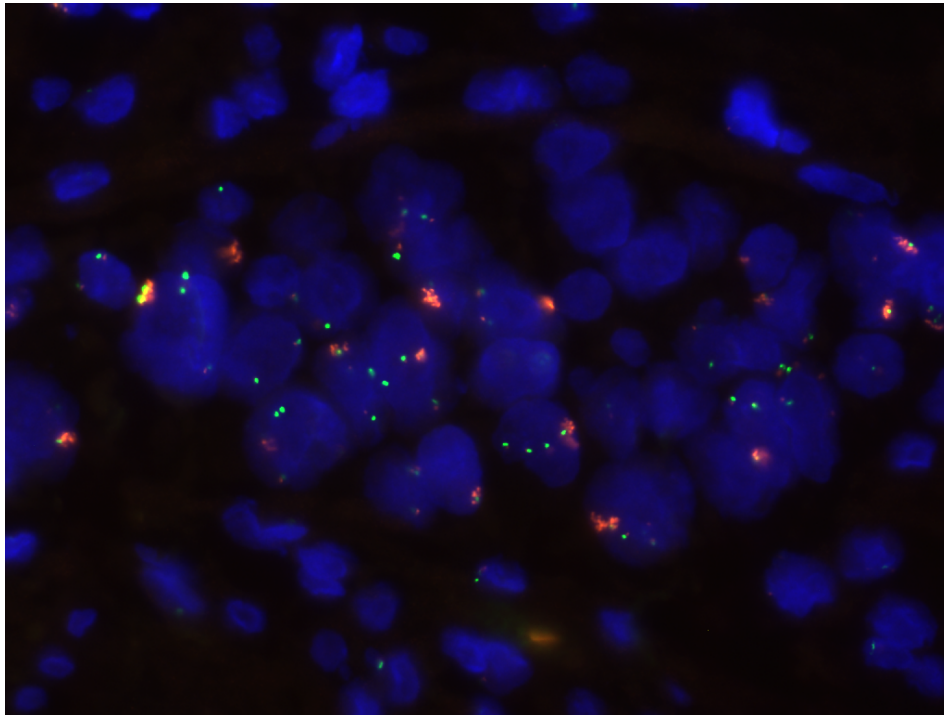


Abbildung 9: EGFR Amplifikation. Rotes Signal: EGFR. Grünes Signal: Zentromersonde für Chromosom 7. DNA-Färbung durch DAPI (blau). Rote Signale weisen „Clusterbildung“ – Genamplifikation auf.

		EGFR Amplifikation (n)	EGFR Amplifikation (%)	p-Wert
auswertbar	n=221	6	2,7	
Tumorstadium	pT1	0	0	0,0042
	pT2 mind.	6	5,3	
Tumorgrad	G1	0	0	0,5694
	G2	1	1,3	
	G3	5	3,5	

Tabelle 3: Korrelation zwischen EGFR-Amplifikation und pathologischen Parametern.

3.2.3 Cyclin D1

Insgesamt 17,1% (n=43) der Tumoren zeigten eine Cyclin D1-Amplifikation (Abb. 10).

Cyclin D1-Amplifikation konnten vermehrt in höheren Tumorstadien und in höhergradigen Tumoren nachgewiesen werden, wobei diese Korrelation keine statistische Signifikanz erreichten.

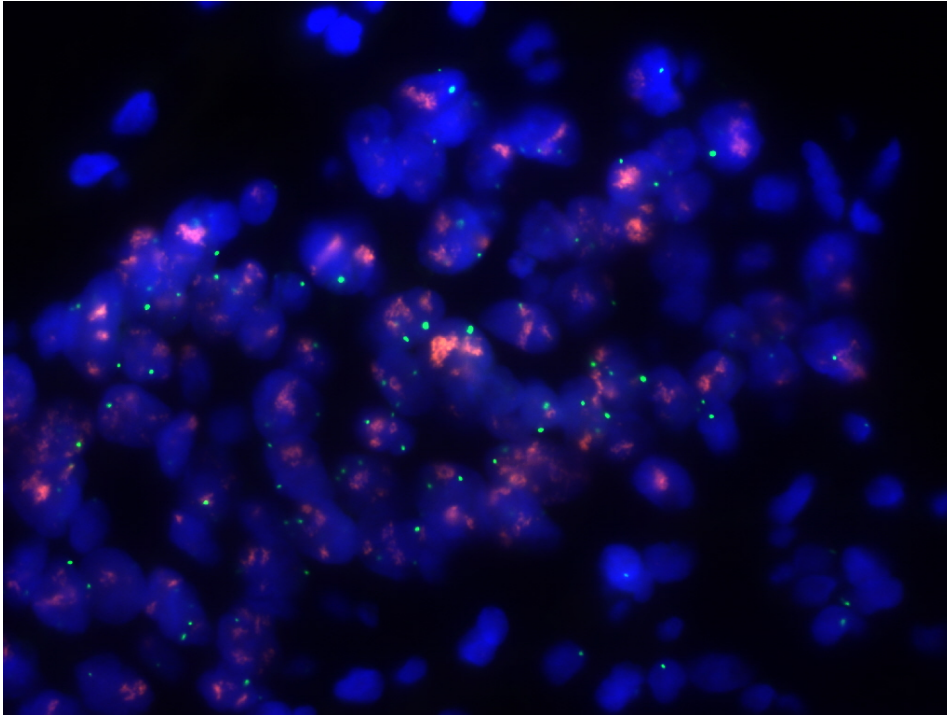


Abbildung 10: Cyclin D1 Amplifikation. Rotes Signal: Cyclin D1. Grünes Signal: Zentromersonde für Chromosom 11. DNA-Färbung durch DAPI (blau). Rote Signale weisen „Clusterbildung“ – Genamplifikation auf.

		Cyclin D1 Amplifikation (n)	Cyclin D1 Amplifikation (%)	p-Wert
auswertbar	n=251	43	17,1	
Tumorstadium	pT1	16	13,1	0,0987
	pT2 mind.	27	20,9	
Tumorgrad	G1	0	0	0,7011
	G2	13	15,3	
	G3	30	18,2	

Tabelle 4: Korrelation zwischen Cyclin D1-Amplifikation und pathologischen Parametern.

3.3 Auswertung der Heterogenitäts-TMAs

Ein Tumor wurde nur in die Heterogenitätsanalyse eingeschlossen, wenn mindestens 3 von 6 spots auswertbar waren.

3.3.1 HER2

Insgesamt waren bei 80 (82,5%) Tumoren mindestens 3 spots auswertbar. Davon wiesen 11 (13,8%) eine HER2-Amplifikation auf, die in 5 (45,5%) Fällen homogen und 6 (54,5%) heterogen ausfiel (Abbildung 11).

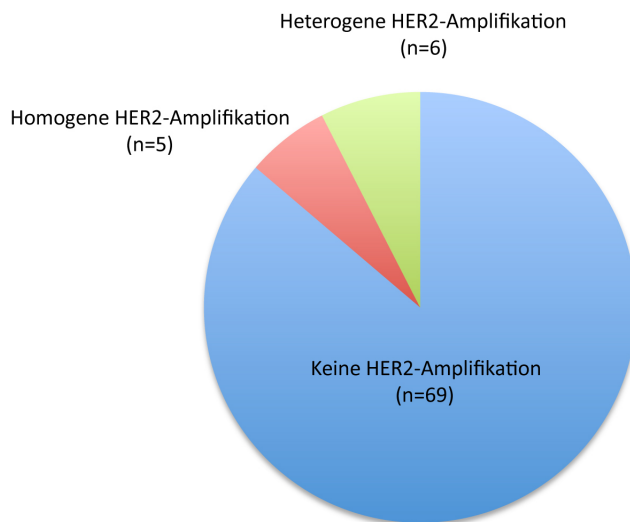


Abbildung 11: HER2-Heterogenität

3.3.2 EGFR

Insgesamt waren bei 83 (85,6%) Tumoren mindestens 3 spots auswertbar. Davon wiesen 2 (2,4%) eine EGFR-Amplifikation auf, die in einem Fall homogen und in einem Fall heterogen ausfiel (Abbildung 12).

