

Urologische Klinik der
Technischen Universität München
Klinikum rechts der Isar
(Direktor: Univ.-Prof. Dr. R. Hartung)

**Immunhistochemische Untersuchung zur Expression der Onkoproteine
Bcl2 und Her2/neu bei Harnblasenkarzinomen**

Robert Fäustle

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines
Doktors der Medizin
genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. D. Neumeier

Prüfer der Dissertation:

1. Priv.-Doz. Dr. R. Paul
2. Univ.-Prof. Dr. F. Fend

Die Dissertation wurde am 24.06.2004 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 20.10.2004 angenommen.

| | |
|---|-----------|
| 1. EINLEITUNG | 1 |
| 1.1 Epidemiologie und Ätiologie | 1 |
| 1.2 Pathologie | 1 |
| 1.3 Histopathologische Klassifikation | 2 |
| 1.4 Klinische Einteilung des Urothelkarzinoms | 4 |
| 1.4.1 Oberflächliche Tumore | 4 |
| 1.4.2 Muskelinvasive Tumore | 5 |
| 1.5 Aspekte der molekularen Karzinogenese und molekularer Prognosefaktoren | 5 |
| 1.5.1 Onkogene | 6 |
| 1.5.2 Das Protoonkogen Bcl2 | 7 |
| 1.5.3 Das Onkogen Her2/neu | 10 |
| 1.6 Fragestellung | 11 |
| 2 PATIENTEN, MATERIAL UND METHODEN | 12 |
| 2.1 Patienten und Material | 12 |
| 2.1.1 Art der untersuchten Proben | 13 |
| 2.2 Immunhistochemische Untersuchung | 13 |
| 2.2.1 Probenverarbeitung | 13 |
| 2.2.2 Entparaffinierung, Antigendemaskierung und Hemmung der endogenen Enzymaktivität | 13 |
| 2.2.3 Spezifische Färbung | 14 |
| 2.2.4 Gegenfärbung und Einbettung | 15 |
| 2.2.5 Übersicht über das Protokoll und Reagenzien | 16 |
| 2.3 Qualitätskontrolle, Positiv- und Negativkontrollen | 17 |
| 2.3.1 Überprüfung der Spezifität | 17 |
| 2.3.2 Überprüfung der Sensitivität | 18 |
| 2.4 Auswertung | 20 |
| 2.4.1 Bewertung der Bcl2-Färbung | 20 |
| 2.4.2 Bewertung der Her2/neu-Färbung | 21 |
| 2.5 Statistik | 22 |

| | | |
|------------|---|-----------|
| 3 | ERGEBNISSE | 23 |
| 3.1 | Ergebnisse der Untersuchung des Onkoproteins Bcl2 | 23 |
| 3.1.1 | Ergebnisse der immunhistochemischen Auswertung | 23 |
| 3.1.2 | Zusammenhang mit pathologischen Parametern | 29 |
| 3.1.3 | Korrelation mit klinischen Parametern | 34 |
| 3.1.4 | Immunhistochemischer Nachweis des Bcl2-Onkoprotein in benignem Gewebe | 51 |
| 3.2 | Ergebnisse der Untersuchung des Onkoproteins Her2/neu | 52 |
| 3.2.1 | Ergebnisse der immunhistochemischen Auswertung | 52 |
| 3.2.2 | Korrelation mit pathologischen Parametern | 57 |
| 3.2.3 | Korrelation mit klinischen Parametern | 58 |
| 3.2.4 | Immunhistochemischer Nachweis des Her2/neu-Onkoprotein in benignem Gewebe | 70 |
| 3.3 | Gemeinsame Expression von Bcl2 und Her2/neu | 71 |
| 4 | DISKUSSION | 74 |
| 4.1 | Diskussion der Untersuchung des Onkoproteins Bcl2 | 74 |
| 4.1.1 | Aktuelle Datenlage | 74 |
| 4.1.2 | Diskussion unserer Ergebnisse | 75 |
| 4.2 | Diskussion der Untersuchung des Onkoproteins Her2/neu | 80 |
| 4.2.1 | Aktuelle Datenlage | 80 |
| 4.2.2 | Diskussion unserer Ergebnisse | 81 |
| 4.3 | Diskussion der Untersuchung der gemeinsamen Expression von Bcl2 und Her2/neu | 85 |
| 5 | ZUSAMMENFASSUNG | 86 |
| 6 | LITERATURANGABEN | 88 |
| 7 | ANHANG | 97 |

1. Einleitung

1.1 Epidemiologie und Ätiologie

Das Harnblasenkarzinom macht 2% der malignen Tumorerkrankungen aus (*Garnick et al. 1983, S.93*). Es ist der 5. häufigste Tumor überhaupt, beim Mann gilt es nach Lungen-, Prostata- und Kolonkarzinom als der 4. häufigste Tumor, bei der Frau als der 10. häufigste (*Hautmann et al. 2001, S.204*). Zugleich ist es der zweithäufigste Tumor im Urogenitaltrakt.

Die Inzidenz, also die Zahl der Neuerkrankungen unterscheidet sich bei Mann und Frau dergestalt, daß ca. 30 neue Tumorerkrankungen pro 100000 männliche Einwohner auftreten, bei Frauen hingegen 8 pro 100000 (*Hautmann et al. 2001, S.204*). Damit sind Männer mit einem Verhältnis von 3:1 betroffen. Betrachtet man die Altersabhängigkeit, so ergibt sich eine Steigerung der Inzidenz von 0,2/100 000 bei 20jährigen auf 200/100 000 bzw. 60/100 000 bei 80jährigen Männern bzw. Frauen und ein Altersgipfel in der fünften bis siebten Lebensdekade (*Rübben 1998, S.85*). Insgesamt treten in Deutschland ca. 16000 neue Fälle auf. Tumorbedingt versterben jedes Jahr in Deutschland ca. 5000 Patienten.

Die Ätiologie des Harnblasenkarzinom ist gut erforscht. Ursächlich gilt das kanzerogene Potential vieler chemischer Stoffe, oft aromatische Amine aus der Farbindustrie als gesichert. Hierbei nimmt 2-Naphthylamin eine Schlüsselrolle ein, da es auch für das zwischen zwei bis sechsfach erhöhte Erkrankungsrisiko von Zigarettenrauchern verantwortlich gemacht wird. Ebenso gibt es einen gesicherten Zusammenhang zwischen dem Auftreten von Blasentumoren und bestimmten Medikamenten wie Chlornaphazin oder Phenacetin, aber auch Erkrankungen wie Bilharziose und der Balkannephropathie.

1.2 Pathologie

In der Harnblase finden sich benigne und maligne Tumoren. Zu den häufigen gutartigen Tumoren gehört das Papillom, das noch von unverändertem Epithel bedeckt ist und in das Lumen hervorwächst.

Teilt man die malignen Harnblasentumore histologisch ein, finden sich in über 90% Urothelkarzinome, Plattenepithelkarzinome machen 3-5% aus. Adeno- bzw. undifferenzierte Karzinome kommen in je 2-3% der Fälle vor. Das Carcinoma in situ wird oft als Sonderform oder gar eigene Tumorentität (*Block et al. 1998, S.4*) betrachtet, da es eine schwerstgradige

Dysplasie darstellt und, obwohl es die Lamina propria mucosae nicht überschreitet, eine große maligne Potenz bezüglich Progression und Infiltration besitzt.

Sekundäre Tumoren in der Harnblase, verursacht durch Metastasierung oder durch Infiltration ausgehend von Tumoren in benachbarten Organen sind sehr selten. Weiterhin sind Tumoren nicht-epithelialen, mesenchymalen Ursprungs klassifiziert.

1.3 Histopathologische Klassifikation

Ein genaues Klassifizierungsschema hat die Union International Contre Le Cancer (UICC) mit dem TNM-System geschaffen.

Das T-Stadium gibt über die Größe bzw. Infiltrationstiefe des Primärtumors Auskunft. Tabelle 1 zeigt die Systematik der Klassifikation nach dem T-Stadium.

| | |
|-----|--|
| Tx | Primärtumor kann nicht beurteilt werden |
| T0 | kein Anhalt für Primärtumor |
| Tis | Carcinoma in situ |
| Ta | Nicht invasiver, papillärer Tumor |
| T1 | Invasion der Basalmembran (Lamina propria) |
| T2 | Infiltration der Blasenmuskulatur |
| T2a | Infiltration der oberflächlichen Blasenmuskulatur (innere Hälfte) |
| T2b | Infiltration der tiefen Blasenmuskulatur (äußere Hälfte) |
| T3 | Infiltration des perivesikalen Fettgewebe |
| T3a | mikroskopisch |
| T3b | makroskopisch |
| T4 | Infiltration von Prostata oder Uterus, Vagina, Becken oder Bauchwand |
| T4a | Infiltration von Prostata, Uterus oder Vagina |
| T4b | Infiltration von Becken oder Bauchwand |

Tabelle 1

Übersicht über die T-Stadien der TNM-Klassifikation

Mit den Zusätzen p-, -is und m- wird eine genaue Bezeichnung bezüglich der genauen histologischen Beurteilung, des zusätzliche Auftretens eines Carcinoma in situ und eines multiplen Tumors getroffen.

Der eventuelle Befall der Lymphknoten wird nach dem N-Stadium klassifiziert. Das wird in der folgenden Tabelle (Tab. 2) dargestellt:

| | |
|----|--|
| Nx | Lymphknotenstatus unbekannt |
| N0 | keine Lymphknotenmetastasen |
| N1 | Befall eines Lymphknotens <2cm |
| N2 | Befall eines Lymphknotens von 2 bis 5cm oder mehrerer Lymphknoten <5cm |
| N3 | Befall eines Lymphknotens >5cm |

Tabelle 2

Übersicht über den Lymphknoten-Status der TNM-Klassifikation

Das M-Stadium gibt Auskunft über das Vorhandensein von Fernmetastasen. Das Schema dazu wird in der folgenden Tabelle (Tab. 3) angegeben.

| | |
|----|----------------|
| Mx | unbekannt |
| M0 | metastasenfrei |
| M1 | Fernmetastasen |

Tabelle 3

Übersicht über den Fernmetastasen-Status der TNM-Klassifikation

Ein sehr wichtiger Beurteilungsfaktor ist das histopathologische Grading. Es beschreibt den Differenzierungsgrad der Tumorzellen. Hier werden drei Grade unterschieden, in die die Beurteilung vieler Faktoren eingeht. Dazu gehört unter anderem eine erhöhte Zellzahl, Veränderungen der Kerngestalt, ein Verlust der Differenzierung von basalen hin zu oberflächlichen Zellschichten, Häufung von Mitosefiguren und Riesenzellen (*Mostofi et al. 1973 nach Korman 1997, S.257*). Der Grad I beschreibt ein Gewebe, das noch weitgehend dem Ausgangsgewebe ähnelt, aber schon einen Schichtungsverlust aufweist. Die Kerne sind noch relativ monomorph. Ein weitgehend anaplastischer, also stark entdifferenzierter Tumor wird mit dem Grad III bezeichnet. Das Ausgangsgewebe ist nicht mehr zu erkennen und es liegt eine hochgradige Kernpolymorphie vor, eine regelrechte Schichtung ist nicht mehr zu erkennen.

Dazwischen ist die heterogene Gruppe der Grad II Tumore angesiedelt, die eine mäßige Differenzierung aufweisen.

Eine Einteilung in vier Schweregrade ist auch üblich, wobei hier der vierte Grad einen sehr stark entdifferenzierten Tumor beschreibt (Einteilung der WHO). Dieses Einteilungsschema wird vom Pathologischen Institut der TU München verwendet.

1.4 Klinische Einteilung des Urothelkarzinoms

1.4.1 Oberflächliche Tumore

Bei 70% der Patienten wird beim Erstbefund ein oberflächlicher Tumor festgestellt, während in 30% der Fälle schon eine Infiltration der Muskulatur stattgefunden hat. Zu den oberflächlichen Tumoren werden Neoplasien gerechnet, die auf die Mucosa (Ta und Tis) oder auf die Submucosa (T1) beschränkt sind.

Während bei der Beurteilung der Prognose von muskelinvasiven Tumoren eine Einteilung in verschiedene Klassen anhand der Differenzierungsgrade wegen der insgesamt schlechten Prognose nicht möglich ist, ergibt sich ein signifikanter Unterschied in der Unterscheidung zwischen mittelgradig differenzierten und entdifferenzierten oberflächlichen Tumoren (*Rübben et al. 1998, S.94*). Es ergeben sich unterschiedliche Risiken für Rezidivierung, Progression und tumorbedingtes Versterben.

Korman gibt für oberflächliche Tumoren des Differenzierungsgrades II ein 10-Jahres-Überleben von 87% an, wohingegen nur 35% der Patienten mit einem Tumor des Differenzierungsgrades III die 10 Jahre überleben (*Korman et al. 1997, S.258*). Ein ähnlicher Zusammenhang zeigt sich zwischen Differenzierungsgrad und einem möglichen Progreß, also der Übergang in einen muskelinvasiven Tumor: bei 18-33% der Patienten mit Tumoren des Differenzierungsgrades II tritt ein Progreß ein, hingegen bei 50-62% der Tumoren mit Differenzierungsgrad III. Der Differenzierungsgrad ist ein sehr wichtiger Prognosefaktor.

Der zweite wichtige Prognosefaktor ist das T-Stadium. Die tumorspezifische Überlebensrate über 20 Jahre von 89% für Ta-Tumoren gibt eine vergleichsweise günstige Prognose an, da nur 30% der Patienten mit T1-Tumoren einen vergleichbaren Zeitraum überleben (*Korman et al. 1997, S.258*). Auch für den Progreß hin zu einem muskelinvasiven Tumor besteht ein signifikanter Unterschied von 0-4% bei Ta-Tumoren und 27-46% bei T1-Tumoren. Das Risiko an einem Rezidiv zu erkranken sei für beide Tumorstadien ähnlich (*Korman et al. 1997, S.258*).

Als besonders aggressiv werden die Karzinome mit der Staging-Formel T1 G3 gesehen. Bei diesen Tumoren besteht ein 50%iges Risiko für einen Progreß. Diese Gruppe von Tumoren scheint sich eher wie ein invasiver Tumor zu verhalten, so daß die Behandlung dieser Patienten besonders sorgfältig geplant werden sollte.

Das Carcinoma in situ (Cis) kommt in zwei Ausprägungen vor: diffus oder fokal. Diese Unterscheidung ist zur Risikoabschätzung sehr sinnvoll, da nach Droller die Inzidenz für einen Progreß von 8% für ein fokales Cis auf 78% für ein diffus auftretendes Cis steigt (*Droller et al. 1997, S. 249*).

1.4.2 Muskelinvasive Tumore

Tumoren, die dem Stadium größer gleich T2a zugewiesen werden, überschreiten die Lamina propria mucosae und dringen in die Lamina muskularis vor. Als bester Prognosefaktor gilt hier wie oben erwähnt nicht der Differenzierungsgrad oder das T-Stadium, sondern das Vorliegen von Lymphknotenmetastasen. Die Überlebensraten sind für T2- und T3a-Tumoren in Abwesenheit von Lymphknotenmetastasen gleich (*Pressler et al. 1997, S.279*). Bei vorhandenen Lymphknotenmetastasen besteht aber ein signifikanter Unterschied bezüglich der Überlebenszeit zwischen Urothelkarzinomen, die noch auf die Blase beschränkt sind (also T2), und denjenigen, die extravasikal ausgedehnt sind. Eine Unterscheidung innerhalb dieser letzten Gruppe ist aber aufgrund der gleichermaßen schlechten Prognose nicht unbedingt möglich.