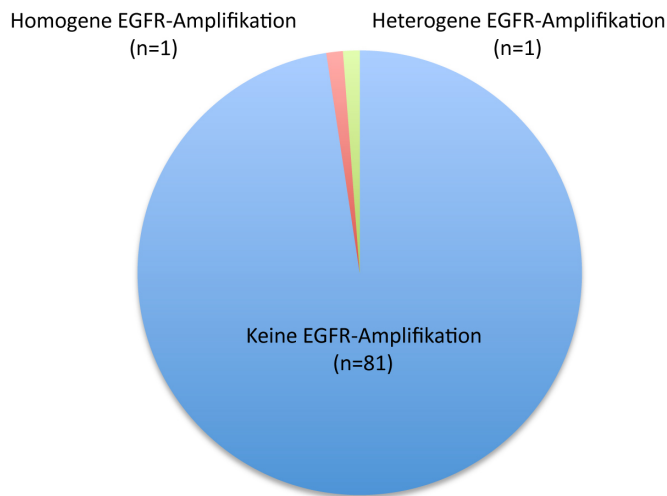


Abbildung 12: EGFR-Heterogenität

3.3.3 Cyclin D1

Insgesamt waren bei 87 (89,7%) Tumoren mindestens 3 spots auswertbar. Davon wiesen 23 (26,4%) eine Cyclin D1-Amplifikation auf, die in 15 (65,2%) Fällen homogen und in 8 (34,8%) Fällen heterogen ausfiel (Abbildung 13).

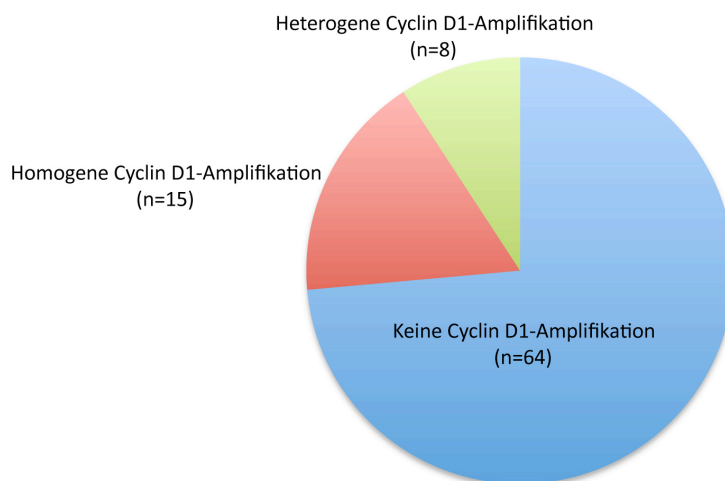


Abbildung 13: Cyclin D1-Heterogenität

4. Diskussion

Das invasive Harnblasenkarzinom gehört mit einer 5-Jahres-Überlebensrate von 40% zu den Tumoren mit einer besonders schlechten Prognose. Trotz zahlreicher Studien gibt es bislang keine vielversprechende neuartige Therapie, die die Prognose deutlich verbessert.

In dieser Studie wurde die TMA-Methode zur Untersuchung der Heterogenität von drei potentiellen therapeutischen Zielgenen (HER2, EGFR, Cyclin D1) beim Urothelkarzinom der Harnblase verwendet. Um Alterationen dieser Gene nachzuweisen, wurde die Fluoreszenz in-situ Hybridisierung (FISH) angewandt. Diese Methode erlaubt bei gleichzeitiger Hybridisierung mit einer Zentromersonde, die das Chromosom markiert auf dem das zu untersuchende Gen sich befindet, numerische Aberrationen zu erfassen. Da diese Methode das Gen spezifisch markiert und durch die gleichzeitige Markierung des Zentromers nicht nur eine Ploidie- sondern auch Positivkontrolle vorhanden ist, ist die Fehleranfälligkeit hier viel kleiner als bei der Immunhistochemie. Bei der Immunhistochemie spielen eine Vielzahl an Faktoren, wie Fixationszeit, Alter der Gewebeschnitte, Vorbehandlung etc., eine entscheidende Rolle (Mirlacher et al., 2004). Dies spiegelt sich auch in der Spannbreite der bereits publizierten Immunhistologie-Daten im Vergleich zu FISH-Daten wieder. Für HER2 liegen die Expressionsdaten, die mittels Immunhistologie erhoben worden beim Urothelkarzinom zwischen 40% und 75% (Gandour-Edwards et al., 2002, Kruger et al., 2002, Wulfing et al., 2005), die FISH-Daten liegen dagegen nur zwischen 5% und 16% (Tapia et al., 2007, Underwood et al., 1995, Lae et al., 2010). Dies lässt sich auch bei EGFR- und Cyclin D1-Daten beobachten. EGFR wird in 30-74% der Urothelkarzinome überexprimiert und in 3-5% der Fälle amplifiziert gefunden (Berger et al., 1987, Chow et al., 1993, Gorgoulis et al., 1995, Lipponen and Eskelinen, 1994, Nguyen et al., 1994, Sauter et al., 1994, Wright et al., 1991, Chaux et al., 2012). Cyclin D1 wird in 30-70%

der Fälle überexprimiert (Moonen et al., 2001, Suwa et al., 1998, Takagi et al., 2000, Wagner et al., 1999) und in 10-20% amplifiziert (Bringuier et al., 1996, Proctor et al., 1991, Sauter et al., 1993, Schraml et al., 1999) gefunden. Unsere Resultate liegen im Rahmen der bereits publizierten Daten. In unserer Studie wurden in beiden TMAs insgesamt bei 9,9% der Fälle einer HER2-Amplifikation, in 2,6% eine EGFR-Amplifikation und in 19,5% eine Cyclin D1-Amplifikation nachgewiesen.

Das TMA-Verfahren erlaubt die gleichzeitige Untersuchung von Hunderten von Gewebeproben auf einem einzigen Objektträger (Bubendorf et al., 2001). Das Verfahren hat aber den Nachteil, dass pro Tumor nur sehr geringe Gewebemengen untersucht werden (jeweils ein Gewebefragment mit einem Durchmesser von 0,6 mm). Aufgrund dieser Tatsache wird immer wieder in der Literatur diskutiert, ob zum einem TMAs geeignet sind für den Nachweis zwischen molekularen Veränderungen und Tumorphänotyp oder Prognose und ob diese Methode die Heterogenität des Tumors vernachlässigt.

Zahlreiche Studien mit großen Tumorkollektiven haben jedoch etablierte Zusammenhänge zwischen molekularen Parametern und klinischen bzw. pathologischen Parametern bestätigen können. Beim Mammakarzinom konnte beispielsweise die Beziehung zwischen Amplifikationen von HER2, Cyclin D1, Myc mit Tumorphänotyp oder Prognose (Al-Kuraya et al., 2004) bestätigt werden. Auch bei Nierenkarzinomen konnten Beziehungen zwischen Vimentin-Expression und Prognose (Moch et al., 1999), bei Harnblasenkarzinomen Beziehungen zwischen Tumorzellproliferation (Ki67-Labeling-Index), p53-Status und Differenzierungsgrad und Prognose am TMA bestätigt werden (Nocito et al., 2001, Moch et al., 1993).

Um die Heterogenität eines Tumors zu berücksichtigen wurde in verschiedenen Studien vorgeschlagen, dass nicht nur eine Stanze pro Tumorblock, sondern mehrere Stanzen pro Tumorblock entnommen werden (Rubin et al., 2002, Kristiansen et al., 2008).