1.5 Aspekte der molekularen Karzinogenese und molekularer Prognosefaktoren

In den letzten 10 Jahren wurde eine Vielzahl möglicher molekularer Prognosefaktoren erforscht. Einer der Gründe liegt wohl darin, daß der Wunsch besteht, nicht nur Aussagen über das Überleben von Patienten mit Tumorleiden anhand von statistischen Auswertungen zu treffen, sondern Einblick in das Verhalten von Tumorzellen zu gewinnen. Damit würde nicht nur ein Weg bestehen, die Prognose der Patienten näher zu bestimmen, sondern auch, Patienten zu identifizieren, deren Behandlung eine Modifikation klassischer Behandlungsstrategien bedarf.

Andererseits könnten aus dem Wissen um neue molekulare Aspekte neuartige Therapiemöglichkeiten erwachsen, die pharmakologisch oder gentherapeutisch in die verschiedenen Ebe-

nen der Karzinogenese eingreifen. Die Transformation einer gesunden Zelle in eine maligne Tumorzelle läuft meist über einen Mechanismus, der mehrere Schritte beinhaltet (Modell der „Mehrschrittkarzinogenese“). Dabei sind verschiedene Genklassen involviert. Es sind Zellzyklusgene, Onkogene, Tumorsuppressorgene und DNA-Reparaturgene betroffen (*Brandau et al. 2001, S.491-492*).

Zwei Klassen sind besonders wichtig: (Proto-)onkogene und Tumorsuppressorgene. Die beiden untersuchten Genprodukte Bcl2 und Her2/neu zählen zu den von Onkogenen kodierten Proteinen.

1.5.1 Onkogene

Bei Protoonkogenen handelt es sich um Gene, die eine physiologische Aufgabe besitzen: sie kodieren für Proteine, die positiv regulierend auf Wachstum, Proliferation und Differenzierung wirken (*Grimm et al. 1998, S.806*). Ihre Produkte sind unter anderem Wachstumsfaktoren, Wachstumsfaktorrezeptoren, Signaltransduktoren, Proteinkinasen oder Transkriptionsfaktoren (*Grimm et al. 1998, S.806*). Diese Gene können durch somatische Mutation verändert werden: eine Aktivierung des Protoonkogen zu einem Onkogen hat stattgefunden. So kann eine Translokation oder Amplifikation der Gene, eine Punktmutation oder Insertion eines stärkeren Promotors entweder zu veränderten Genprodukten oder zu einer Überproduktion des unveränderten Genprodukts führen (*Grimm et al. 1998, S.806*). Jetzt kann der ursprünglich gewollte proliferationsfördernde Effekt zu einem unkontrollierten Wachstum und somit zur Entstehung von Neoplasien führen.

Obwohl es sich hier zwar um einen generellen zellulären Mechanismus handelt, findet sich oft eine Assoziation von Onkogenen mit bestimmten Tumorentitäten. So findet sich das c-myc-Onkogen, das Zellproliferation und -differenzierung kontrolliert, hauptsächlich beim Burkitt-Lymphom. Das c-abl/bcr-Gen, das als tyrosinspezifische Proteinkinase an der intrazellulären Signalübertragung beteiligt ist, ist charakteristisch für die chronische myeloische Leukämie (CML) (*Grimm et al. 1998, S.806*). Die für das Harnblasenkarzinom wichtigsten Onkogene sind die ras-Gen-Familie, in der Ha-ras die wichtigste Rolle spielt, und der epidermal growth factor receptor (EGFR). Es findet sich zwar eine Überexpression im neoplastischen Gewebe, ein positiver prognostischer Wert konnte aber noch nicht bewiesen werden (*Brandau et al. 2001, S.492*).

1.5.2 Das Protoonkogen Bcl2

Das Bcl2-Gen befindet sich auf dem Chromosom 18q21 und kodiert für ein Protein von 25kDa, das Bcl2-Onkoprotein, kurz Bcl2 genannt wird. Im Folgenden ist mit Bcl2 das Produkt, nicht aber das Gen gemeint.

1984 wurde eine Überexpression von Bcl2 bei prä-B-Zell-Leukämien gefunden. Ca. 85% der folliculären Lymphome und ca. 20% der diffusen B-Zell-Lymphome (*Korsmeyer et al. 1992, S.879*) weisen diesen Befund auf, der mit einer t(14;18) Translokation des Bcl2-Gens assoziiert. Bcl2 ist eine Abkürzung für „B-Zell-Lymphom/Leukämie-2 Gen“.

Bcl2 gehört zu einer Gruppe der Onkogene, die als Regulatoren des Zelltodes, der Apoptose gelten. Eine strukturelle Verwandtschaft und gleichzeitig eine intensive gemeinsame Interaktion mit anderen, strukturell ähnlichen Genprodukten hat den Namen der Bcl2-Familie geprägt.

Diese Familie teilt sich in zwei Untergruppen: es gibt Apoptoseantagonisten wie Bcl2, Bcl-X_L, Bcl-w und Apoptoseagonisten wie Bax, Bak, Bcl-X_S, Bad, Bid. Diese Familie wird als die „biologisch wichtigste Klasse von Apoptoseregulatoren“ (*Kroemer et al. 1997, S.614*) gesehen. Dabei befinden sich die beiden Untergruppen in gesunden Zellen in fein reguliertem Gleichgewicht. Dieses Gleichgewicht entscheidet, ob eine Zelle auf einen potentiell tödlichen Stimulus (ausgelöst z.B. durch chemische Noxen, Zelltraumen, aber auch durch intra- oder interzelluläre Induktion) mit der Einleitung des programmierten Zelltodes reagiert oder nicht.

In der folgenden Abbildung (Abb.1) ist dieses Gleichgewicht schematisch wiedergegeben.

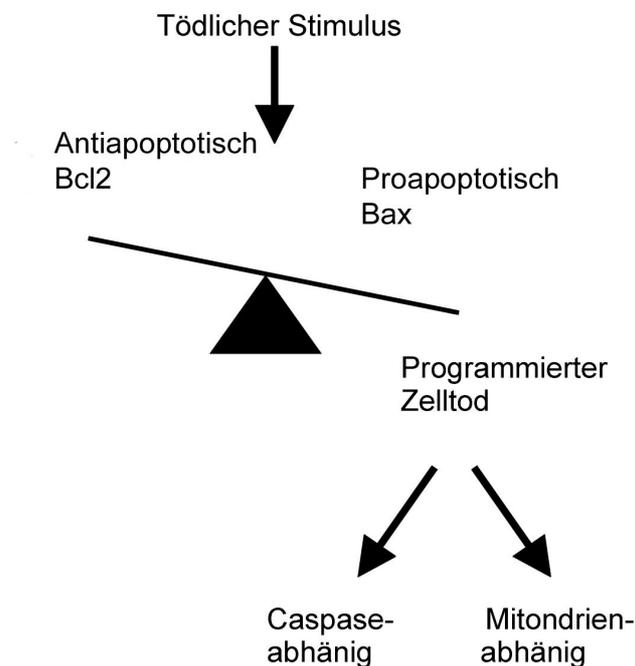


Abbildung 1

Schema des proapoptischen und antiapoptischen Gleichgewichts bedingt durch die Bcl2-Familie

Schließlich kann der Zelltod durch zwei verschiedene, aber miteinander interagierende Mechanismen eingeleitet werden: durch eine Mitochondrienfehlfunktion und die Caspase-vermittelte Apoptose. Dabei zeigen die Mitochondrien eine Änderung des Membranpotentials, eine Produktion reaktiver Sauerstoffradikale, eine Änderung der Permeabilität und eine Bildung von Cytochrom C. Dieses aktiviert Apaf-1, das den Ablauf der Caspase-Reaktionskette initiiert und somit das Verbindungsmolekül zwischen beiden Mechanismen darstellt. Die aktivierten Caspasen bestehen aus zwei kleinen (p12) und zwei großen (p17) Untereinheiten, die ihrerseits Moleküle (wie PARP) freisetzen, die den Zelltod schließlich bewirken (Gross et al., 1999, S. 1900).

Auch die Verteilung der pro- und antiapoptischen Untergruppen auf die zellulären Kompartimente ist unterschiedlich. Die antiapoptischen Proteine wie Bcl2 sind integrale Membranproteine, die sich hauptsächlich in Membranen der Mitochondrien, aber auch des Endoplasmatischen Retikulums und des Zellkerns befinden (Gross et al. 1999, S.1899). Die anderen

Familienmitglieder finden sich in freier Form im Zytoplasma oder Zytoskelett, so daß sie das Auftreten von apoptose-fördernden Stimuli überwachen können. Treffen solche Reize auf eine Zelle werden bestimmte Regionen in proapoptotischen Proteinen phosphoryliert, so daß sie jetzt die Möglichkeit haben, mit anderen Molekülen Homo- oder Heterodimere zu bilden. Hunter beschreibt eine der vielen Möglichkeiten, bei der Bax mit Bcl2 dimerisiert und damit Bcl2 an seiner antiapoptotischen Aktivität hindert. Dadurch wird der Zelltod eingeleitet. Dieser kann durch mehrere, auch parallel ablaufende Mechanismen ausgeführt werden: es wird vermutet, daß diese neu geformten Dimere direkten Effekt auf die Membran ausüben. Sie können entweder selber Kanäle in der Mitochondrienmembran formen oder die sogenannten „permeability transition pores“ (PTP) induzieren. Es folgt jeweils ein verändertes Membranpotential und ein Entweichen von reaktiven Stoffen wie Cytochrom C, das wiederum einen zweiten ausführenden Mechanismus, die Caspase-Kaskade anstößt (*Gross et al. 1999, S.1905*). Die morphologisch nachvollziehbare Folge ist ein Schwellen der Mitochondrien, eine Verdichtung des Chromatins und des Zytoplasmas bis zu deren Zerfall und Bildung der sogenannten Apoptosekörperchen, die schließlich von Gewebsmakrophagen oder angrenzenden Zellen aufgenommen werden.

Liegt aber eine Überexpression von Bcl2 oder Bcl-X_L vor, können diese Effekte nicht oder nur in geringerer Masse ablaufen (*Gross et al.1999, S.1903*). Eine Vielzahl von Mechanismen werden dafür verantwortlich gemacht. In einem Review von Kroemer werden Effekte auf die Zellmembran, das Redoxpotential, auf Proteasen, interzelluläre Ionen und auf die Mitochondrien aufgeführt (*Kroemer et al. 1997, S.617*). Aus Versuchen in zellfreien Systemen kann gefolgert werden, daß Bcl2 ein Freiwerden von apoptose-fördernden Proteinen aus den Mitochondrien verhindert (*Kroemer et al. 1997, S.618*).

So wird schließlich auf Grund dieser Annahmen eine Überexpression von Bcl2 in einen Zusammenhang mit dem Entstehen von Neoplasien gebracht, da diese Zellen einem natürlichen Zelltod entgehen und ungehindert proliferieren können.

1.5.3 Das Onkogen Her2/neu

Wie auch Bcl2 gehört Her2/neu zu einer Familie von untereinander strukturell sehr ähnlichen Rezeptoren. Dazu gehören drei weitere Rezeptoren, die Her1, Her3 und Her4 genannt werden. Diese Rezeptoren wurden unabhängig in verschiedenen Laboratorien entdeckt, so daß mehrere Namen für diese Familie vorhanden sind: zuerst wurden sie in Neuroglioblastom-Tumoren von Ratten entdeckt und wurden daher „neu“ genannt. Andererseits wurde eine enge Verwandtschaft mit dem epidermal growth factor receptor (EGFR, entspricht Her1), dessen korrespondierendes Gen als c-erbB bekannt war, gefunden, so daß der Name c-erbB-2 geprägt wurde. Das Her2 steht für „human EGF receptor“. Die Kombination Her2/neu ist sehr gebräuchlich (*DiGiovanni et al. 1999, S.1*).

Her2/neu gehört auch zu den Onkogenen. Liegt eine Überexpression vor, führt es aber nicht wie Bcl2 über eine Hemmung der Apoptose zu einer möglichen Entartung von Zellen, sondern es stellt einen Proliferationsreiz für viele Zellen da. Besonders kritisch sei das für Epithelzellen (*Klapper et al. 2000, S.42*).

Dafür müssen aber mehrere Voraussetzungen erfüllt sein: zuallererst müssen Wachstumsfaktoren, die an diese Rezeptorfamilien binden können, vorhanden sein. Dazu gehört der „epidermal growth factor“ (EGF), transforming growth factor alpha (TGF- α), Amphiregulin (AR) und circa 30 weitere EGF-ähnliche Substanzen, die autokrin oder von umliegenden Stromazellen sezerniert werden. Für Her2/neu wurde noch kein spezifischer Ligand identifiziert, es fungiert eher als Corezeptor mit geringer Affinität und großer Spezifität. Die wichtigste Voraussetzung ist das Dimerisieren der einzelnen Familienmitglieder, wobei Her2/neu der beliebteste Partner ist. Bilden sich liganden-induzierte Heterodimere aus Her2/neu und einem anderen Familienmitglied wird im Gegensatz zu anderen Kombinationen eine sehr große Verstärkung des mitogenen, also wachstumsfördernden Signals bewirkt. Als einer der Gründe dafür wurde gefunden, daß Heterodimere mit Beteiligung von Her2/neu in geringerer Masse einer Endozytose unterliegen.

Klinische Bedeutung als Prognosefaktor hat Her2 vor allem beim Mammakarzinom erlangt. Während Her2/neu bei Brustkrebspatientinnen ein statistisch signifikant geringeres Überleben belegt, bewirkt die alleinige Überexpression von Her3 kein geringeres Überleben (*DiGiovanni et al. 1999, S.1*).

Das die Zellproliferation fördernde Potential von Her2/neu kommt nicht durch ein verändertes, aggressiveres Protein zustande. Es wurde zwar eine aktivierende Punktmutation in Glioblastomen von Ratten festgestellt, diese konnte aber beim Menschen nicht nachgewiesen wer-

den (*Singleton et al. 1992, S.1146*). Hier scheint lediglich die Zahl der Genkopien für Her2/neu erhöht, was eine erhöhte Expression des Her2/neu-Protein bewirkt. Ersteres kann durch den Nachweis erhöhter m-RNA-Mengen im Northern Blot belegt werden, das Protein kann wie in der vorliegenden Arbeit durch die immunhistochemische Färbung nachgewiesen werden.

1.6 Fragestellung

Obwohl zahlreiche Untersuchungen zur Wertigkeit molekularer Prognosefaktoren bei humanen Tumoren vorliegen, ist die Datenlage verwirrend und nur wenige einzelne Prognosefaktoren haben sich als verwertbar erwiesen.

Dies gilt auch für die beiden Prognosefaktoren Bcl2 und Her2/neu.