Obwohl mehrere Stenzen pro Tumorblock die Konkordanz zwischen TMA-Resultat und dem korrespondierenden Grosschnitt erhöht (Rubin et al., 2002), wird dadurch die potentielle Heterogenität nur unzureichend dargestellt. In dieser Arbeit konnten wir feststellen, dass der prozentuale Anteil der Amplifikationen bei Untersuchung von mehreren Gewebeslots im Heterogenitäts-TMA höher war als im Prävalenz-TMA. HER2-Amplifikationen wurden in 8,4% der Fälle im Prävalenz-TMA und in 13,8% der Fälle im Heterogenitäts-TMA nachgewiesen. Cyclin D1-Amplifikationen wurden in 17,1% der Fälle im Prävalenz-TMA und in 26,4% der Fälle im Heterogenitäts-TMA gefunden. Bei EGFR-Amplifikationen, die ohnehin sehr selten sind, war kein Unterschied festzustellen. Der Prävalenz-TMA besteht jedoch im Gegensatz zum Heterogenitäts-TMA, bei dem nur Tumoren des Stadiums pT2-4 verwendet wurden, zur Hälfte aus Tumoren des Stadiums pT1 und zur anderen Hälfte aus Tumoren des Stadium pT2-4. Wenn man die pT2-4 Tumoren im Prävalenz-TMA getrennt analysiert ist der Unterschied nicht mehr so deutlich (HER2: 10,6%; Cyclin D1: 20,9%).

Im Institut für Pathologie des UKE wurde ein neue TMA-Plattform entwickelt, um die Heterogenität von molekularen Markern darzustellen und zu quantifizieren. Bei genauer Entnahmelokalisation kann damit auch zwischen intra- (innerhalb eines Tumorknotens) oder interfokaler Heterogenität (zwischen verschiedenen multifokalen Tumorknoten) eines molekularen Markers unterschieden werden. Das Ausmaß der Heterogenität erlaubt zum einen eine Aussage über den potentiell zu erwartenden Erfolg einer Gen-spezifischen Therapie („targeted therapy“) und kann zum anderen Aufschluss über den Entstehungszeitpunkt einer molekularen Veränderung geben. Ein geringer Heterogenitätsgrad spricht eher für ein frühes Ereignis und ein hoher Grad für ein späteres Ereignis. Im Gegensatz zum Prostatakarzinom, für den ebenfalls ein Heterogenitäts-TMA im Institut für Pathologie, UKE hergestellt wurde (Minner et al., 2013), ist beim Urothelkarzinom der Harnblase, eine dreidimensionale Zuordnung der

Tumorgewebestücke nicht möglich, da die Tumoren häufig mittels der transurethralen Resektion (TUR) in vielen kleinen Einzelstücken abgetragen wurden. Im Fall einer Zystektomie ist wiederum die vollständige Einbettung des Tumors im Gegensatz zum Prostatakarzinom für die Stadiumeinteilung nicht notwendig und wird somit nicht regelhaft durchgeführt. In dieser Studie wurde überwiegend TUR-Material verwendet und pro Fall aus jeweils 6 unterschiedlichen Gewebestücken eine Stanze entnommen, um eine potentielle Tumorheterogenität für einen molekularen Marker zu untersuchen.

Tumorheterogenität ist eine wichtige und potentielle Limitation für eine Gen-spezifische Therapie. Ein Patient, der für ein bestimmtes Zielgen „positiv“ getestet wurde, entwickelt möglicherweise eine Resistenz gegen die gezielte Therapie, wenn eine Subpopulation des Tumors, welche keine Alteration des Zielgens aufweist, durch die Therapie einen Selektionsvorteil erreicht. Trotz der Bedeutsamkeit von Tumorheterogenität ist die Anzahl der Heterogenitätsstudien von therapeutischen Zielgenen relativ klein. Studien über die Wirksamkeit von Tyrosinkinaseinhibitoren sind für das Harnblasenkarzinom relativ selten und meistens auf kleine Fallzahlen beschränkt. Es bestehen jedoch Anhaltspunkte, dass Anti-HER2- bzw. Anti-EGFR-Therapien zumindest in einigen Fällen beim Urothelkarzinom erfolgreich sein könnten (Peyromaure et al., 2005, Baselga et al., 2000). Trastuzumab, ein monoklonaler Anti-HER2-Antikörper ist bei HER 2-positiven Mammakarzinomen (Dahabreh et al., 2008) (Slamon et al., 2001) (Bang et al., 2010) und bei HER 2-positiven Magenkarzinomen heute das Therapeutikum der Wahl. Urothelkarzinome gehören neben den Mammakarzinomen zu den am häufigsten HER 2-amplifizierten malignen Tumoren. Klinische Studien zur Anwendung von Trastuzumab beim Harnblasenkarzinom haben zwar in Kombination mit anderen Chemotherapeutika in einzelnen Phase 2-Studien erfolgversprechende Ergebnisse gezeigt (Hussain et al., 2007), insgesamt sind die Resultate jedoch eher enttäuschend, so dass Trastuzumab bislang noch nicht in Phase 3-

Studien untersucht wurde. Einer der Gründe für die enttäuschenden Resultate könnte die Heterogenität von HER2-Amplifikationen darstellen. In unserer Studie wiesen 9,9% der Urothelkarzinome eine HER2-Amplifikation auf. HER2-Amplifikationen wurden vermehrt, jedoch statistisch nicht signifikant in höheren Tumorstadien ($p=0,2419$) und ausschließlich in G3-Tumoren ($p=0,0005$) gefunden. Nur in knapp der Hälfte der Fälle erwies sich die HER2-Amplifikation als homogen, das heißt, dass eine Amplifikation in allen untersuchten Gewebeproben nachweisbar war. In einer großen Studie von Lae et al. wurden insgesamt 1005 Urothelkarzinome mittels Immunhistologie und FISH untersucht. Dabei wurde in 5,1% der Tumoren eine HER2 Amplifikation gefunden, wobei in 35% der Fälle sowohl mittels Immunhistologie als auch mit FISH eine Heterogenität nachgewiesen wurde. Untersuchungen beim Mamma- und Magenkarzinom zeigen im Gegensatz dazu eine hohe Homogenität von HER2-Amplifikationen innerhalb eines Tumors (Marx et al., 2009, Simon et al., 2001). Eine weitere Ursache für das Versagen der Trastuzumab-Therapie dürfte die Patientenselektion darstellen, die in einer Vielzahl der Studien immunhistochemisch und nicht mittels Amplifikationsnachweis erfolgte, obwohl das Vorliegen einer HER 2-Genamplifikation der beste prädiktive Faktor für eine Trastuzumab-Wirksamkeit ist (Sauter et al., 2009). Da eine HER 2-Überexpression in 40-75% der Urothelkarzinome beschrieben wird (Gandour-Edwards et al., 2002, Kruger et al., 2002, Wulfing et al., 2005) ist davon auszugehen, dass in mehreren Therapiestudien auch nicht HER 2-amplifizierte Tumoren zur Behandlung gelangten. Es ist zudem bekannt, dass unterschiedliche Fixierung, insbesondere die Ethanolfixierung und unterschiedliche Proteindemaskierungen zu falsch-positiven immunhistologischen Ergebnissen führen können (Sauter et al., 2009).

Eine EGFR-Amplifikation konnten wir nur in 8 von 304 Tumoren detektieren. EGFR-Amplifikationen wurden ausschließlich in Tumoren des Stadiums pT2-4 ($p=0,0042$) und

vermehrt, jedoch statistisch nicht signifikant, in Tumoren mit einem höheren Grad gefunden ($p=0,5694$). Nur in einem von 2 Fällen auf dem Heterogenitäts-TMA war die Amplifikation homogen nachweisbar. Im Institut für Pathologie des UKE konnte beim Bronchialkarzinom mittels eines Heterogenitäts-TMA mit insgesamt 144 Tumoren in der Hälfte der Fälle ebenfalls eine intratumorale EGFR-Heterogenität detektiert werden (Grob et al., 2013). Studien bezüglich EGFR-Inhibition beim Harnblasenkarzinom wurden fast ausschließlich an Zelllinien durchgeführt. Dabei konnte jedoch in einigen dieser Studien gezeigt werden, dass die Zellproliferation durch Gefitinib (ein EGFR-Inhibitor) blockiert wird (Dominguez-Escrig et al., 2004, Shrader et al., 2007). Die molekularen Voraussetzungen für eine erfolgreiche Anti-EGFR-Therapie beim Harnblasenkarzinom sind somit zumindest teilweise gegeben, wobei Ergebnisse aktueller klinischer Studien noch ausstehen (zusammengefasst in (Vishnu et al., 2011)). Beim Bronchialkarzinom ist insbesondere eine EGFR-Mutation mit einem Ansprechen auf Anti-EGFR-Inhibitoren assoziiert. Derartige EGFR-Mutationen insbesondere in Exon 19 und 21 wurden im Harnblasenkarzinom bislang nicht gefunden (Chaux et al., 2012, Blehm et al., 2006).

Cyclin D1-Amplifikationen konnte in insgesamt 19,5% der Tumoren nachgewiesen werden. Ein gehäuftes Auftreten konnte mit höheren Tumorstadium ($p=0,0987$) und Tumorgrad ($p=0,7011$) beobachtet werden konnte, wobei diese Korrelationen keine statistische Signifikanz erreichten. 65,2% der Cyclin D1-Amplifikationen fielen homogen aus. Die höhere Homogenität von Cyclin D1 im Vergleich zu HER2 und EGFR könnte dafür sprechen, dass Cyclin D1-Alterationen ein frühes Geschehen in der Tumorgenese des Harnblasenkarzinoms sind. In einer Studie zu Cyclin-D1 Amplifikationen beim Mammakarzinom wurde in allen Fällen ($n=8$) eine intratumorale Heterogenität detektiert (Glockner et al., 2002). Cyclin D1 spielt nicht nur als potentiell Therapieziel eine wichtige Rolle (Fry et al., 2001, Kim et al., 2011),

sondern wird zusammen mit anderen Zellzyklusproteinen im Rahmen einer potentieller Resistenzentwicklung gegen Trastuzumab (Anti-HER2-Therapie) diskutiert (Nahta and Esteva, 2006). Trastuzumab therapierte Zellen werden in der G1-Phase gehemmt mit der Folge einer Reduktion der Zellproliferation. Diese Zellzyklusblockade wird durch eine reduzierte Expression verschiedener Proteine, einschließlich Cyclin D1 begleitet (Lane et al., 2000).

Das Harnblasenkarzinom ist ein genetisch instabiler Tumor, der eine Vielzahl von Genveränderungen aufweist. Auch in unserer Studie konnten wir zeigen, dass zwei der untersuchten Gene, HER2 und Cyclin D1, auch im Vergleich zu anderen Tumoren häufig amplifiziert sind (Tapia et al., 2007, Donnellan and Chetty, 1998). Obwohl wir mit unserem Heterogenitäts-TMA insgesamt nur einen kleinen Teil des Tumors untersucht haben (mindestens 3 spots mit 0,6mm Durchmesser), konnten wir bei ca. der Hälfte aller Fälle für die drei untersuchten Zielgene eine Heterogenität aufweisen. Das Ergebnis zeigt, dass Heterogenität von HER2, EGFR und Cyclin D1 keine Ausnahme, sondern eher die Regel darstellt und impliziert, dass vor einer potentiellen Therapie mehrere Anteile des Tumors untersucht werden sollten, um ein Therapieversagen zu vermeiden.

5. Zusammenfassung

HER2, EGFR und Cyclin D1 sind potentielle Ziele in der Therapie des Harnblasenkarzinoms. Eine wichtige Voraussetzung an ein solches Therapieziel ist, dass die genetische Veränderung im gesamten Tumor homogen vorhanden ist, andernfalls würde nur ein Subklon des Tumors therapiert werden. In dieser Arbeit wurden Prävalenz und Heterogenität von HER2-, EGFR- und Cyclin D1-Amplifikationen mittels der Fluoreszenz in-situ Hybridisierung an insgesamt 302 Urothelkarzinomen der Harnblase mit zwei unterschiedlichen Gewebemicroarray (TMA), einem Prävalenz-TMA und einem Heterogenitäts-TMA untersucht. HER2-Amplifikationen wurden in 9,9%, EGFR-Amplifikationen in 2,6% und Cyclin D1-Amplifikationen in 19,5% der Tumoren gefunden. Ein gehäuftes Auftreten von HER2-, EGFR- und Cyclin D1-Amplifikationen wurden in Tumoren mit höheren Tumorstadium und Tumorgrad gefunden, wobei diese Korrelation sich nicht immer als statistisch signifikant erwies. Für alle drei Gene wurde ein hohes Maß an Heterogenität festgestellt - HER2: 54,5%, EGFR: 50% und Cyclin D1: 34,8%. Das Ergebnis zeigt, dass Heterogenität von HER2, EGFR und Cyclin D1 keine Ausnahme, sondern eher die Regel darstellt. Dies könnte möglicherweise einer der Ursachen für die eher enttäuschenden Resultate klinischer Studien mit Anti-HER2-Medikamenten (Trastuzumab) darstellen. Vor einer potentiellen Gen-spezifischen Therapie gegen HER2, EGFR und Cyclin D1 beim Urothelkarzinom sollte demzufolge mehrere Anteile des Tumors untersucht werden, um ein Therapieversagen zu vermeiden.

6. Abkürzungsverzeichnis

ATP:	Adenosintriphosphat
BCG:	Bacillus Calmette-Guérin
CCND1:	Cyclin D1
CDK:	Cyclin-abhängige Kinase
COX:	Cyclooxygenase
CT:	Computertomographie
DAPI:	4',6'-Diaminodino-2-Phenylindole
DGU:	Deutsche Gesellschaft für Urologie
DNA:	Desoxyribonukleinsäure
EGFR:	epidermal growth factor receptor
FGFR3:	fibroblast growth factor receptor 3
FISH:	Fluoreszenz in-situ Hybridisierung
HE:	Hämatoxylin-Eosin
HER 2:	human epidermal growth factor receptor 2
M-VAC:	Methotrexat, Vinblastin, Doxorubicin (=Adriamycin), Cisplatin
min:	Minute
MRT:	Magnetresonanztomographie
pRb:	Retinoblastom-Tumor-Suppressor-Protein
Rb:	Retinoblastom
RTK:	Rezeptortyrosinkinase
SSC:	Saline-sodium citrate buffer
TMA:	tissue microarray
TNM:	Tumor, Nodes, Metastases
TP53:	tumor protein 53
TUR-B:	Transurethrale Elektroresektion der Blase
WHO:	World Health Organization