Ebenso scheint bei verschiedenen Tumorentitäten Uneinigkeit über die Aussagekraft der jeweiligen molekularen Prognosefaktoren zu herrschen. So gilt die nachgewiesene Überexpression des Bcl2-Onkoproteins bei Brustkrebspatientinnen als Zeichen einer günstigen Überlebenschance (*Joensuu et al. 1994, S.1191*), in vielen anderen Tumoren aber als prognostisch ungünstiges Zeichen (*Desoize et al. 1994, S.2291*).

Es können also einerseits an anderen Tumoren gewonnene Erkenntnisse nicht auf das Harnblasenkarzinom übertragen werden, andererseits ist die Datenlage über die beiden molekularen Prognosefaktoren Bcl2 und Her2/neu auch beim Harnblasenkarzinom sehr uneinheitlich.

Eine abschließende Aussage zu prognostischem oder prädiktivem Wert dieser beiden Onkogene konnte beim Harnblasenkarzinom noch nicht getroffen werden.

Aus diesem Grunde wurden in der vorliegenden Arbeit die beiden Prognosefaktoren Bcl2 und Her2/neu an demselben Patientenkollektiv bezüglich ihrer prognostischen Bedeutung untersucht, um dann deren Wertigkeit einzeln und in Kombination zu evaluieren.

Zu diesem Zweck wurde die allgemein anerkannte und auch im Routinebetrieb eingesetzte Methode der Immunhistochemie eingesetzt, um eine Überexpression beider molekularer Marker nachzuweisen.

2 Patienten, Material und Methoden

2.1 Patienten und Material

In die Untersuchung der Expression von Bcl2-Onkoprotein und Her2/neu-Onkoprotein wurden insgesamt 201 Patienten einbezogen, wobei für die Färbung von Her2/neu nur 163 Patienten zur Verfügung standen, da nicht mehr genügend Tumorgewebe vorhanden war.

Diese waren zwischen 24 und 90 Jahren alt und waren alle an einem Urothelkarzinom erkrankt. Sie wurden zwischen Februar 1990 und Dezember 1998 im Klinikum Rechts der Isar in München operiert und anschließend meist von niedergelassenen Urologen oder der Urologie im Klinikum Rechts der Isar betreut. Der durchschnittliche Nachsorgezeitraum beträgt 41 Monate (zwischen 4 und 102 Monaten). Das Patientenkollektiv besteht aus 144 Männern und 57 Frauen bzw. für die Her2/neu-Färbung 116 Männern und 47 Frauen, das Durchschnittsalter liegt bei 68 Jahren (zwischen 24 und 90 Jahren).

Dabei wiesen 79 der Patienten, deren Tumoren Bcl2 gefärbt wurden, und 59 der Patienten, deren Tumoren Her2/neu gefärbt wurden, Risikofaktoren auf. Dazu zählt aktives oder ehemaliges Tabakrauchen und die berufliche Exposition gegenüber für die Entstehung von Blasen-tumoren relevanten Karzinogenen. Eine Aufstellung dieser Daten zeigt die Tabelle 4.

| Risikofaktoren der Patienten mit Bcl2-Färbung | |
|--|-----|
| Patientenzahl insgesamt | 201 |
| keine Risikofaktoren | 122 |
| Risikofaktoren, davon | 79 |
| aktiver Raucher | 55 |
| ehemaliger Raucher | 23 |
| berufliche Exposition | 1 |

| Risikofaktoren der Patienten mit Her2/neu-Färbung | |
|--|-----|
| Patientenzahl insgesamt | 163 |
| keine Risikofaktoren | 104 |
| Risikofaktoren, davon | 59 |
| aktiver Raucher | 42 |
| ehemaliger Raucher | 17 |
| berufliche Exposition | 0 |

Tabelle 4

Auflistung der Risikofaktoren der Patienten mit Bcl2- oder Her2/neu-Färbung

2.1.1 Art der untersuchten Proben

Bei den untersuchten Proben handelt es sich um Formalin-fixiertes und in Paraffin eingebettetes Material aus dem Archiv des Pathologischen Instituts der TU München. Der TN(M)-Status des jeweiligen Harnblasenkarzinoms wurde anhand eines HE-Schnittes von einem Pathologen überprüft. Dieses wurde von Herrn Dr. G. Weirich durchgeführt, der auch an der Beurteilung der immunhistochemischen Färbung maßgeblich beteiligt war.

2.2 Immunhistochemische Untersuchung

2.2.1 Probenverarbeitung

Untersucht wurde jeweils ein Schnitt des tumorösen Gewebes und ein oder zwei verschiedene Schnitte mit Geweben aus nicht veränderten, benignen Anteilen der Blase. Dafür wurden von den Paraffinblöcken 4-5µm dicke Schnitte angefertigt und wegen der besseren Haftung auf mit Poly-L-Lysin beschichtete Objektträger der Firma Menzel-Gläser aufgezogen.

2.2.2 Entparaffinierung, Antigendemaskierung und Hemmung der endogenen Enzymaktivität

Für beide Färbungen wurde ein Protokoll festgelegt, das die besten Ergebnisse zeigte und sich wie folgt darstellt:

Die Paraffinschnitte wurden über Nacht bei ca. 60°C im Brutschrank getrocknet, um restliches, noch am Gewebe befindliches Wasser zu verflüchtigen und um das Paraffin zu schmelzen. Danach wurden die Schnitte in Xylol entparaffiniert, dann über eine absteigende Alkoholreihe rehydriert und schließlich mit Aqua dest. und Tris-Puffer gewaschen. Da bei der Fixierung in Formalin Kreuzvernetzungen reaktiver Gruppen, meist Aldehydvernetzungen (*Noll et al. 2000, S.40*) innerhalb des Gewebes entstehen und dadurch viele Antigene für diagnostische Antikörper unzugänglich sind, muß eine Antigendemaskierung durchgeführt werden. Diese wird in Übereinstimmung mit der Arbeit von Cattoretti hitzeinduziert durchgeführt (*Cattoretti et al. 1993, S.86-88*). Dabei werden die mit dem Bcl2-Antikörper zufärbenden Schnitte für 7min in einem Schnellkochtopf in 10mMol Citratpuffer gekocht, während die mit dem Her2/neu-Antikörper zufärbenden Schnitte für 40min im Wasserbad bei 92°C ebenfalls in 10mMol Citratpuffer hitzedemaskiert werden.

Um eine gleichmäßige Benetzung der Objektträger zu ermöglichen und ein Herunterlaufen der später aufgetragenen Flüssigkeiten zu verhindern, wurden die Präparate mit einem Fettstift der Firma Dako eingekreist. Da später als Teil der indirekten Nachweismethode ein Enzymkomplex verwendet werden soll, der über Meerrettich-Peroxidase das Chromogen umsetzt, muß die Aktivität der endogenen, vor allem in Erythrozyten und Granulozyten vorhandenen Peroxidase effektiv blockiert werden, um eine unspezifische Hintergrundfärbung zu vermeiden. Das wird durch eine Inkubation in 20%iger H₂O₂-Lösung für 5min erreicht.

2.2.3 Spezifische Färbung

Bei den jetzt eingesetzten Antikörpern handelt es sich jeweils um monoklonale Antikörper der Firma Dako. Die Verdünnung des Primärantiköpers wurde wie folgt evaluiert: sicher positive Kontrollen, die für Bcl2 aus Lymphknoten und für Her2/neu aus Mamma stammen und deren Genamplifikation durch Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) und somit deren Onkoprotein-Expression bewiesen wurde, wurden mit verschiedenen Verdünnungsstufen inkubiert. Zusätzlich wurde bei der Färbung des Her2/neu Onkoproteins eine Korrelation zu dem käuflich erwerbbaaren HercepTest der Firma Dako evaluiert. Dabei ergab sich als beste Verdünnung 1:50 für Bcl2 und 1:300 für Her2/neu. Als Detektionssystem wurde die Labeled-Streptavidin-Biotin-Methode (LSAB-Methode) gewählt. Dies ist eine indirekte Nachweismethode. Dabei bindet ein spezies-spezifischer Antikörper, der als sogenannter Brücken- oder Sekundärantikörper biotinyliert vorliegt, an den Primärantikörper. Weiterhin macht sich diese Methode die Affinität zwischen Biotin und Streptavidin zu Nutze, da im nächsten Schritt ein aus Meerrettich-Peroxidase (=HRP) und Streptavidin bestehender Enzymkomplex an den Sekundärantikörper bindet. Dieser Enzymkomplex setzt im nächsten Schritt das Chromogen Diaminobenzidin (DAB) zu einem braunen Farbprodukt um.

In der untenstehenden Abbildung (Abb. 2) ist ein Schema der LSAB-Methode zu sehen.

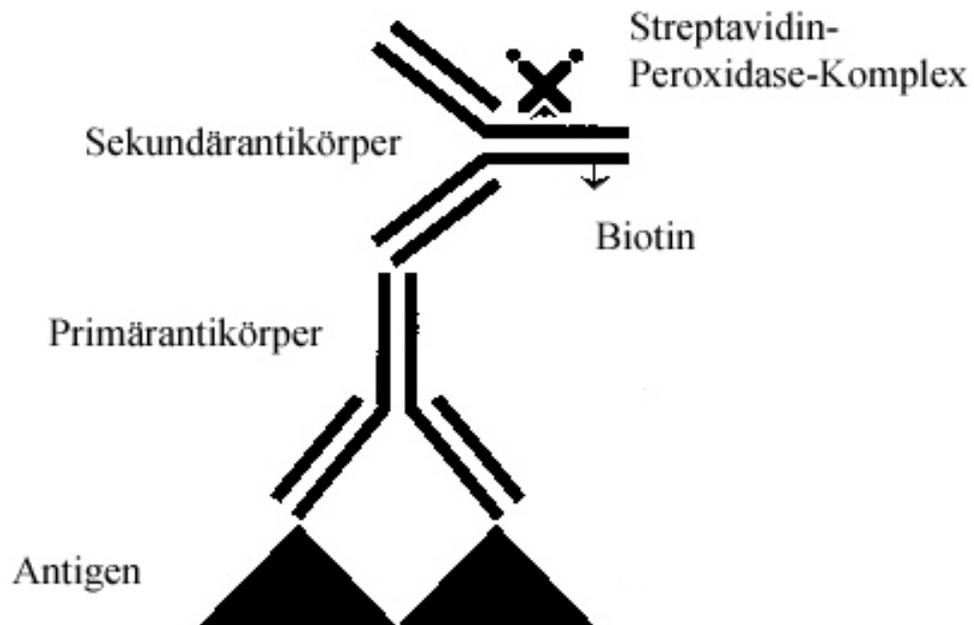


Abbildung 2

LSAB-Methode (nach Noll et al. 2000, S.18)

2.2.4 Gegenfärbung und Einbettung

Um eine histologische Beurteilung zu erleichtern, werden die Schnitte gegengefärbt. Dafür werden sie für 10s in Hämalaun getaucht, welches in warmen, fließenden Wasser abgewaschen wird, wodurch eine leichte, bläuliche Hintergrundfärbung entsteht. Schließlich werden die Präparate in aufsteigender Alkoholreihe und in Xylol dehydriert und mit Eukitt (Hersteller: Kindler) eingedeckt.

2.2.5 Übersicht über das Protokoll und Reagenzien

Tabelle 5 zeigt eine Übersicht über die angewendeten Inkubationszeiten, wobei die Schnitte immer in einer feuchten Kammer inkubiert wurden, um ein Austrocknen zu verhindern. Alle Schritte wurden bei Raumtemperatur durchgeführt.

| Substanz | Menge in μl | Zeit in Min |
|----------------------------|------------------------|-------------|
| Primärantikörper | 200 | 60 |
| Sekundärantikörper | 200 | 30 |
| Streptavidin-Enzymkonjugat | 200 | 30 |
| Chromogen DAB | 230 | 10 |

Tabelle 5

Wichtige Inkubationszeiten für immunhistochemische Färbung mit Bcl2- und Her2/neu-spezifischen Antikörpern

Die verwendeten Lösungen und Reagenzien setzen sich folgendermaßen zusammen (Tab. 6):

| Lösung | Zusammensetzung |
|-------------------------------|--|
| Tris-Puffer | 1:10 Verdünnung der Stammlösung mit Aq. dest. |
| Tris-Puffer-Stammlösung | 60,5g Trizma-Base (Merck), 90g NaCl (Merck) in 1000ml Aq. dest., mit 2N Salzsäure (Merck) eingestellt auf pH 7,6 |
| H ₂ O ₂ | 60ml H ₂ O ₂ 30%ig (Merck) in 240ml Aq. dest. |
| Citratpuffer | 18ml Stammlösung. A, 82ml Stammlösung B und 900ml Aq. dest., eingestellt auf pH 6,0 |
| Citratpuffer Stammlösung. A | 21,01g Zitronensäuremonhydrat (Merck) in 1000ml Aq. dest. |
| Citratpuffer Stammlösung. B | 29,41g Natriumcitrat (Merck) in 1000ml Aq. dest. |
| Hämalaun | saures Hämalaun nach Mayer |

Tabelle 6

Zusammensetzung der für die immunhistochemische Bcl2 und Her2/neu-Färbung von histologischen Präparaten verwendeten Lösungen

Die unten stehende Tabelle (Tab. 7) enthält die genaue Bezeichnung der verwendeten Substanzen und die Herstellerangaben.

| Antikörper | Firma |
|---|--------------|
| Anti-human BCL2 Onkoprotein Clone 124 Lot 011 (monoklonal Maus) | Dako |
| Anti-human c-erbB-2 (=Her2/neu) Onkoprotein Lot 108 (monoklonal Hase) | Dako |
| Antikörperverdünnungslösung | Dako |

| Detektionssystem | Firma |
|---|--------------|
| Chemmate Detection Kit, Peroxidase/DAB, Hase/Maus bestehend aus | Dako |
| biotinylierter Sekundärantikörper-Lösung | Dako |
| Enzymkomplex Streptavidin-Peroxidase (HRP) | Dako |
| Chromogen 3,3'-Diaminobenzidin Tetrahydrochlorid DAB | Dako |
| Chromogen-Verdünnungspuffer | Dako |

Tabelle 7

Genaue Bezeichnung und Firmenangabe der verwendeten Antikörper und Nachweissysteme für die immunhistochemische Bcl2 und Her2/neu-Färbung von histologischen Präparaten

2.3 Qualitätskontrolle, Positiv- und Negativkontrollen

Zur Qualitätssicherung wurde nicht nur das oben beschriebene standardisierte Protokoll streng eingehalten, sondern es wurde auch darauf Wert gelegt, falsch positive und falsch negative Ergebnisse auszuschließen.

2.3.1 Überprüfung der Spezifität

Um die Spezifität des Antikörpers zu überprüfen und somit falsch positive Ergebnisse zu vermeiden, wurde ein sicher negatives Präparat mit dem Antikörper in der jeweiligen Färbereihe inkubiert. Dafür diente z.B. die Kontroll-Zell-Linie MDA-231 der Firma Dako. Es zeigte sich regelrecht nie eine Färbung.

Als Methode zur Überprüfung der Spezifität des Detektionssystems, also des Sekundärantikörpers und des Streptavidin-Peroxidase-Komplexes, diente bei jeder Färbung ein Präparat, bei dem der Primärantikörper weggelassen wurde. Das wurde als Negativkontrolle angesehen. Auch hier zeigte sich nie eine Färbung.