7. Literaturverzeichnis

- AL-KURAYA, K., SCHRAML, P., TORHORST, J., TAPIA, C., ZAHARIEVA, B., NOVOTNY, H., SPICHTIN, H., MAURER, R., MIRLACHER, M., KOCHLI, O., ZUBER, M., DIETERICH, H., MROSS, F., WILBER, K., SIMON, R. & SAUTER, G. (2004) Prognostic relevance of gene amplifications and coamplifications in breast cancer. *Cancer Res*, 64, 8534-40.
- ARNOLD, A. & PAPANIKOLAOU, A. (2005) Cyclin D1 in breast cancer pathogenesis. *J Clin Oncol*, 23, 4215-24.
- BANG, Y. J., VAN CUTSEM, E., FEYEREISLOVA, A., CHUNG, H. C., SHEN, L., SAWAKI, A., LORDICK, F., OHTSU, A., OMURO, Y., SATOH, T., APRILE, G., KULIKOV, E., HILL, J., LEHLE, M., RUSCHOFF, J. & KANG, Y. K. (2010) Trastuzumab in combination with chemotherapy versus chemotherapy alone for treatment of HER2-positive advanced gastric or gastro-oesophageal junction cancer (ToGA): a phase 3, open-label, randomised controlled trial. *Lancet*, 376, 687-97.
- BASELGA, J., PFISTER, D., COOPER, M. R., COHEN, R., BURTNES, B., BOS, M., D'ANDREA, G., SEIDMAN, A., NORTON, L., GUNNETT, K., FALCEY, J., ANDERSON, V., WAKSAL, H. & MENDELSON, J. (2000) Phase I studies of anti-epidermal growth factor receptor chimeric antibody C225 alone and in combination with cisplatin. *J Clin Oncol*, 18, 904-14.
- BERGER, M. S., GREENFIELD, C., GULLICK, W. J., HALEY, J., DOWNWARD, J., NEAL, D. E., HARRIS, A. L. & WATERFIELD, M. D. (1987) Evaluation of epidermal growth factor receptors in bladder tumours. *Br J Cancer*, 56, 533-7.
- BERTONI, F., RINALDI, A., ZUCCA, E. & CAVALLI, F. (2006) Update on the molecular biology of mantle cell lymphoma. *Hematol Oncol*, 24, 22-7.
- BILLEREY, C., CHOPIN, D., AUBRIOT-LORTON, M. H., RICOL, D., GIL DIEZ DE MEDINA, S., VAN RHIJN, B., BRALET, M. P., LEFRERE-BELDA, M. A., LAHAYE, J. B., ABBOU, C. C., BONAVENTURE, J., ZAFRANI, E. S., VAN DER KWAST, T., THIERY, J. P. & RADVANYI, F. (2001) Frequent FGFR3 mutations in papillary non-invasive bladder (pTa) tumors. *Am J Pathol*, 158, 1955-9.
- BLEHM, K. N., SPIESS, P. E., BONDARUK, J. E., DUJKA, M. E., VILLARES, G. J., ZHAO, Y. J., BOGLER, O., ALDAPE, K. D., GROSSMAN, H. B., ADAM, L., MCCONKEY, D. J., CZERNIAK, B. A., DINNEY, C. P. & BAR-ELI, M. (2006) Mutations within the kinase domain and truncations of the epidermal growth factor receptor are rare events in bladder cancer: implications for therapy. *Clin Cancer Res*, 12, 4671-7.
- BLUME-JENSEN, P. & HUNTER, T. (2001) Oncogenic kinase signalling. *Nature*, 411, 355-65.
- BOCHNER, B. H., COTE, R. J., WEIDNER, N., GROSHEN, S., CHEN, S. C., SKINNER, D. G. & NICHOLS, P. W. (1995) Angiogenesis in bladder cancer: relationship between microvessel density and tumor prognosis. *J Natl Cancer Inst*, 87, 1603-12.
- BRENNAN, P., BOGILLOT, O., CORDIER, S., GREISER, E., SCHILL, W., VINEIS, P., LOPEZ-ABENTE, G., TZONOU, A., CHANG-CLAUDE, J., BOLM-AUDORFF, U., JOCKEL, K. H., DONATO, F., SERRA, C., WAHRENDORF, J., HOURS, M., T'MANNETJE, A., KOGEVINAS, M. & BOFFETTA, P. (2000) Cigarette smoking and bladder cancer in men: a pooled analysis of 11 case-control studies. *Int J Cancer*, 86, 289-94.

- BRINGUIER, P. P., TAMIMI, Y., SCHUURING, E. & SCHALKEN, J. (1996) Expression of cyclin D1 and EMS1 in bladder tumours; relationship with chromosome 11q13 amplification. *Oncogene*, 12, 1747-53.
- BUBENDORF, L., NOCITO, A., MOCH, H. & SAUTER, G. (2001) Tissue microarray (TMA) technology: miniaturized pathology archives for high-throughput in situ studies. *J Pathol*, 195, 72-9.
- CANTOR, K. P., LYNCH, C. F., HILDESHEIM, M. E., DOSEMEDI, M., LUBIN, J., ALAVANJA, M. & CRAUN, G. (1998) Drinking water source and chlorination byproducts. I. Risk of bladder cancer. *Epidemiology*, 9, 21-8.
- CASTELAO, J. E., YUAN, J. M., SKIPPER, P. L., TANNENBAUM, S. R., GAGODOMINGUEZ, M., CROWDER, J. S., ROSS, R. K. & YU, M. C. (2001) Gender- and smoking-related bladder cancer risk. *J Natl Cancer Inst*, 93, 538-45.
- CHAUX, A., COHEN, J. S., SCHULTZ, L., ALBADINE, R., JADALLAH, S., MURPHY, K. M., SHARMA, R., SCHOENBERG, M. P. & NETTO, G. J. (2012) High epidermal growth factor receptor immunohistochemical expression in urothelial carcinoma of the bladder is not associated with EGFR mutations in exons 19 and 21: a study using formalin-fixed, paraffin-embedded archival tissues. *Hum Pathol*, 43, 1590-5.
- CHOW, N. H., CHAN, S. H., TZAI, T. S., HO, C. L. & LIU, H. S. (2001) Expression profiles of ErbB family receptors and prognosis in primary transitional cell carcinoma of the urinary bladder. *Clin Cancer Res*, 7, 1957-62.
- CHOW, N. H., TZAI, T. S., LIN, S. N., CHAN, S. H. & TANG, M. J. (1993) Reappraisal of the biological role of epidermal growth factor receptor in transitional cell carcinoma. *Eur Urol*, 24, 140-3.
- CLAYSON, D. B. (1981) Specific aromatic amines as occupational bladder carcinogens. *Natl Cancer Inst Monogr*, 15-9.
- COLLER, H. A. (2007) What's taking so long? S-phase entry from quiescence versus proliferation. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 8, 667-70.
- CORDON-CARDO, C., DALBAGNI, G., SAEZ, G. T., OLIVA, M. R., ZHANG, Z. F., ROSAI, J., REUTER, V. E. & PELLICER, A. (1994) p53 mutations in human bladder cancer: genotypic versus phenotypic patterns. *Int J Cancer*, 56, 347-53.
- CORDON-CARDO, C., WARTINGER, D., PETRYLAK, D., DALBAGNI, G., FAIR, W. R., FUKS, Z. & REUTER, V. E. (1992) Altered expression of the retinoblastoma gene product: prognostic indicator in bladder cancer. *J Natl Cancer Inst*, 84, 1251-6.
- COTE, R. J., DUNN, M. D., CHATTERJEE, S. J., STEIN, J. P., SHI, S. R., TRAN, Q. C., HU, S. X., XU, H. J., GROSHEN, S., TAYLOR, C. R., SKINNER, D. G. & BENEDICT, W. F. (1998) Elevated and absent pRb expression is associated with bladder cancer progression and has cooperative effects with p53. *Cancer Res*, 58, 1090-4.
- DAHABREH, I. J., LINARDOU, H., SIANNIS, F., FOUNTZILAS, G. & MURRAY, S. (2008) Trastuzumab in the adjuvant treatment of early-stage breast cancer: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Oncologist*, 13, 620-30.
- DIETRICH, H. & DIETRICH, B. (2001) Ludwig Rehn (1849-1930)--pioneering findings on the aetiology of bladder tumours. *World J Urol*, 19, 151-3.
- DM PARKIN, S. W., J FERLAY, L TEPPPO, DB THOMAS (2003) *Cancer Incidence in Five Continents*, Lyon, IARC Press.
- DOMINGUEZ-ESCRIG, J. L., KELLY, J. D., NEAL, D. E., KING, S. M. & DAVIES, B. R. (2004) Evaluation of the therapeutic potential of the epidermal growth

- factor receptor tyrosine kinase inhibitor gefitinib in preclinical models of bladder cancer. *Clin Cancer Res*, 10, 4874-84.
- DONNELLAN, R. & CHETTY, R. (1998) Cyclin D1 and human neoplasia. *Mol Pathol*, 51, 1-7.
- ESRIG, D., ELMAJIAN, D., GROSHEN, S., FREEMAN, J. A., STEIN, J. P., CHEN, S. C., NICHOLS, P. W., SKINNER, D. G., JONES, P. A. & COTE, R. J. (1994) Accumulation of nuclear p53 and tumor progression in bladder cancer. *N Engl J Med*, 331, 1259-64.
- EWEN, M. E. & LAMB, J. (2004) The activities of cyclin D1 that drive tumorigenesis. *Trends Mol Med*, 10, 158-62.
- FALKE, J. & WITJES, J. A. (2011) Contemporary management of low-risk bladder cancer. *Nat Rev Urol*, 8, 42-9.
- FLESHNER, N., KAPUSTA, L., EZER, D., HERSCHORN, S. & KLOTZ, L. (2000) p53 nuclear accumulation is not associated with decreased disease-free survival in patients with node positive transitional cell carcinoma of the bladder. *J Urol*, 164, 1177-82.
- FRY, D. W., BEDFORD, D. C., HARVEY, P. H., FRITSCH, A., KELLER, P. R., WU, Z., DOBRUSIN, E., LEOPOLD, W. R., FATTAEY, A. & GARRETT, M. D. (2001) Cell cycle and biochemical effects of PD 0183812. A potent inhibitor of the cyclin D-dependent kinases CDK4 and CDK6. *J Biol Chem*, 276, 16617-23.
- GANDOUR-EDWARDS, R., LARA, P. N., JR., FOLKINS, A. K., LASALLE, J. M., BECKETT, L., LI, Y., MEYERS, F. J. & DEVERE-WHITE, R. (2002) Does HER2/neu expression provide prognostic information in patients with advanced urothelial carcinoma? *Cancer*, 95, 1009-15.
- GAUTSCHI, O., RATSCHILLER, D., GUGGER, M., BETTICHER, D. C. & HEIGHWAY, J. (2007) Cyclin D1 in non-small cell lung cancer: a key driver of malignant transformation. *Lung Cancer*, 55, 1-14.
- GLOCKNER, S., BUURMAN, H., KLEEBERGER, W., LEHMANN, U. & KREIPE, H. (2002) Marked intratumoral heterogeneity of c-myc and cyclinD1 but not of c-erbB2 amplification in breast cancer. *Lab Invest*, 82, 1419-26.
- GORGOLIS, V. G., BARBATIS, C., POULIAS, I. & KARAMERIS, A. M. (1995) Molecular and immunohistochemical evaluation of epidermal growth factor receptor and c-erb-B-2 gene product in transitional cell carcinomas of the urinary bladder: a study in Greek patients. *Mod Pathol*, 8, 758-64.
- GRIGNON, D. (1997) *Neoplasms of the urinary bladder.*, St. Louis, Mosby-Year-Book.
- GROB, T. J., HOENIG, T., CLAUDITZ, T. S., ATANACKOVIC, D., KOENIG, A. M., VASHIST, Y. K., KLOSE, H., SIMON, R., PANTEL, K., IZBICKI, J. R., BOKEMEYER, C., SAUTER, G. & WILCZAK, W. (2013) Frequent intratumoral heterogeneity of EGFR gene copy gain in non-small cell lung cancer. *Lung Cancer*, 79, 221-7.
- GROSSMAN, H. B., LIEBERT, M., ANTELO, M., DINNEY, C. P., HU, S. X., PALMER, J. L. & BENEDICT, W. F. (1998) p53 and RB expression predict progression in T1 bladder cancer. *Clin Cancer Res*, 4, 829-34.
- HALEBLIAN, G. E., SKINNER, E. C., DICKINSON, M. G., LIESKOVSKY, G., BOYD, S. D. & SKINNER, D. G. (1998) Hydronephrosis as a prognostic indicator in bladder cancer patients. *J Urol*, 160, 2011-4.
- HOPENHAYN-RICH, C., BIGGS, M. L., FUCHS, A., BERGOGLIO, R., TELLO, E. E., NICOLLI, H. & SMITH, A. H. (1996) Bladder cancer mortality associated with arsenic in drinking water in Argentina. *Epidemiology*, 7, 117-24.
- HUSSAIN, M. H., MACVICAR, G. R., PETRYLAK, D. P., DUNN, R. L., VAISHAMPAYAN, U., LARA, P. N., JR., CHATTA, G. S., NANUS, D. M.,

- GLODE, L. M., TRUMP, D. L., CHEN, H. & SMITH, D. C. (2007) Trastuzumab, paclitaxel, carboplatin, and gemcitabine in advanced human epidermal growth factor receptor-2/neu-positive urothelial carcinoma: results of a multicenter phase II National Cancer Institute trial. *J Clin Oncol*, 25, 2218-24.
- JAHNSON, S., RISBERG, B., KARLSSON, M. G., WESTMAN, G., BERGSTROM, R. & PEDERSEN, J. (1995) p53 and Rb immunostaining in locally advanced bladder cancer: relation to prognostic variables and predictive value for the local response to radical radiotherapy. *Eur Urol*, 28, 135-42.
- JIMENEZ, R. E., GHEILER, E., OSKANIAN, P., TIGUERT, R., SAKR, W., WOOD, D. P., JR., PONTES, J. E. & GRIGNON, D. J. (2000) Grading the invasive component of urothelial carcinoma of the bladder and its relationship with progression-free survival. *Am J Surg Pathol*, 24, 980-7.
- JN EBLE, G. S., JL EPSTEIN, IA SESTERHENN (2004) *Tumors of the urinary system and male genital tract.*, Lyon, IARC Press.
- JOHANSSON, S. L., BORGHED, G. & HOLMANG, S. (1999) Micropapillary bladder carcinoma: a clinicopathological study of 20 cases. *J Urol*, 161, 1798-802.
- KIM, E. S., LEE, J. J. & WISTUBA, II (2011) Cotargeting cyclin D1 starts a new chapter in lung cancer prevention and therapy. *Cancer Prev Res (Phila)*, 4, 779-82.
- KIM, S. I., KWON, S. M., KIM, Y. S. & HONG, S. J. (2002) Association of cyclooxygenase-2 expression with prognosis of stage T1 grade 3 bladder cancer. *Urology*, 60, 816-21.
- KRISTIANSEN, G., FRITZSCHE, F. R., WASSERMANN, K., JAGER, C., TOLLS, A., LEIN, M., STEPHAN, C., JUNG, K., PILARSKY, C., DIETEL, M. & MOCH, H. (2008) GOLPH2 protein expression as a novel tissue biomarker for prostate cancer: implications for tissue-based diagnostics. *Br J Cancer*, 99, 939-48.
- KRUGER, S., WEITSCH, G., BUTTNER, H., MATTHIENSEN, A., BOHMER, T., MARQUARDT, T., SAYK, F., FELLER, A. C. & BOHLE, A. (2002) HER2 overexpression in muscle-invasive urothelial carcinoma of the bladder: prognostic implications. *Int J Cancer*, 102, 514-8.
- LA THANGUE, N. B. & KERR, D. J. (2011) Predictive biomarkers: a paradigm shift towards personalized cancer medicine. *Nat Rev Clin Oncol*, 8, 587-96.
- LAE, M., COUTURIER, J., OUDARD, S., RADVANYI, F., BEUZEBOC, P. & VIEILLEFOND, A. (2010) Assessing HER2 gene amplification as a potential target for therapy in invasive urothelial bladder cancer with a standardized methodology: results in 1005 patients. *Ann Oncol*, 21, 815-9.
- LANE, H. A., BEUVINK, I., MOTOYAMA, A. B., DALY, J. M., NEVE, R. M. & HYNES, N. E. (2000) ErbB2 potentiates breast tumor proliferation through modulation of p27(Kip1)-Cdk2 complex formation: receptor overexpression does not determine growth dependency. *Mol Cell Biol*, 20, 3210-23.
- LAPHAM, R. L., GRIGNON, D. & RO, J. Y. (1997) Pathologic prognostic parameters in bladder urothelial biopsy, transurethral resection, and cystectomy specimens. *Semin Diagn Pathol*, 14, 109-22.
- LI, W., SANKI, A., KARIM, R. Z., THOMPSON, J. F., SOON LEE, C., ZHUANG, L., MCCARTHY, S. W. & SCOLYER, R. A. (2006) The role of cell cycle regulatory proteins in the pathogenesis of melanoma. *Pathology*, 38, 287-301.
- LIANES, P., CHARYTONOWICZ, E., CORDON-CARDO, C., FRADET, Y., GROSSMAN, H. B., HEMSTREET, G. P., WALDMAN, F. M., CHEW, K., WHEELLESS, L. L. & FARAGGI, D. (1998) Biomarker study of primary