2.3.2 Überprüfung der Sensitivität

Die Sensitivität beschreibt die Affinität des Antikörpers zu seinen Antigenen. Dafür wurde bei jeder Färbung ein sicher positives Präparat mitgefärbt. Diese Präparate stammen, wie oben beschrieben, aus Geweben, deren Expression der Onkoproteine durch andere Methoden gesichert wurde. Es ergab sich in jedem Fall eine spezifische Färbung.

Dafür wurde auf jeden Schnitt, der Her2/neu gefärbt werden sollte, ein kleines Stück des positiven Gewebes als Positivkontrolle aufgezo-gen. Bei der Bcl2-Färbung wurde pro Färbereinheit nur eine externe Positivkontrolle mitgeführt, da hier eine zweite interne Kontrolle mitbenutzt werden konnte. Die im Stroma oder Urothel vorhandenen Leukozyten beweisen eine gelungene, spezifische Färbung, wenn diese im ganzen Objekt homogen gefärbt sind.

Folgende Bilder zeigen diese spezifische Färbung anhand der jeweiligen Positivkontrollen. In Abbildung 3 ist die Positivkontrolle für die Her2/neu-Färbung mit deutlicher zirkumferenter Membranfärbung dargestellt.

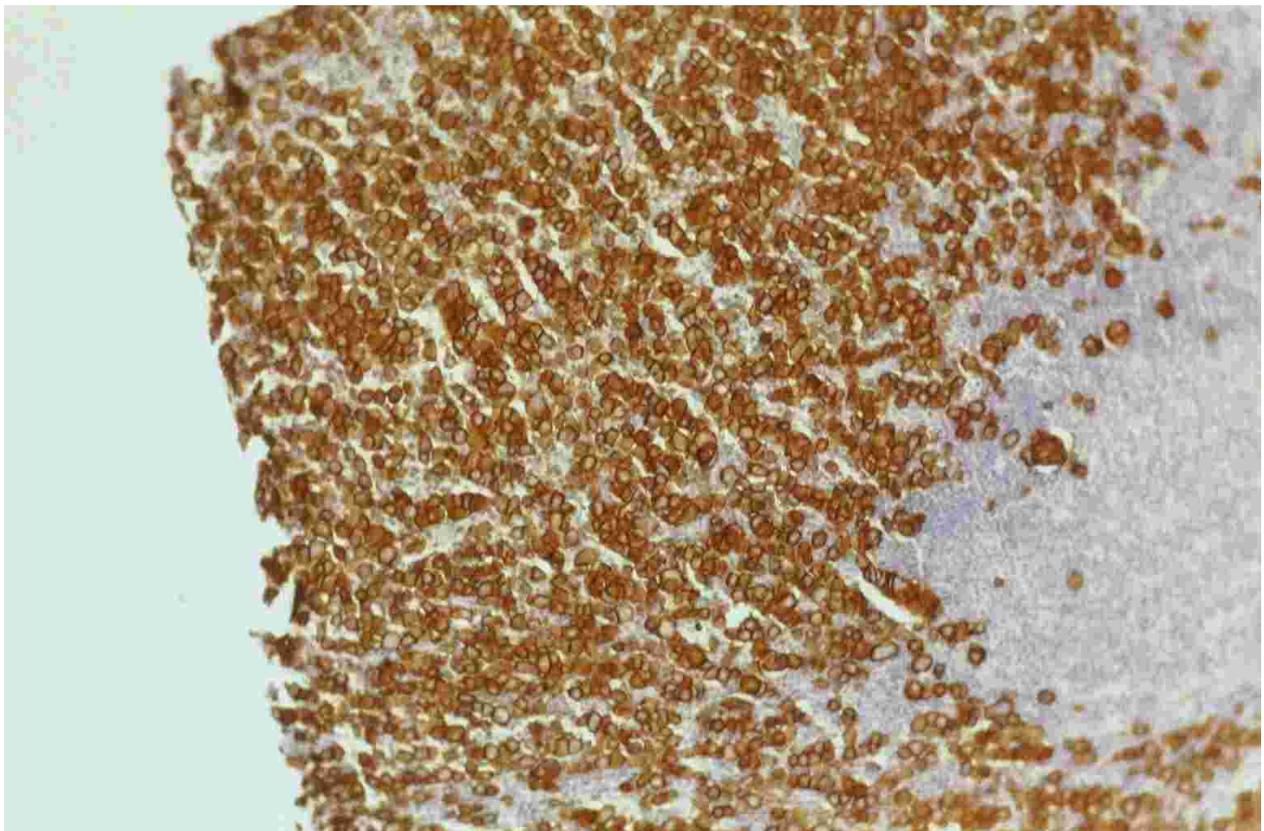


Abbildung 3

Probe von Mammagewebe nach Färbung mit Antikörper gegen Her2/neu als Positivkontrolle der Her2/neu-Färbung (100x Vergrößerung)

Die Positivkontrolle für die Färbung des Onkoprotein Bcl2 zeigt eine Anfärbung, die im ganzen Präparat homogen ist und somit eine gleichmäßige Verteilung des Antikörpers, aber auch der Nachweisreagenzien belegt (Abb. 4).

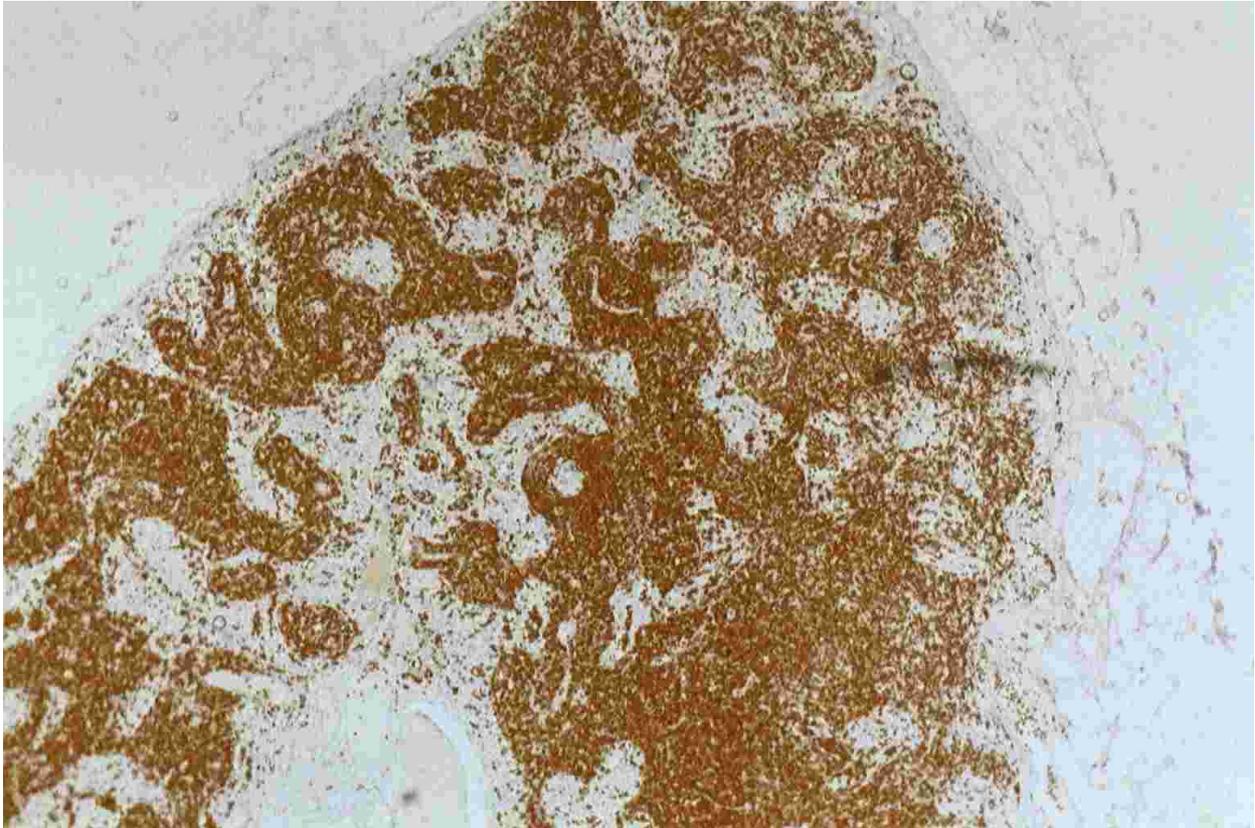


Abbildung 4

Probe von Lymphknotengewebe nach Färbung mit Antikörper gegen Bcl2 als Positivkontrolle der Bcl2-Färbung (50x Vergrößerung)

2.4 Auswertung

Die Auswertung wurde gemeinsam mit dem Pathologen Herrn Dr. G. Weirich (Pathologisches Institut der TU München) vorgenommen. Dabei wurde ein Lichtmikroskop mit einer Vergrößerung zwischen 10 und 400fach verwendet. Für beide Färbungen wurde ein Bewertungsschema festgelegt, das sowohl der Intensität der Färbung, der Verteilung der gefärbten Anteile des Tumors, als auch der Menge bzw. Fläche des gefärbten Anteils Rechnung trägt.

2.4.1 Bewertung der Bcl2-Färbung

Bei der BCL2-Färbung ergab sich folgende Einteilung, die in zwei Kategorien vorgenommen wurde.

1. Bewertung der Positivität in Relation zum vorherrschenden Intensitätsgrad, der sich an der Färbeintensität der Leukozyten orientiert
 - a. keine Färbung der Karzinomzellen oder Färbung von weniger als 30% der Tumorzellen bedeutet „Score 0“ oder „negativ“
 - b. Färbung von über 30% der Tumorzellen, wobei die Färbung gleich der Färbeintensität der Leukozyten ist, bedeutet „Score 1“ oder „moderat positiv“
 - c. Färbung von über 30% der Tumorzellen, wobei die Färbung stärker als die Färbeintensität der Leukozyten ist, bedeutet „Score 2“ oder „stark positiv“
2. es ergaben sich zwei vorherrschenden Verteilungsmuster der positiv gefärbten Karzinomzellen innerhalb des Tumors
 - a. basale Anordnung der positiv gefärbten Zellen
 - b. diffuse Anordnung der positiv gefärbten Zellen

Beispiele zur Erläuterung diese Sachverhaltes finden sich im Kapitel „Ergebnisse der immunhistochemischen Auswertung“.

Für statistische Berechnung mußten aber neue Kodierungen geschaffen werden, da einerseits manche Test nur zwei Ausprägungen einer Variable zulassen (also z.B. nur „negativ“ und „positiv“ statt „negativ“, „moderat positiv“ und „stark positiv“), andererseits aber auch die oben aufgezählten Kategorien zusammengefaßt werden müssen.

Es haben sich folgende drei Kodierungen als sinnvoll erwiesen:

1. die Positivität der Färbung wird wie in der eigentlichen immunhistochemischen Beurteilung beibehalten mit 0=negativ, 1=moderat positiv (Abk.: „p“) und 2=stark positiv (Abk.: „pp“). Diese Kodierung wird später „Färbeintensität“ genannt.
2. die zwei positiven Ausprägungen der Färbeintensität werden zu einer Gruppe zusammengefaßt, also 0=negativ, 1=positiv. Diese Kodierung wird später „Positivität“ genannt.
3. das Kriterium des unterschiedlichen Verteilungsmusters wird mit aufgenommen. So werden hier zwei neue Variablen eingeführt, die jeweils zwei Ausprägungen haben.

Die erste Gruppe B1 bezeichnet alle Tumoren, die positiv sind und eine diffuse Verteilung aufweisen, als „1“, alle anderen (also sowohl negative, als auch basal positive) als „0“.

Bei der zweiten Gruppe, B2 bekommen alle basal positiven Tumoren die Variablenausprägung „1“, alle anderen „0“.

2.4.2 Bewertung der Her2/neu-Färbung

Bei der Her2-Färbung wurde ein Schema verwandt, das einerseits die spezifische Verteilung des Her2/neu-Onkoproteins, nämlich die Expression in der Zellmembran, andererseits wie oben sowohl die Färbeintensität als auch den Prozentsatz der positiven Tumorzellen beachtet. Dabei wurde die Beurteilung der immunhistochemischen Färbung gemäß den Richtlinien der Firma Dako für die Bewertung der Her2/neu-Antikörperfärbung angewandt (Dako 2000, S.2, Alpert 1999, S. 33).

1. Score 0 oder negativ, wenn keine Färbung zu sehen ist oder weniger als 10% der Tumorzellen eine membranständige Anfärbung zeigen
2. Score 1+ oder negativ, wenn eine schwache oder kaum sichtbare Membranfärbung in mehr als 10% der Tumorzellen zu sehen ist und die Membranfärbung unvollständig ist
3. 2+ oder schwach positiv, wenn eine schwache bis moderate, aber komplette Membranfärbung in mehr als 10% der Tumorzellen zu sehen ist
4. 3+ oder stark positiv, wenn eine starke, die komplette Membran umfassende Färbung in mehr als 10% der Tumorzellen zu sehen ist.

Demgemäß kann nur eine Anfärbung der Zellmembran in ganzer Zirkumferenz zu einer positiven Bewertung führen. Eine Anfärbung des Zytoplasmas wird als unspezifische Hintergrundfärbung betrachtet und geht nicht in das Bewertungsschema ein.

2.5 Statistik

Für die statistische Auswertung wurde das Programm SPSS 10.0 verwandt. Statistische Vorüberlegungen und Berechnungen wurden zum großen Teil im Institut für medizinische Statistik und Epidemiologie (IMSE) der TU München getätigt.

Alle Daten wurden vor der Berechnung auf Vollständigkeit, Plausibilität und systematische Fehler überprüft.

Für die Selektion wichtiger Einflußgrößen wurde als nicht-parametrischer Test der Mann-Whitney-U-Test, zur Berechnung bivariater Korrelationen der Spearman-Rho-Test, der Chi-Quadrat-Test und Kreuztabellen benutzt. Mit Hilfe dieser Tests wurden hauptsächlich Berechnungen getätigt, die für den Zusammenhang des jeweiligen Onkoproteins mit pathologischen Parametern wichtig waren.

Die Untersuchung des Zusammenhangs mit klinischen Daten wurde überwiegend durch Überlebensanalysen durchgeführt. Dazu dienten die Analyse nach Kaplan-Meier und die Regressionsanalyse nach Cox. Die Berechnung der Cox-Regression beinhaltet verschiedene Möglichkeiten der Variablenselektion: diese beruhen alle darauf, die Wahrscheinlichkeit für die Aufnahme ins Modell oder den Ausschluß aus dem Modell schrittweise zu berechnen. Eine Variable wird aufgenommen, wenn das Signifikanzniveau ihres F-Werts für die Aufnahme kleiner als der Aufnahmewert ist, eine Variable wird ausgeschlossen, wenn das Signifikanzniveau größer als der Ausschlußwert ist.

Als nicht-signifikant wurden Ergebnisse auf dem Signifikanzniveau von größer gleich 0,05, als signifikant $<0,5$, als sehr signifikant $<0,01$ und als hoch signifikant $<0,001$ erachtet.

3 Ergebnisse

3.1 Ergebnisse der Untersuchung des Onkoproteins Bcl2

3.1.1 Ergebnisse der immunhistochemischen Auswertung

Für die Detektion des Onkoproteins Bcl2 standen Proben von 201 Patienten zur Verfügung. Tabelle 8 zeigt eine Übersicht über die Zusammensetzung des Patientenkollektivs.

| Epidemiologische Daten | |
|--|-----------------------------------|
| Patientenzahl | 201 |
| Männer | 144 |
| Frauen | 57 |
| Alter | 24-90 |
| Medianes Alter | 67,9 (Standardabweichung 11,7) |
| Klinische und pathologische Daten | |
| Transurethrale Resektion (TUR) | 174 |
| Zystektomie | 27 |
| Tis | 4 |
| Ta | 89 |
| T1 | 55 |
| T2 | 29 |
| T3 | 16 |
| T4 | 8 |
| benignes Gewebe gefärbt | 185 |

Tabelle 8

Übersicht über die Zusammensetzung des Patientenkollektiv nach epidemiologischen, klinischen und pathologischen Daten

Wie der Tabelle 8 zu entnehmen ist, weisen 148 Patienten einen oberflächlichen Tumor auf, bei 53 Patienten wurde die Diagnose eines muskelinvasiven Tumors gestellt.

Folgendes Diagramm (Dia. 1) zeigt eine grafische Darstellung der Verteilung der T-Stadien.

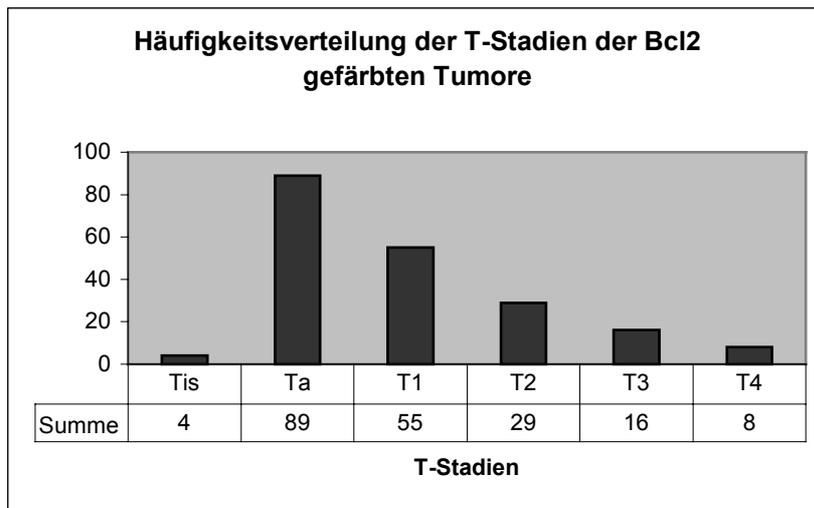


Diagramm 1

Häufigkeitsverteilung der T-Stadien der Bcl2 gefärbten Harnblasentumore von 201 Patienten

grau: Bcl2 gefärbte Tumore

Die Differenzierungsgrade der Tumoren verteilen sich wie folgt auf die T-Stadien (Dia. 2):

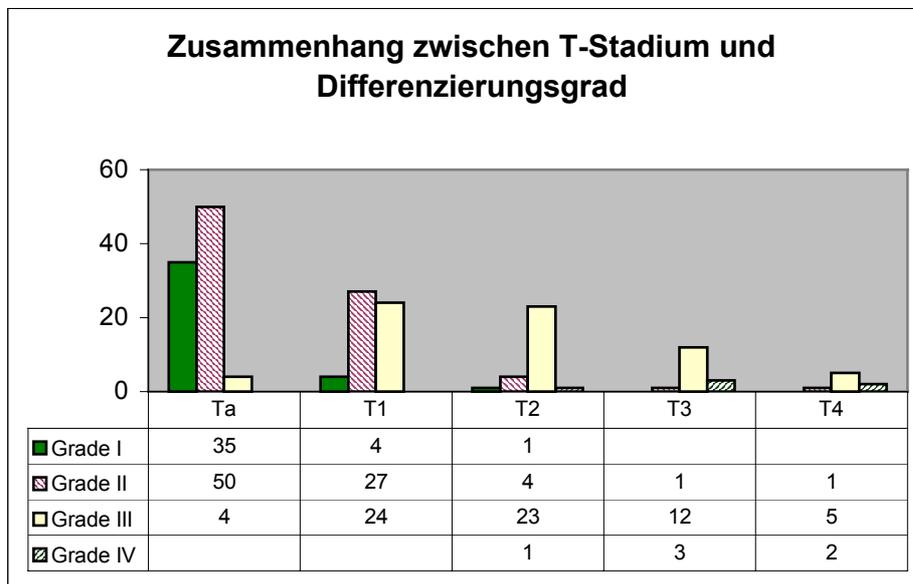


Diagramm 2

Zusammenhang zwischen T-Stadium und Differenzierungsgrad der Bcl2 gefärbten Tumore von 201 Patienten mit Harnblasentumor

grün: Grad I, rot gestreift: Grad II, gelb: Grad III, dunkelgrün gestreift: Grad IV

Insgesamt wurden 101 (52,2%) der Tumoren als negativ, 65 (32,3%) als moderat positiv und 35 (17,4%) als stark positiv bewertet. Eine positive Färbung zeigte sich als Färbung des Zytoplasmas, aber auch des Kerns.

Wie oben beschrieben, zeichneten sich bei der mikroskopischen Begutachtung der Präparate zwei vorherrschende Muster ab, wie sich die positiv gefärbten Zellen anordnen.

Entweder waren vorherrschend die basalen Zellschichten gefärbt, also die dem Lumen abgewandte Seite. Das trat meist bei oberflächlichen Tumoren auf. Bei invasiven Tumoren wurde die Bewertung „basal“ vergeben, wenn eine definierte Bande stärker positiv gefärbter Zellen erkennbar war, die vorherrschend das Bild bestimmte.

Das zweite Verteilungsmuster der positiv gefärbten Zellen wurde mit dem Attribut „diffus“ beschrieben, da eine geordnete Verteilung nicht mehr ersichtlich war. Die Zellen innerhalb des Tumors waren entweder alle gefärbt oder positiv reagierende Zellen waren über die ganze Tumormasse verteilt.

Diese Unterteilung der positiv gefärbten Zellen hat sich, wie später die statistische Analyse bezüglich klinischer Parameter zeigt, als ausgesprochen wichtig erwiesen.

Unterteilt man die eine Überexpression des Bcl2-Onkoproteins aufweisenden Tumoren nach diesem Schema ein, ergibt sich folgendes Diagramm (Dia. 3):

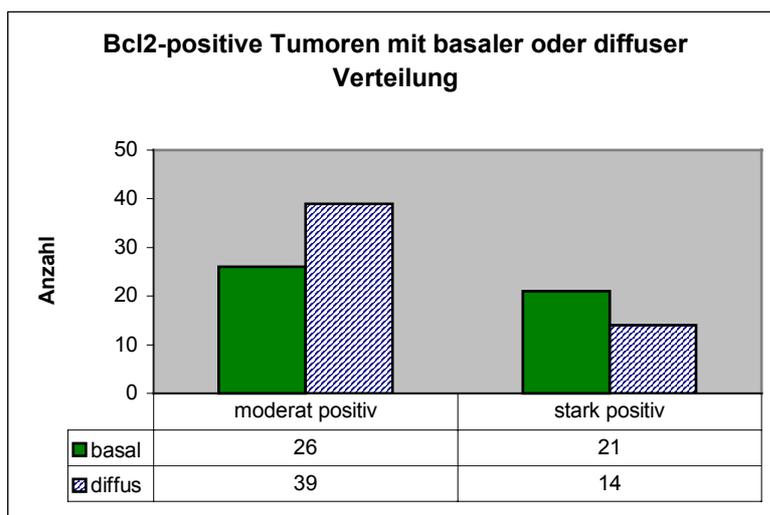


Diagramm 3

Häufigkeit der beiden Verteilungsmuster der Bcl2 Färbung aufgeteilt nach der Färbeintensität bei 100 Patienten mit Bcl2-positivem Harnblasentumor

grün: Bcl2-positive Färbung mit basaler Verteilung, blau gestreift: Bcl2-positive Färbung mit diffuser Verteilung

Die folgenden Bilder veranschaulichen diese beiden Kategorien:

Im ersten Bild (Abb. 5) sieht man einerseits die stark positive Färbung der Tumorzellen, andererseits erkennt man die dominante basale Verteilung (gestrichelter Pfeil). Ebenso sind die im Stroma liegenden, positiv gefärbten Leukozyten zu sehen, die bei jedem Präparat als Positivkontrolle erachtet wurden (Pfeil). Es handelt sich um einen Tumor mit der Staging-Formel TaG2.

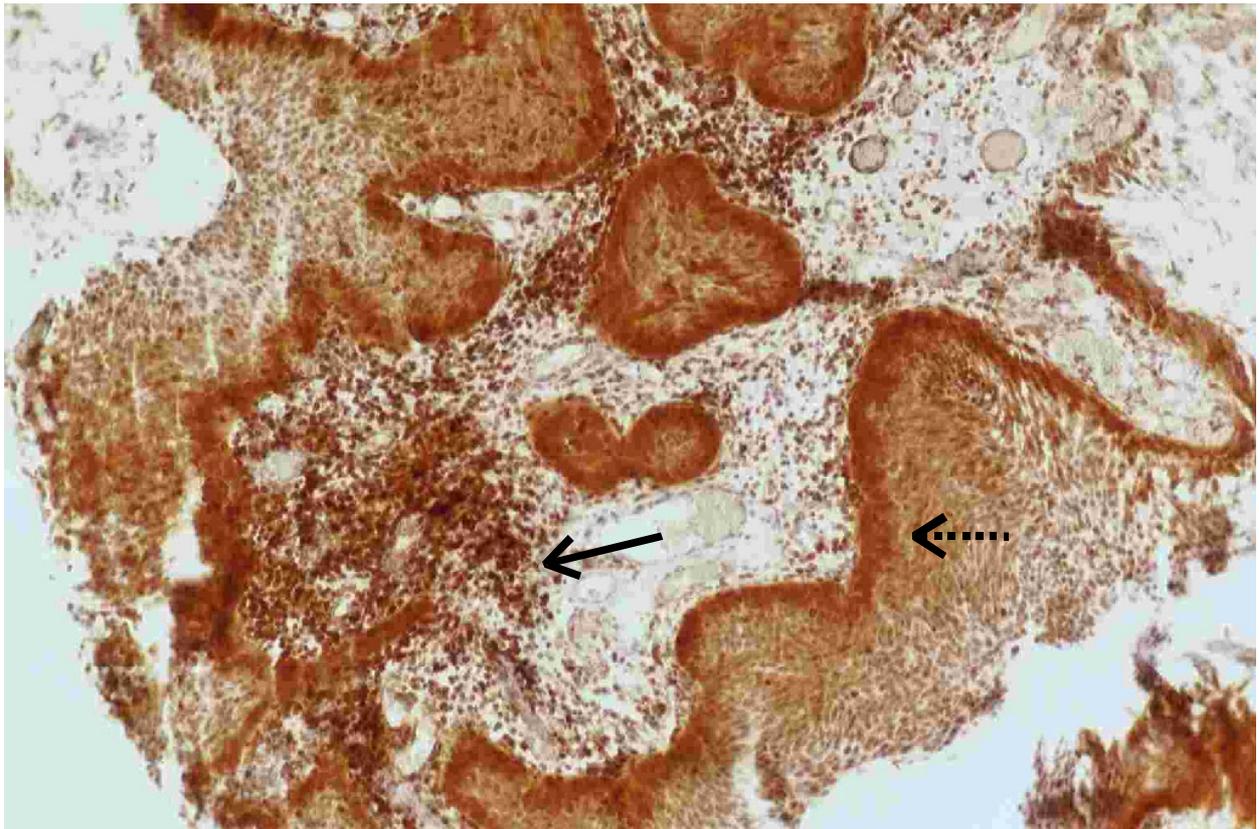


Abbildung 5

Blasentumor nach Bcl2-Antikörper-Färbung, hier: stark positiver Harnblasentumor mit basaler Verteilung der Bcl2-spezifischen Färbung (100x Vergrößerung)

gestrichelter Pfeil: basale Verteilung der Bcl2-positiven Tumorzellen, Pfeil: Leukozyten

Im zweiten Bild (Abb. 6) reagiert der Großteil der Tumorzellen stark positiv. Eine definierte Bande ist allerdings nicht mehr zu erkennen. Also wurde dieser Tumor (T3G3) als stark positiv und diffus bewertet.

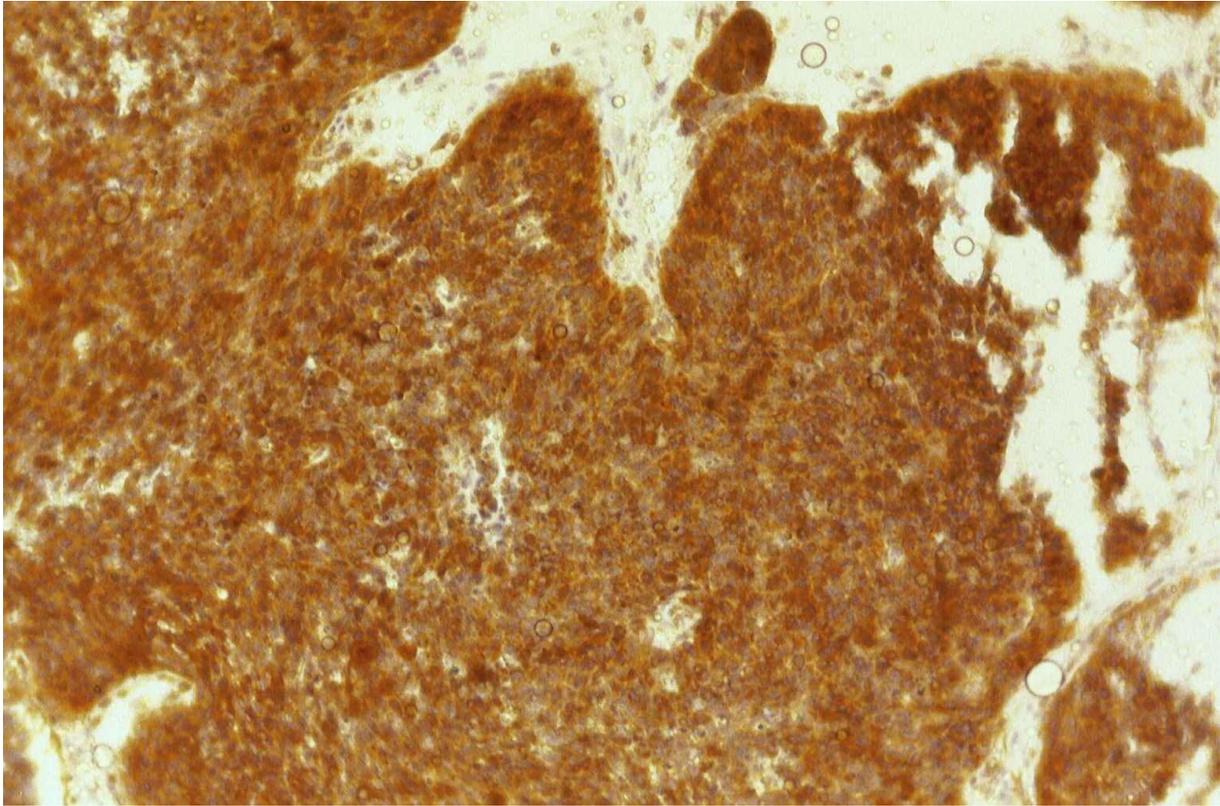


Abbildung 6

Blasentumor nach Bcl2-Antikörper-Färbung, hier: stark positiver Tumor mit diffuser Anordnung der Bcl2-spezifischen Färbung (200x Vergrößerung)

Waren weniger als 30% der Tumorzellen positiv gefärbt, wurde der Tumor als Bcl2-negativ bewertet. Eine Voraussetzung dieser Bewertung war allerdings, daß die interne Positivkontrolle, die spezifische und homogene Anfärbung der Leukozyten, im ganzen Präparat validiert werden konnte. War dies nicht der Fall, mußte davon ausgegangen werden, daß die immunhistochemische Färbung nicht funktioniert hat und somit mußte dieser Schnitt erneut gefärbt werden.

Im nächsten Bild (Abb. 7) ist der Fall eines Bcl2-negativen Tumors mit positiver interner Kontrolle zu sehen. Der Pfeil zeigt eine entzündliche Reaktion mit Leukozyteninfiltrat. Der gestrichelte Pfeil zeigt positiv reagierende Leukozyten.

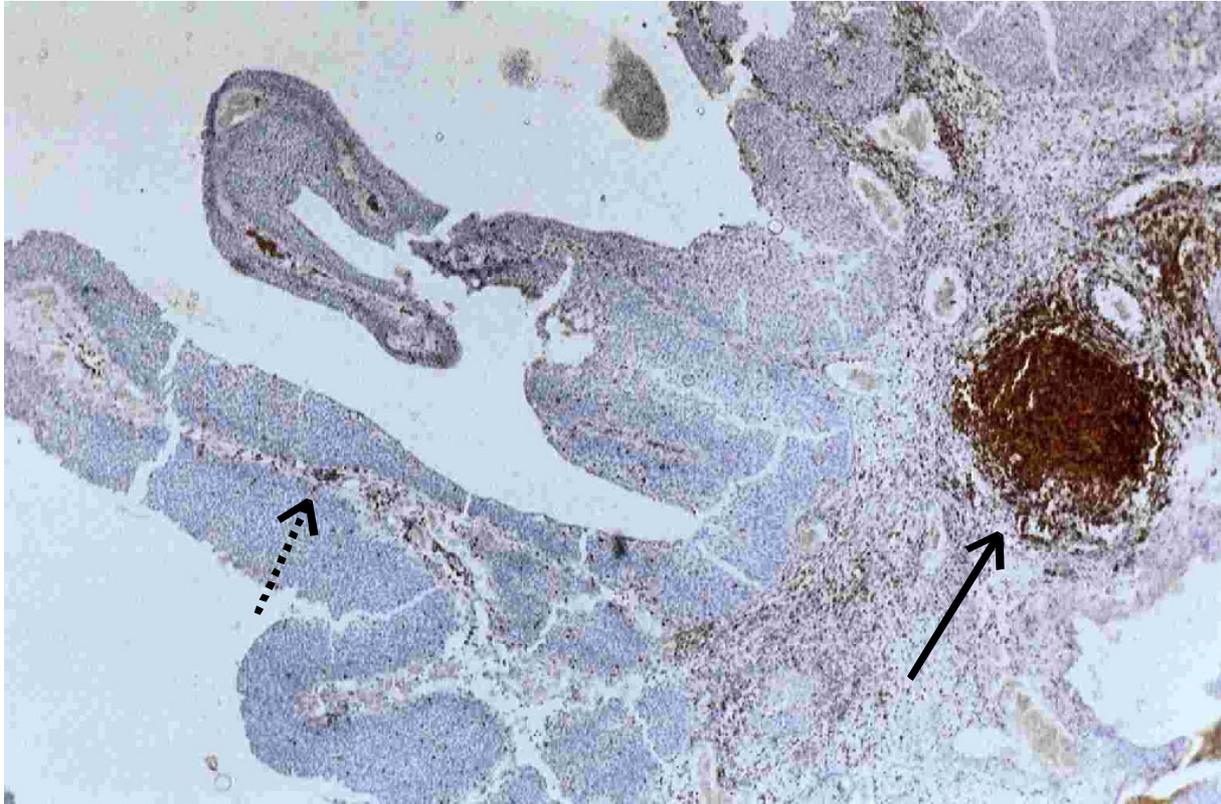


Abbildung 7

Blasentumor nach Bcl2-Antikörper-Färbung, hier: Bcl2-negativer Blasentumor mit entzündlicher Reaktion (50x Vergrößerung)

Pfeile: Leukozyten im Stroma

3.1.2 Zusammenhang mit pathologischen Parametern

Als pathologische Parameter werden hier das T-Stadium und der Differenzierungsgrad verwendet. Der Lymphknotenstatus (N-Status) und das Vorhandensein von Fernmetastasen (M-Status) konnten nicht berücksichtigt werden, da der pathologische Lymphknotenstatus nur bei insgesamt 27 Patienten erhoben wurde. Das war deswegen der Fall, da nur diese 27 Patienten (13,4%) durch eine Zystektomie behandelt wurden. Nur bei Zystektomien werden auch Lymphknoten zur histologischen Untersuchung mit entnommen. Die restlichen 174 Patienten (86,6%) wurden transurethral reseziert, d.h. ein Lymphknotenstaging entfällt.

Aufgrund der niedrigen Fallzahl (n=4) wurden cis-Tumoren nicht mit in die Bewertung aufgenommen.

3.1.2.1 Korrelation zwischen der Bcl2-Überexpression und dem T-Stadium

Es besteht ein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen T-Stadium und Bcl2-Überexpression. Dieser Zusammenhang ist auf dem Niveau von $<0,05$ signifikant (siehe Diagramm 4).

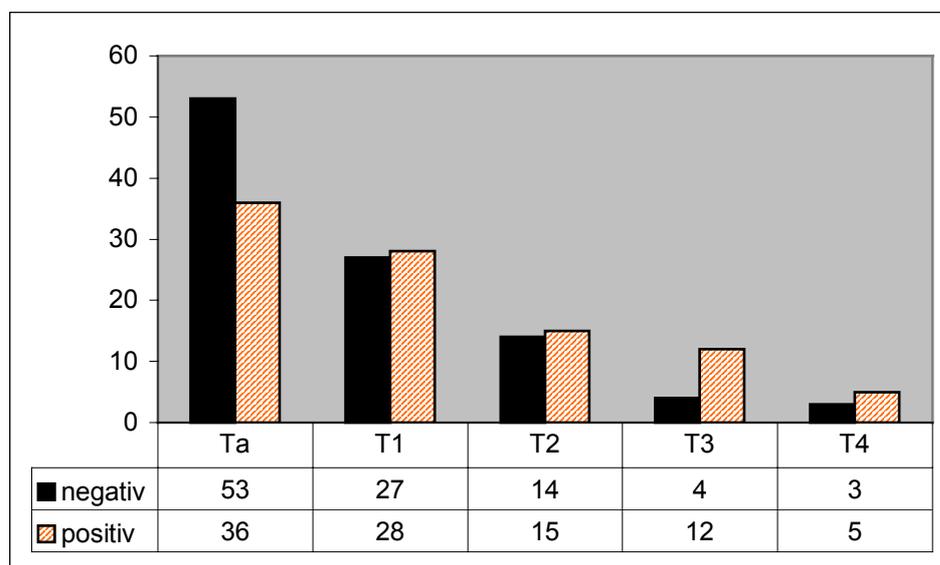


Diagramm 4

Zusammenhang zwischen T-Stadium und Positivität der Bcl2-Färbung bei 197 Patienten mit Harnblasentumor; Mann-Whitney-Test $p=0,014$

schwarz: Bcl2-negative Färbung, orange: Bcl2-positive Färbung

Es besteht ein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen der immunhistochemischen Färbeintensität (d.h. Unterteilung der Färbung in Bcl2-negative, moderat positive und stark positive Tumoren) und dem T-Stadium.

Das unten stehende Diagramm (Dia. 5) zeigt den Zusammenhang zwischen dem T-Stadium und der Färbeintensität, die sich in den Kategorien negativ, moderat positiv und stark positiv widerspiegelt.

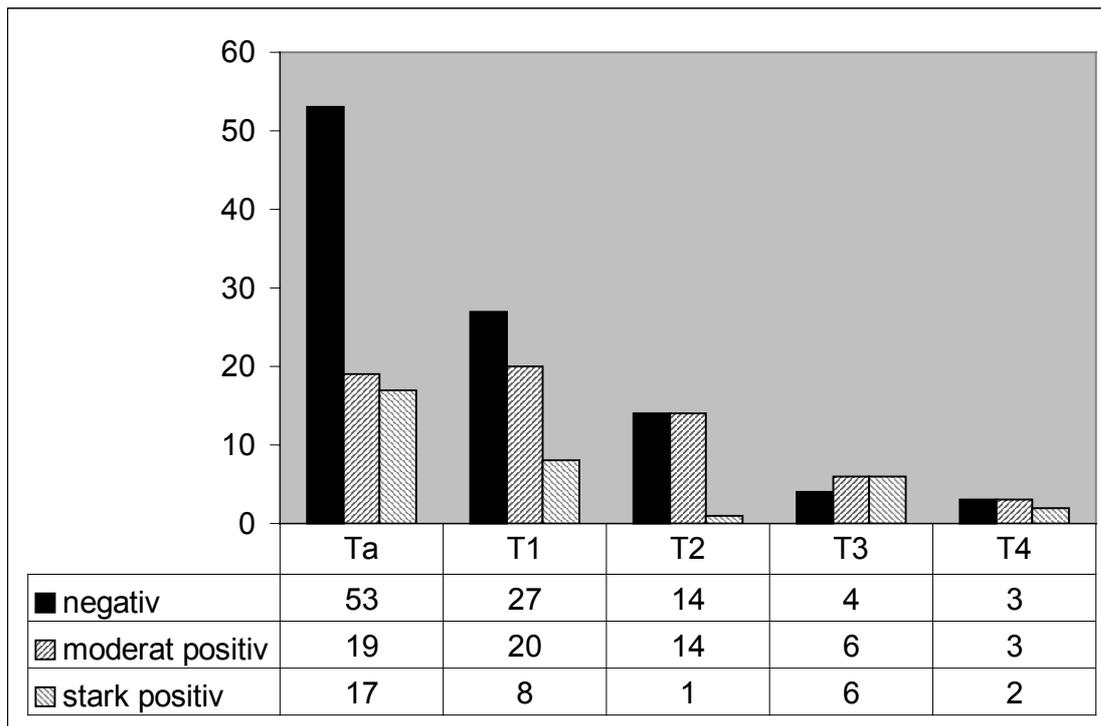


Diagramm 5

Zusammenhang zwischen T-Stadium und Färbeintensität der Bcl2-Färbung bei 197 Patienten mit Harnblasentumor (Chi-Quadrat-Test, $p=0,024$)

schwarz: Bcl2-negative, lila: moderat starke Bcl2-Färbung, orange: stark positive Bcl2-Färbung

Um dem klinischen Verhalten der Harnblasentumoren Rechnung zu tragen, wurde eine Untergliederung des T-Stadiums vorgenommen. Dafür wurden in die vier Untergruppen Ta, Ta/T1, T1/T2/T3/T4 und T2/T3/T4 untergliedert.

Diagramm 6 und 7 zeigen jeweils die Bcl2-Expression in den vier Untergruppen zuerst unter Berücksichtigung der Positivität der Färbung allein, also „positive“ oder „negative“ Färbung, dann zusätzlich unter Berücksichtigung der Verteilung, also „negativ“, „positiv und basale Verteilung“ und „positiv und diffuse Verteilung“.

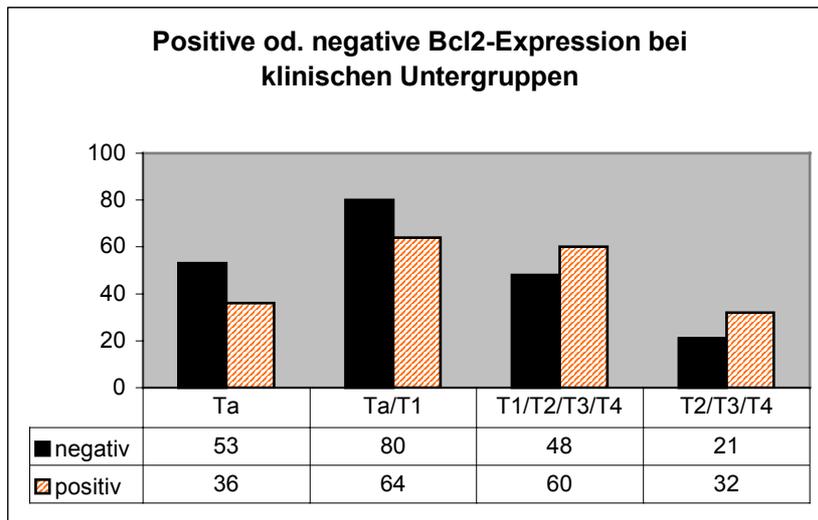


Diagramm 6

positive oder negative Färbung von Bcl2 innerhalb der Untergruppen Ta, Ta /T1, T1, T1/T2/T3/T4 und T2/T3/T4 bei 197 Patienten mit Harnblasentumor

Chi-Quadrat: Ta gegenüber T1/T2/T3/T4 $p=0,035$, Ta/1 gegenüber T2/T3/T4 $p=0,047$

schwarz: negativ, orange gestreift: positiv

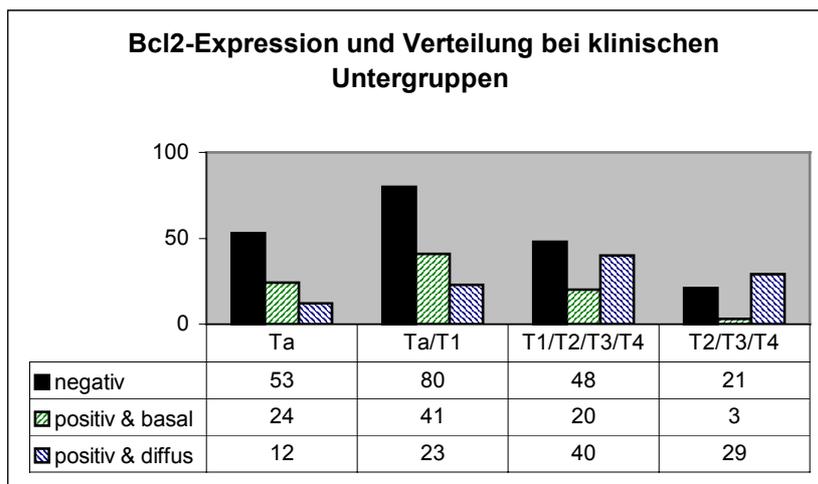


Diagramm 7

positive oder negative Färbung von Bcl2 innerhalb der Untergruppen Ta, Ta /T1, T1, T1/T2/T3/T4 und T2/T3/T4 unter Berücksichtigung des Verteilungsmusters bei 197 Patienten mit Harnblasentumor

Chi-Quadrat: Ta gegenüber T1/T2/T3/T4 $p=0,001$, Ta/1 gegenüber T2/T3/T4 $p<0,001$

schwarz: negativ, grün: positiv und basal verteilt, blau: positiv und diffus verteilt

Innerhalb dieser Untergliederung soll jeweils die Gruppe der Ta-Tumoren den übrigen Tumoren, also alle Tumoren mit T-Stadium T1, T2, T3 und T4 gegenübergestellt werden. Ebenso wird die Gruppe der Ta- und T1-Tumoren mit den Tumoren der höheren Stadien (T2, T3, T4) verglichen.

Sowohl in der Gruppe der Ta-Tumoren gegenüber den T1/T2/T3/T4-Tumoren, als auch in der Gruppe der Ta/T1-Tumoren gegenüber den höheren Stadien ist der Zusammenhang zwischen T-Stadium und Bcl2-Färbung statistisch signifikant.

Der Zusammenhang zwischen Bcl2-Expression mit der Aufgliederung in negative Tumore und positive Tumore mit basaler und diffuser Verteilung (wie in Diagramm 7 dargestellt) und dem T-Stadium ist sowohl in der Gruppe der Ta-Tumoren gegenüber den T1/T2/T3/T4-Tumoren, als auch in der Gruppe der Ta/T1-Tumoren statistisch signifikant.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass ein eindeutiger, statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen der Bcl2-Expression und dem T-Stadium besteht. Das trifft sowohl für die Aufteilung der Bcl2-Expression in die verschiedenen Kategorien der histopathologischen Auswertung (Positivität, Färbeintensität und Verteilungsmuster) als auch für die Untergliederung des T-Stadiums (alle T-Stadien oder oberflächliche gegenüber muskelinvasive Tumor) zu.

3.1.2.2 Korrelation zwischen der Bcl2-Überexpression und dem Differenzierungsgrad

Führt man die gleiche Berechnung auch für den Zusammenhang zwischen Differenzierungsgrad und Positivität bzw. Färbeintensität durch, ergibt sich auch hier ein jeweils auf dem Niveau von 0,01 signifikanter Zusammenhang (Chi-Quadrat-Test, $p < 0,01$). Dies trifft für die Unterteilung der Bcl2-Expression in positive und negative Tumore (Positivität der Bcl2-Färbung), in negative, moderat positive und stark positive Tumore (Färbeintensität der Färbung) und in negative, basal-positive und diffus-positive Tumore (Verteilung der Bcl2-Färbung) zu.

Exemplarisch wird der Zusammenhang zwischen Differenzierungsgrad und der Positivität, d.h. unter Betrachtung der Ausprägung „negativ“ und „positiv“ in dem folgenden Diagramm (Dia. 8) dargestellt.

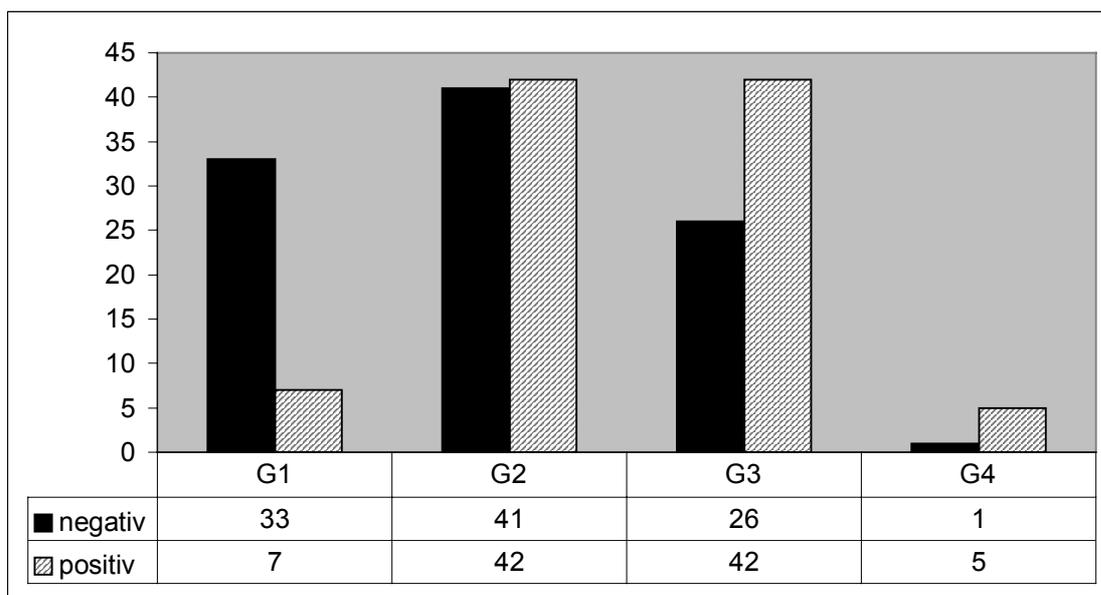


Diagramm 8

Zusammenhang zwischen histopathologischem Differenzierungsgrad und Positivität der Bcl2-Färbung bei 197 Patienten mit Harnblasentumor

Chi-Quadrat-Test $p < 0,001$

schwarz: Bcl2-negative Färbung, orange: Bcl2-positive Färbung

3.1.2.3 Korrelation zwischen Bcl2-Überexpression und anderen pathologischen Parametern

Weitere pathologische Bewertungskriterien sind die Größe des Tumors (angegeben in Gramm) und die Tumorzahl.

Zwischen Tumorgröße bzw. der Tumorzahl und der Positivität bzw. der Färbeintensität ergab sich kein signifikanter Zusammenhang (Chi-Quadrat-Test: $p=0,317$ bzw. $p=0,642$).

3.1.3 Korrelation mit klinischen Parametern

Zu den wichtigsten klinischen Vorkommnissen einer Tumorerkrankung zählen das Auftreten eines Rezidives, eines Progresses oder das krankheitsbedingte Versterben.

Das Rezidiv ist gekennzeichnet durch das Wiederauftreten eines Tumors in der Blase bei vorausgehender Tumorfreiheit (durch die eigentliche Operation oder folgende Nachresektion). Die Rezidivzahl gibt die Anzahl aller folgenden Rezidive an.

Der pathologische Progreß bezeichnet das Auftreten eines jetzt invasiven Tumors, nachdem der vorausgehende Tumor lediglich oberflächlich gewachsen ist.

Nimmt man noch zwei weitere Kriterien hinzu, um das Fortschreiten der Krankheit zu beschreiben, erhält man den eigentlichen klinischen Progreß der Tumorerkrankung. In diesen fließen noch das Auftreten von Metastasen und das tumorspezifische Versterben mit ein.

Als Zeitraum für die rezidivfreie und progreßfreie Zeit oder das Überleben wird jeweils die Zeitspanne zwischen der Operation und dem Eintreten des jeweiligen Ereignisses gewählt. Verstirbt der Patient nicht oder nicht tumorbedingt, so gilt das Ende des Beobachtungszeitraums als Endpunkt und der Patient wird als „nicht am Blasentumor verstorben“ klassifiziert.

3.1.3.1 Korrelation zwischen Bcl2-Überexpression und Rezidivfreiheit

3.1.3.1.1 Korrelation der Rezidivneigung mit T-Stadium und Differenzierungsgrad

Bei 88 der 201 Patienten (43,7%) trat nach der eigentlichen Operation wieder ein Tumor auf. Das zeitliche Auftreten eines neuen Tumors ist dabei sowohl vom T-Stadium als auch dem Differenzierungsgrad des ursprünglichen Tumors abhängig (Log-Rank-Test, $p=0,0024$ bzw. $p=0,0330$).

3.1.3.1.2 Korrelation der Rezidivneigung mit der Bcl-Überexpression

Das Aufweisen einer immunhistochemisch nachgewiesenen Überexpression des Onkoproteins Bcl2 führt zu keiner veränderten rezidivfreien Zeit (Log-Rank-Test, $p=0,960$).

Diagramm 9 zeigt ungefähr deckungsgleiche Kurven für Bcl2-positive und Bcl2-negative Tumore; eine Risikoerhöhung durch eine Bcl2-Expression besteht nicht.

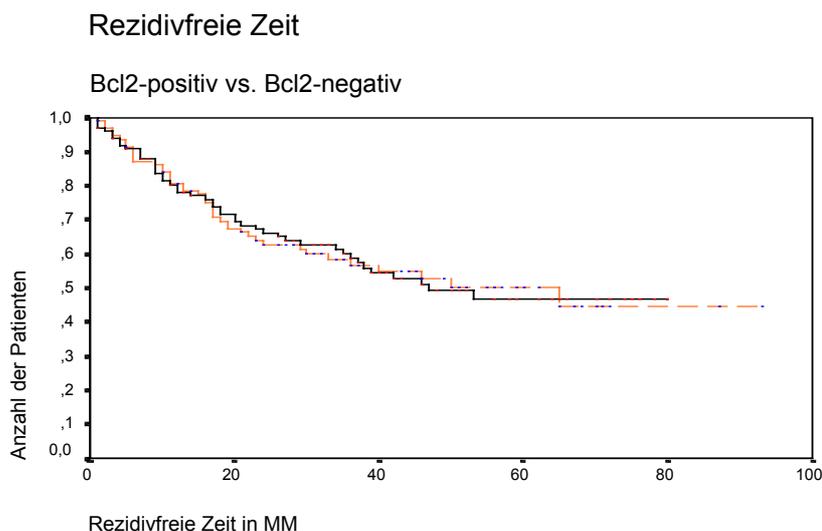


Diagramm 9

Rezidivfreie Zeit von 197 Blasentumorpatienten aufgeteilt nach der immunhistochemischen Positivität für Bcl2

Kaplan-Meier Kurve, Log-Rank-Test, $p=0,960$

Orange, gestrichelte Linie: Bcl2-positive Tumore, schwarze Linie: Bcl2-negative Tumore

Unterteilt man die Bcl2-positiven Tumoren, wie unter „Bewertung der Bcl2-Färbung“ beschrieben, in zwei Gruppen, die jeweils noch das Verteilungsmuster (basal oder diffus) berücksichtigen, zeigt sich auch für die Gruppen „positiv und diffus“ oder „positiv und basal“

kein signifikanter Unterschied zu der rezidivfreien Zeit Bcl2-negativer Tumoren (Log-Rank-Test, $p=0,292$ bzw. „positiv und basal“ $p=0,320$).

3.1.3.1.3 Regressionsanalyse für Rezidivfreiheit und der Bcl2-Expression

Der wichtigste Test, um unabhängige, prognostische Werte zu berechnen, ist die Regressionsanalyse nach Cox. Mit Hilfe dieser Methode kann man in die Berechnung mehrere Einflußvariablen mit einbeziehen.

Als Zielvariablen in der Cox-Regression gilt einerseits die Positivität der Färbung, also die Gruppe der Bcl2-positiven Tumoren gegenüber den Bcl2-negativen Tumoren, andererseits die Bcl2-Expression unter Beachtung des Verteilungsmusters, d.h. die Tumore mit diffusem Verteilungsmuster gegenüber den übrigen Tumoren.

In der Analyse nach Cox sollen jeweils drei Berechnungen vorgenommen werden:

1. in der ersten Berechnung werden mehrere Einflußgrößen gewählt, von denen ein Einfluß bekannt ist: hierzu gehören die pathologischen Parameter T-Stadium und Grad und die epidemiologischen Gegebenheiten wie Alter, Geschlecht, Risikofaktoren (umfasst Raucher, ehemalige Raucher und Exposition gegenüber bekannten Kanzerogenen)
2. in der zweiten Berechnung wird das T-Stadium weggelassen. Dies vermindert den starken Einfluss des T-Stadiums auf die Zielparameter und ermöglicht die Berechnung der Cox-Regression innerhalb der Untergruppen des T-Stadiums.
3. in der dritten Berechnung werden nur Parameter gewählt, die unabhängig von pathologischen Parametern sind, da dies die positive Assoziation von Bcl2 und höherem T-Stadium und Grad außer Acht läßt und es somit ermöglicht, unabhängige Prognosekriterien zu schaffen. Es wird also sowohl T-Stadium als auch Differenzierungsgrad weggelassen.

Für die statistischen Berechnungen innerhalb der Untergruppen der T-Stadien werden nur die letzten beiden Berechnungsmodalitäten verwendet, da hier nach dem T-Stadium gruppiert wurde und somit das T-Stadium nicht als eigener Parameter in die Berechnung mit aufgenommen werden kann.

Eine Rezidivprophylaxe mittels Chemotherapie wurde nur bei 11,2% der Patienten durchgeführt, so daß die Aufnahme dieses Parameters als nicht sinnvoll erscheint. Bezieht man diesen

Faktor trotzdem mit ein, zeigt sich sogar ein gegen den Nutzen der Chemoprophylaxe sprechender Effekt, was möglicherweise dadurch erklärt werden kann, daß in unserem Patientenkollektiv nur Patienten mit sehr hohem Risiko eine Prophylaxe erhalten haben und auf Grund dieses sehr hohen Risikos trotz Therapie ein Rezidiv bekommen haben.

Die multivariate Analyse nach Cox bestätigt in den drei Berechnungsmodalitäten die mangelnde Korrelation von Bcl2 mit der Rezidivfreiheit (jeweils $p > 0,05$).

3.1.3.1.4 Korrelation der Rezidivneigung mit der Bcl2-Überexpression bei Untergruppen der T-Stadien

Wie oben beschrieben, wurde noch eine Untergliederung des T-Stadiums vorgenommen, um so dem klinischen Verhalten der Harnblasentumoren Rechnung zu tragen. Es wurde untergliedert in Ta, Ta/T1, T1/T2/T3/T4 und T2/T3/T4.

Es konnte bei der Analyse des Risikos für das frühzeitige Wiederauftreten der Harnblasenkarzinome kein statistisch signifikanter Einfluss der Bcl2-Überexpression in einer der vier Untergruppen gefunden werden (Log-Rank-Test: jeweils $p > 0,05$).

Auch in der Berechnung der unabhängigen Parameter für die Vorhersage eines Rezidives hat die oben genannte Aufteilung keine prognostische Relevanz. Innerhalb keiner T-Stadien-Untergruppe zeigt die Bcl2-Expression einen Einfluss in der Cox-Regression. Dies trifft für die oben beschriebenen Berechnungsmodalitäten zu (vgl. Kapitel 3.1.3.1.3) und schließt sowohl die Untersuchung der Bcl2-positiven gegenüber den Bcl2-negativen Tumoren als auch die Berücksichtigung des Verteilungsmusters ein.

3.1.3.1.5 Zusammenfassung des Einflusses von Bcl2 auf die Rezidivfreiheit

Zusammengefasst ergab sich keine Korrelation der Bcl2-Überexpression mit der Rezidivneigung der untersuchten Tumoren.

So zeigte sich weder in der Überlebensanalyse nach Kaplan-Meier ein statistisch signifikanter Einfluss von Bcl2 auf das zeitlich frühere Auftreten eines Rezidives noch konnte sich die Färbung von Bcl2 als unabhängiger Prognosefaktor in der Regressionsanalyse nach Cox etablieren.

3.1.3.2 Korrelation zwischen Bcl2-Überexpression und dem Auftreten eines pathologischen Progresses

Ein Fortschreiten des Tumors im Sinne einer Zunahme der Infiltrationstiefe wurde bei 13 Patienten (6,6%) beobachtet. Der pathologische Progreß beschreibt ein Ereignis, bei dem ein oberflächlicher Tumor (Ta und T1) bei einem späteren Rezidiv in einen muskelinvasiven Tumor (>T2) übergeht. Dieser pathologische Progreß wird gegen den eigentlichen Progreß der Harnblasentumorerkrankung abgegrenzt, da hier eine Verschlechterung der Tumorerkrankung einerseits durch die Entwicklung eines muskelinvasiven Tumors, andererseits durch das Auftreten von Metastasen oder durch das krankheitsbedingte Versterben eintreten kann.

3.1.3.2.1 Korrelation des Auftreten eines pathologischen Progresses mit der Bcl-Überexpression

Von den 13 Patienten mit rein pathologischem Progreß wiesen 9 (69,2%) eine Bcl2-Überexpression auf. Folgendes Diagramm (Dia. 10) zeigt die Abhängigkeit des Auftreten eines pathologischen Progresses von der Positivität der Tumoren in Kombination mit dem jeweiligen Verteilungsmusters.

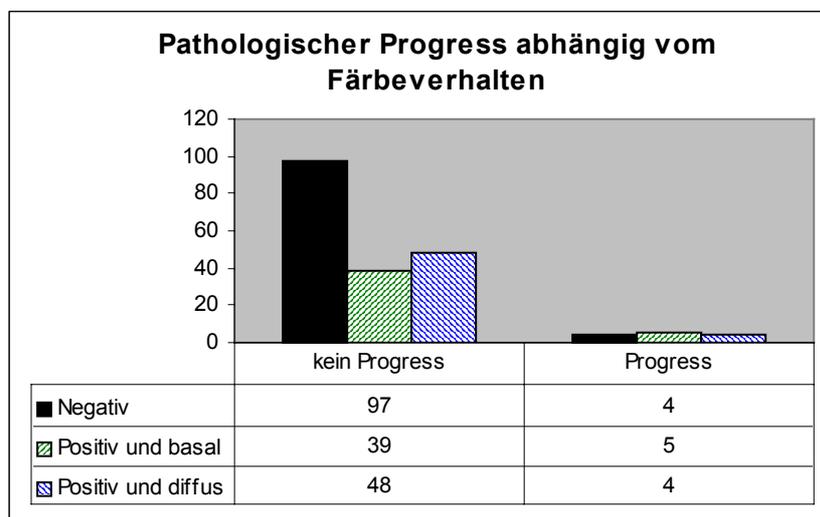


Diagramm 10

Pathologischer Progreß abhängig vom Färbeverhalten und der Verteilung der Bcl2-Färbung bei 197 Patienten mit Harnblasentumor

schwarz: negative Bcl2-Färbung, grün: positive Bcl2-Färbung und basales Verteilungsmuster, blau: positive Bcl2-Färbung und diffuses Verteilungsmuster

Dabei war das Auftreten eines pathologischen Progresses bei diesen Patienten statistisch nicht abhängig vom Aufweisen einer Bcl2-Überexpression. Ein Unterschied zwischen Bcl2-negativen und Bcl2-positiven Tumoren war nicht signifikant (für Positivität: Log-Rank-Test $p=0,0926$, für Färbeintensität: $p=0,231$).

Diagramm 11 zeigt diesen Zusammenhang:

die beiden Kurven zeigen eine zu geringe Differenz, als daß von einer Erhöhung des Risikos für einen pathologischen Progreß durch die Überexpression von Bcl2 ausgegangen werden kann.

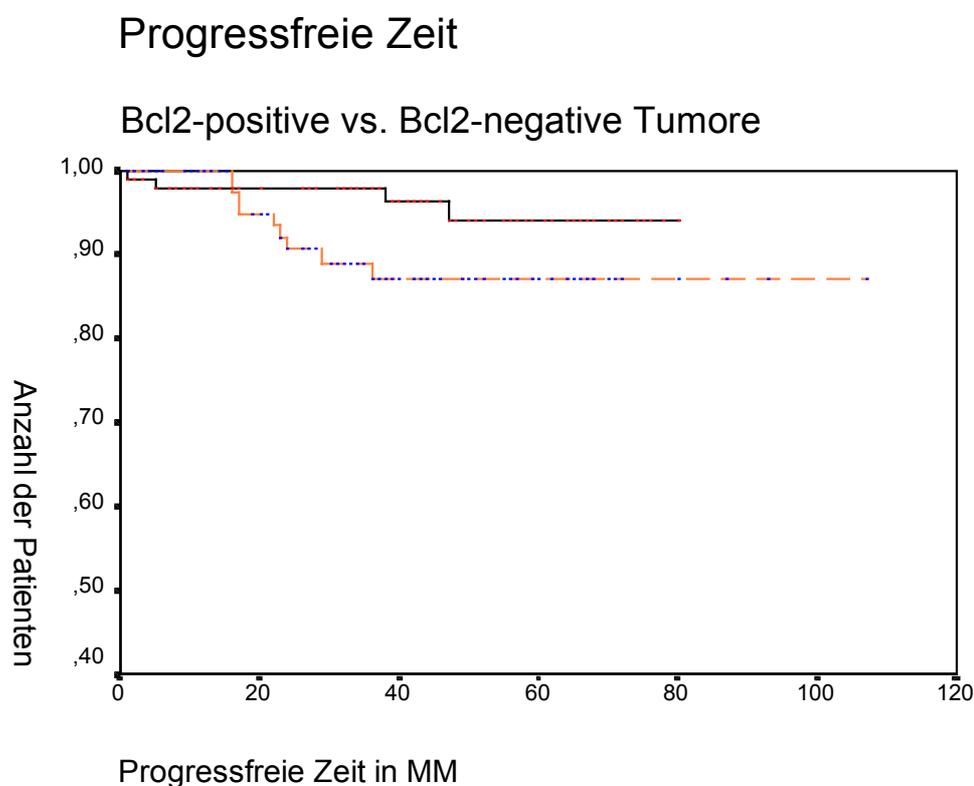


Diagramm 11

Progressfreie Zeit von 197 Blasen tumorpatienten aufgeteilt nach der immunhistochemischen Positivität für Bcl2

Kaplan-Meier-Kurve (pathologischer Progreß), Log-Rank-Test: $p=0,0926$

Orange, gestrichelte Linie: Bcl2-positive Tumore, schwarze Linie: Bcl2-negative Tumore

Auch die sonst wichtige diffuse Verteilung der Bcl2-positiven Tumoren nimmt auf die progressfreie Zeit (pathologischer Progress) keinen signifikanten Einfluß (für diffuses bzw. basales Verteilungsmuster Log-Rank-Test $p=0,4131$ bzw. $p=0,2442$). Folgendes Diagramm (Dia. 12) zeigt einen geringen, aber nicht signifikanten Einfluß des diffusen Färbeverhaltens auf die progressfreie Zeit.

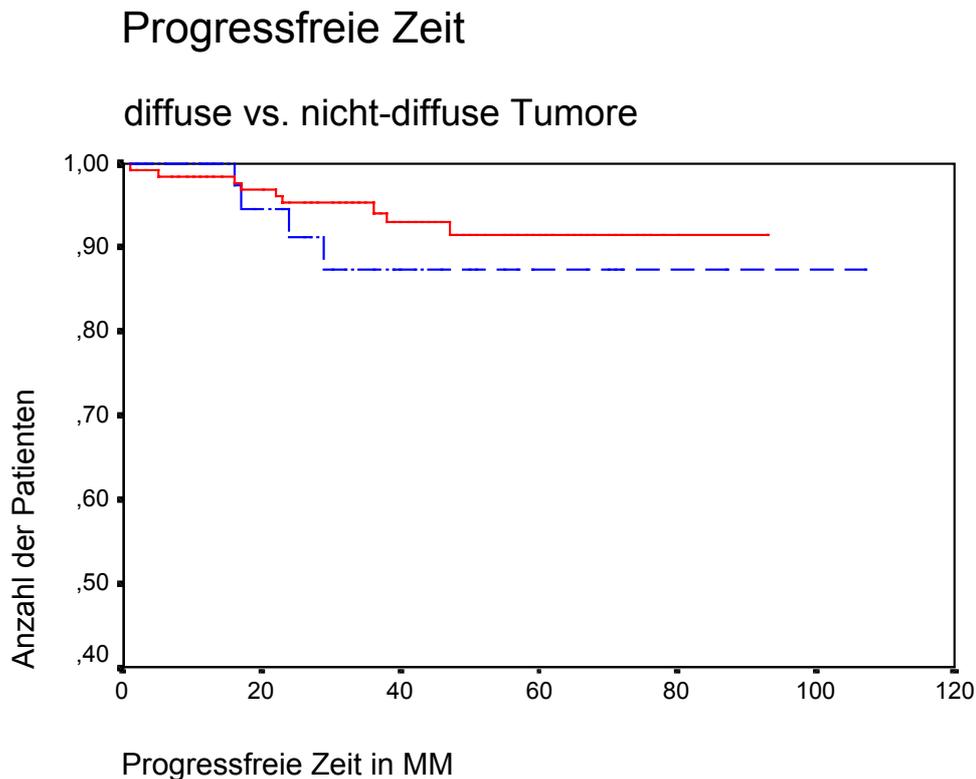


Diagramm 12

Progressfreie Zeit von 197 Blasen-Tumorpatienten aufgeteilt nach der immunhistochemischen Positivität für Bcl2 in Abhängigkeit des Verteilungsmusters

Kaplan-Meier-Kurve (pathologischer Progress), Log-Rank-Test: $p=0,4131$

blaue, gestrichelte Linie: positive und diffuse Tumore, rote Linie: nicht diffuse Tumore

Innerhalb keiner der Untergruppen der T-Stadien zeigt sich ein Einfluss der Bcl2-Überexpression in der Überlebensanalyse nach Kaplan-Meier.

3.1.3.2.2 Regressionsanalyse für das Auftreten eines pathologischen Progresses und der Bcl2-Expression

Zur Ermittlung eines möglichen prognostischen Wertes dient hier wieder die Regressionsanalyse nach Cox. Keiner der möglichen Faktoren (T-Stadium, Grade, Alter, Geschlecht, Risikofaktoren oder Bcl2-Überexpression) hat einen statistisch wertbaren Einfluß (für Positivität $p=0,096$, für Färbeintensität $p=0,161$).

Ebenfalls kann sich die Bcl2-Überexpression in keiner der Untergruppen der T-Stadien als unabhängiger Prognosefaktor bezüglich des Auftretens eines pathologischen Progresses etablieren.

3.1.3.2.3 Zusammenfassung des Einflusses von Bcl2 auf das Auftreten eines pathologischen Progresses

Zusammengefasst werden kann gesagt werden, dass die Expression von Bcl2 keinen Einfluss auf das Auftreten eines pathologischen Progresses hat. Sowohl die Überlebensanalyse nach Kaplan-Meier als auch die Regressionsanalyse nach Cox bestätigt diese Tatsache

3.1.3.3 Korrelation zwischen Bcl2-Überexpression und dem Auftreten eines klinischen Progresses

Bei 40 Patienten (20,3%) trat ein klinischer Progreß der Tumorerkrankung auf (in der Gruppe „klinischer Progreß“ sind der pathologische Progreß, das Auftreten von Metastasen und das tumorspezifische Versterben subsummiert. Zur Definition siehe Kapitel 3.1.3).

3.1.3.3.1 Korrelation des Auftretens eines klinischen Progresses mit T-Stadium und Differenzierungsgrad

Den Zusammenhang zwischen Auftreten eines klinischen Progresses und dem T-Stadium bzw. dem Differenzierungsgrad zeigen die Diagramme 13 und 14.

Die Tumoren mit Infiltration der Muskulatur (T2-T4) entwickeln im Sinne der oben genannten Definition wesentlich früher einen klinischen Progreß als die oberflächlichen Tumoren (Ta-T1) (Kaplan-Meier, Log-Rank-Test: $p=0,001$).

Zudem ist das T-Stadium ein unabhängiger prognostischer Faktor (Cox-Regression: $p=0,001$).

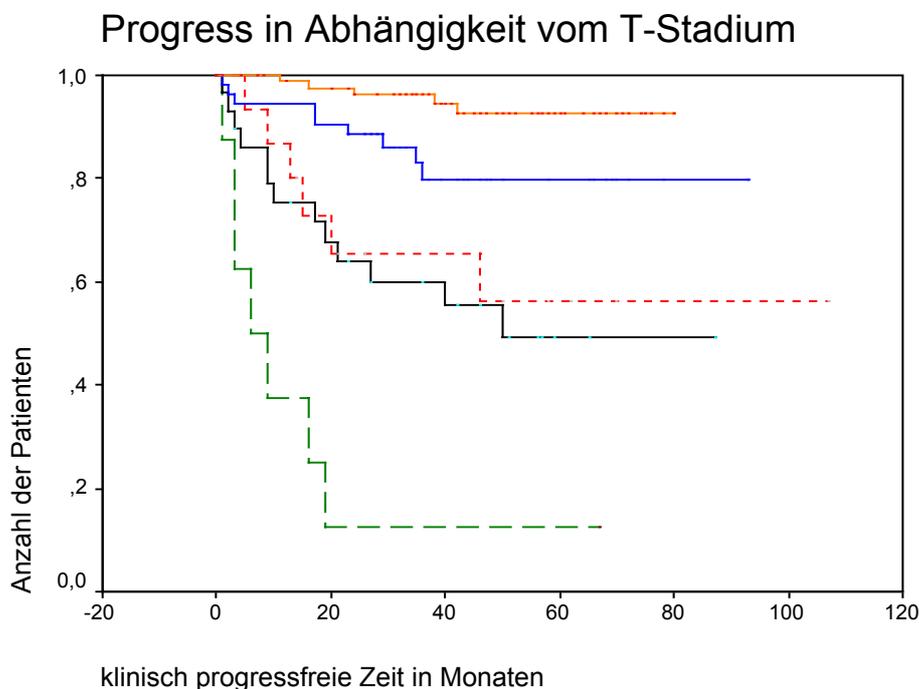


Diagramm 13

Progressfreie Zeit von 197 Blasen tumorpatienten aufgeteilt nach den T-Stadien

Kaplan-Meier-Kurve, Log-Rank-Test: $p=0,001$

von oben nach unten: orange: Ta, blau: T1, rot gepunktet: T3, schwarz: T2, grün gestrichelt: T4

Der Einfluss des Differenzierungsgrads wird in Diagramm 14 deutlich. Tumore mit dem Grad IV zeigen das früheste Auftreten eines Progresses gefolgt von Grad III, Grad II und Grad I (Kaplan-Meier, Log-Rank-Test: $p=0,001$).

Der Differenzierungsgrad zeigt aber in multivariater Analyse der Cox-Regression kein unabhängig prognostisches Potential (Cox-Regression: $p=0,531$).