- nonmetastatic versus metastatic invasive bladder cancer. National Cancer Institute Bladder Tumor Marker Network. *Clin Cancer Res*, 4, 1267-71.
- LIPPONEN, P. (1993) Expression of c-erbB-2 oncoprotein in transitional cell bladder cancer. *Eur J Cancer*, 29A, 749-53.
- LIPPONEN, P. & ESKELINEN, M. (1994) Expression of epidermal growth factor receptor in bladder cancer as related to established prognostic factors, oncoprotein (c-erbB-2, p53) expression and long-term prognosis. *Br J Cancer*, 69, 1120-5.
- LIUKKONEN, T., LIPPONEN, P., RAITANEN, M., KAASINEN, E., ALA-OPAS, M., RAJALA, P. & KOSMA, V. M. (2000) Evaluation of p21WAF1/CIP1 and cyclin D1 expression in the progression of superficial bladder cancer. Finbladder Group. *Urol Res*, 28, 285-92.
- LONN, U., LONN, S., FRIBERG, S., NILSSON, B., SILFVERSWARD, C. & STENKVIST, B. (1995) Prognostic value of amplification of c-erb-B2 in bladder carcinoma. *Clin Cancer Res*, 1, 1189-94.
- LOPEZ-BELTRAN, A., PACELLI, A., ROTHENBERG, H. J., WOLLAN, P. C., ZINCKE, H., BLUTE, M. L. & BOSTWICK, D. G. (1998) Carcinosarcoma and sarcomatoid carcinoma of the bladder: clinicopathological study of 41 cases. *J Urol*, 159, 1497-503.
- MARX, A. H., THARUN, L., MUTH, J., DANCAU, A. M., SIMON, R., YEKEBAS, E., KAIFI, J. T., MIRLACHER, M., BRUMMENDORF, T. H., BOKEMEYER, C., IZBICKI, J. R. & SAUTER, G. (2009) HER-2 amplification is highly homogenous in gastric cancer. *Hum Pathol*, 40, 769-77.
- MELLON, K., WRIGHT, C., KELLY, P., HORNE, C. H. & NEAL, D. E. (1995) Long-term outcome related to epidermal growth factor receptor status in bladder cancer. *J Urol*, 153, 919-25.
- MESSING, E. M. (1990) Clinical implications of the expression of epidermal growth factor receptors in human transitional cell carcinoma. *Cancer Res*, 50, 2530-7.
- MINNER, S., GARTNER, M., FREUDENTHALER, F., BAUER, M., KLUTH, M., SALOMON, G., HEINZER, H., GRAEFEN, M., BOKEMEYER, C., SIMON, R., SAUTER, G., SCHLOMM, T. & WILCZAK, W. (2013) Marked heterogeneity of ERG expression in large primary prostate cancers. *Mod Pathol*, 26, 106-16.
- MIRLACHER, M., KASPER, M., STORZ, M., KNECHT, Y., DURMULLER, U., SIMON, R., MIHATSCH, M. J. & SAUTER, G. (2004) Influence of slide aging on results of translational research studies using immunohistochemistry. *Mod Pathol*, 17, 1414-20.
- MOCH, H., SAUTER, G., MOORE, D., MIHATSCH, M. J., GUDAT, F. & WALDMAN, F. (1993) p53 and erbB-2 protein overexpression are associated with early invasion and metastasis in bladder cancer. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol*, 423, 329-34.
- MOCH, H., SCHRAML, P., BUBENDORF, L., MIRLACHER, M., KONONEN, J., GASSER, T., MIHATSCH, M. J., KALLIONIEMI, O. P. & SAUTER, G. (1999) [Identification of prognostic parameters for renal cell carcinoma by cDNA arrays and cell chips]. *Verh Dtsch Ges Pathol*, 83, 225-32.
- MOONEN, L., ONG, F., GALLEE, M., VERHEIJ, M., HORENBLAS, S., HART, A. A. & BARTELINK, H. (2001) Apoptosis, proliferation and p53, cyclin D1, and retinoblastoma gene expression in relation to radiation response in transitional cell carcinoma of the bladder. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 49, 1305-10.
- NAHTA, R. & ESTEVA, F. J. (2006) Herceptin: mechanisms of action and resistance. *Cancer Lett*, 232, 123-38.

- NEGRI, E. & LA VECCHIA, C. (2001) Epidemiology and prevention of bladder cancer. *Eur J Cancer Prev*, 10, 7-14.
- NGUYEN, P. L., SWANSON, P. E., JASZCZ, W., AEPPLI, D. M., ZHANG, G., SINGLETON, T. P., WARD, S., DYKOSKI, D., HARVEY, J. & NIEHANS, G. A. (1994) Expression of epidermal growth factor receptor in invasive transitional cell carcinoma of the urinary bladder. A multivariate survival analysis. *Am J Clin Pathol*, 101, 166-76.
- NOCITO, A., BUBENDORF, L., TINNER, E. M., SUESS, K., WAGNER, U., FORSTER, T., KONONEN, J., FIJAN, A., BRUDERER, J., SCHMID, U., ACKERMANN, D., MAURER, R., ALUND, G., KNONAGEL, H., RIST, M., ANABITARTE, M., HERING, F., HARDMEIER, T., SCHOENENBERGER, A. J., FLURY, R., JAGER, P., FEHR, J. L., SCHRAML, P., MOCH, H., MIHATSCH, M. J., GASSER, T. & SAUTER, G. (2001) Microarrays of bladder cancer tissue are highly representative of proliferation index and histological grade. *J Pathol*, 194, 349-57.
- PASHOS, C. L., BOTTEMAN, M. F., LASKIN, B. L. & REDAELLI, A. (2002) Bladder cancer: epidemiology, diagnosis, and management. *Cancer Pract*, 10, 311-22.
- PETRYLAK, D. P., TANGEN, C. M., VAN VELDHUIZEN, P. J., JR., GOODWIN, J. W., TWARDOWSKI, P. W., ATKINS, J. N., KAKHIL, S. R., LANGE, M. K., MANSUKHANI, M. & CRAWFORD, E. D. (2010) Results of the Southwest Oncology Group phase II evaluation (study S0031) of ZD1839 for advanced transitional cell carcinoma of the urothelium. *BJU Int*, 105, 317-21.
- PEYROMAURE, M., SCOTTE, F., AMSELLEM-OUAZANA, D., VIEILLEFOND, A., OUDARD, S. & BEUZEBOC, P. (2005) Trastuzumab (Herceptin) in metastatic transitional cell carcinoma of the urinary tract: report on six patients. *Eur Urol*, 48, 771-5; discussion 775-8.
- PHILIPS, G. K., HALABI, S., SANFORD, B. L., BAJORIN, D. & SMALL, E. J. (2009) A phase II trial of cisplatin (C), gemcitabine (G) and gefitinib for advanced urothelial tract carcinoma: results of Cancer and Leukemia Group B (CALGB) 90102. *Ann Oncol*, 20, 1074-9.
- PIPER, J. M., TONASCIA, J. & MATANOSKI, G. M. (1985) Heavy phenacetin use and bladder cancer in women aged 20 to 49 years. *N Engl J Med*, 313, 292-5.
- PROCTOR, A. J., COOMBS, L. M., CAIRNS, J. P. & KNOWLES, M. A. (1991) Amplification at chromosome 11q13 in transitional cell tumours of the bladder. *Oncogene*, 6, 789-95.
- RICHTER, J., BEFFA, L., WAGNER, U., SCHRAML, P., GASSER, T. C., MOCH, H., MIHATSCH, M. J. & SAUTER, G. (1998) Patterns of chromosomal imbalances in advanced urinary bladder cancer detected by comparative genomic hybridization. *Am J Pathol*, 153, 1615-21.
- RICHTER, J., JIANG, F., GOROG, J. P., SARTORIUS, G., EGENTER, C., GASSER, T. C., MOCH, H., MIHATSCH, M. J. & SAUTER, G. (1997) Marked genetic differences between stage pTa and stage pT1 papillary bladder cancer detected by comparative genomic hybridization. *Cancer Res*, 57, 2860-4.
- ROBINSON, D. R., WU, Y. M. & LIN, S. F. (2000) The protein tyrosine kinase family of the human genome. *Oncogene*, 19, 5548-57.
- RODRIGUEZ-ALONSO, A., PITA-FERNANDEZ, S., GONZALEZ-CARRERO, J. & NOGUEIRA-MARCH, J. L. (2002) Multivariate analysis of survival, recurrence, progression and development of metastasis in T1 and T2a transitional cell bladder carcinoma. *Cancer*, 94, 1677-84.

- RUBIN, M. A., DUNN, R., STRAWDERMAN, M. & PIENTA, K. J. (2002) Tissue microarray sampling strategy for prostate cancer biomarker analysis. *Am J Surg Pathol*, 26, 312-9.
- SATO, K., MORIYAMA, M., MORI, S., SAITO, M., WATANUKI, T., TERADA, K., OKUHARA, E., AKIYAMA, T., TOYOSHIMA, K., YAMAMOTO, T. & ET AL. (1992) An immunohistologic evaluation of C-erbB-2 gene product in patients with urinary bladder carcinoma. *Cancer*, 70, 2493-8.
- SAUTER, G., HALEY, J., CHEW, K., KERSCHMANN, R., MOORE, D., CARROLL, P., MOCH, H., GUDAT, F., MIHATSCH, M. J. & WALDMAN, F. (1994) Epidermal-growth-factor-receptor expression is associated with rapid tumor proliferation in bladder cancer. *Int J Cancer*, 57, 508-14.
- SAUTER, G., LEE, J., BARTLETT, J. M., SLAMON, D. J. & PRESS, M. F. (2009) Guidelines for human epidermal growth factor receptor 2 testing: biologic and methodologic considerations. *J Clin Oncol*, 27, 1323-33.
- SAUTER, G., MOCH, H., GUDAT, F., MIHATSCH, M. J., HALEY, J., MEECKER, T. & WALDMAN, F. (1993) [Demonstration of gene amplification in urinary bladder cancer by fluorescent in situ hybridization (FISH)]. *Verh Dtsch Ges Pathol*, 77, 247-51.
- SCHRAML, P., KONONEN, J., BUBENDORF, L., MOCH, H., BISSIG, H., NOCITO, A., MIHATSCH, M. J., KALLIONIEMI, O. P. & SAUTER, G. (1999) Tissue microarrays for gene amplification surveys in many different tumor types. *Clin Cancer Res*, 5, 1966-75.
- SHRADER, M., PINO, M. S., BROWN, G., BLACK, P., ADAM, L., BAR-ELI, M., DINNEY, C. P. & MCCONKEY, D. J. (2007) Molecular correlates of gefitinib responsiveness in human bladder cancer cells. *Mol Cancer Ther*, 6, 277-85.
- SIMON, R., NOCITO, A., HUBSCHER, T., BUCHER, C., TORHORST, J., SCHRAML, P., BUBENDORF, L., MIHATSCH, M. M., MOCH, H., WILBER, K., SCHOTZAU, A., KONONEN, J. & SAUTER, G. (2001) Patterns of her-2/neu amplification and overexpression in primary and metastatic breast cancer. *J Natl Cancer Inst*, 93, 1141-6.
- SLAMON, D. J., LEYLAND-JONES, B., SHAK, S., FUCHS, H., PATON, V., BAJAMONDE, A., FLEMING, T., EIERMANN, W., WOLTER, J., PEGRAM, M., BASELGA, J. & NORTON, L. (2001) Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2. *N Engl J Med*, 344, 783-92.
- SMITH, A. H., GOYCOLEA, M., HAQUE, R. & BIGGS, M. L. (1998) Marked increase in bladder and lung cancer mortality in a region of Northern Chile due to arsenic in drinking water. *Am J Epidemiol*, 147, 660-9.
- STEIN, J. P., GINSBERG, D. A., GROSSFELD, G. D., CHATTERJEE, S. J., ESRIG, D., DICKINSON, M. G., GROSHEN, S., TAYLOR, C. R., JONES, P. A., SKINNER, D. G. & COTE, R. J. (1998) Effect of p21WAF1/CIP1 expression on tumor progression in bladder cancer. *J Natl Cancer Inst*, 90, 1072-9.
- SUWA, Y., TAKANO, Y., IKI, M., TAKEDA, M., ASAKURA, T., NOGUCHI, S. & MASUDA, M. (1998) Cyclin D1 protein overexpression is related to tumor differentiation, but not to tumor progression or proliferative activity, in transitional cell carcinoma of the bladder. *J Urol*, 160, 897-900.
- TAKAGI, Y., TAKASHI, M., KOSHIKAWA, T., SAKATA, T. & OHSHIMA, S. (2000) Immunohistochemical demonstration of cyclin D1 in bladder cancers as an inverse indicator of invasiveness but not an independent prognostic factor. *Int J Urol*, 7, 366-72.

- TANGUAY, C., HARVEY, I., HOUDE, M., SRIGLEY, J. R. & TETU, B. (2003) Leiomyosarcoma of urinary bladder following cyclophosphamide therapy: report of two cases. *Mod Pathol*, 16, 512-4.
- TAPIA, C., GLATZ, K., NOVOTNY, H., LUGLI, A., HORCIC, M., SEEMAYER, C. A., TORNILLO, L., TERRACCIANO, L., SPICHTIN, H., MIRLACHER, M., SIMON, R. & SAUTER, G. (2007) Close association between HER-2 amplification and overexpression in human tumors of non-breast origin. *Mod Pathol*, 20, 192-8.
- THOGERSEN, V. B., JORGENSEN, P. E., SORENSEN, B. S., BROSS, P., ORNTOFT, T., WOLF, H. & NEXO, E. (1999) Expression of transforming growth factor alpha and epidermal growth factor receptor in human bladder cancer. *Scand J Clin Lab Invest*, 59, 267-77.
- TIGUERT, R., LESSARD, A., SO, A. & FRADET, Y. (2002) Prognostic markers in muscle invasive bladder cancer. *World J Urol*, 20, 190-5.
- TOSONI, I., WAGNER, U., SAUTER, G., EGLOFF, M., KNONAGEL, H., ALUND, G., BANNWART, F., MIHATSCH, M. J., GASSER, T. C. & MAURER, R. (2000) Clinical significance of interobserver differences in the staging and grading of superficial bladder cancer. *BJU Int*, 85, 48-53.
- TSAI, Y. C., NICHOLS, P. W., HITI, A. L., WILLIAMS, Z., SKINNER, D. G. & JONES, P. A. (1990) Allelic losses of chromosomes 9, 11, and 17 in human bladder cancer. *Cancer Res*, 50, 44-7.
- UNDERWOOD, M., BARTLETT, J., REEVES, J., GARDINER, D. S., SCOTT, R. & COOKE, T. (1995) C-erbB-2 gene amplification: a molecular marker in recurrent bladder tumors? *Cancer Res*, 55, 2422-30.
- VISHNU, P., MATHEW, J. & TAN, W. W. (2011) Current therapeutic strategies for invasive and metastatic bladder cancer. *Onco Targets Ther*, 4, 97-113.
- WAGNER, U., SUESS, K., LUGINBUHL, T., SCHMID, U., ACKERMANN, D., ZELLWEGER, T., MAURER, R., ALUND, G., KNONAGEL, H., RIST, M., JORDAN, P., MOCH, H., MIHATSCH, M. J., GASSER, T. C. & SAUTER, G. (1999) Cyclin D1 overexpression lacks prognostic significance in superficial urinary bladder cancer. *J Pathol*, 188, 44-50.
- WRIGHT, C., MELLON, K., JOHNSTON, P., LANE, D. P., HARRIS, A. L., HORNE, C. H. & NEAL, D. E. (1991) Expression of mutant p53, c-erbB-2 and the epidermal growth factor receptor in transitional cell carcinoma of the human urinary bladder. *Br J Cancer*, 63, 967-70.
- WULFING, C., VON STRUENSEE, D., BIERER, S., BOGEMANN, M., HERTLE, L. & ELTZE, E. (2005) [Expression of Her2/neu in locally advanced bladder cancer: implication for a molecular targeted therapy]. *Aktuelle Urol*, 36, 423-9.

8. Danksagung

Ich danke Prof. Guido Sauter für die Anregung zu diesem Thema und die Möglichkeit, diese Arbeit anzufertigen, sowie für die außerordentliche Unterstützung im Institut für Pathologie, insbesondere bedanke ich mich bei Silvia Schnöger und Sascha Eghtessadi im FISH-Labor.

Mein ganz besonderer Dank gilt meiner Frau, die immer für mich da ist.

9. Lebenslauf

Entfällt aus datenschutzrechtlichen Gründen.

10. Eidesstattliche Versicherung

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:

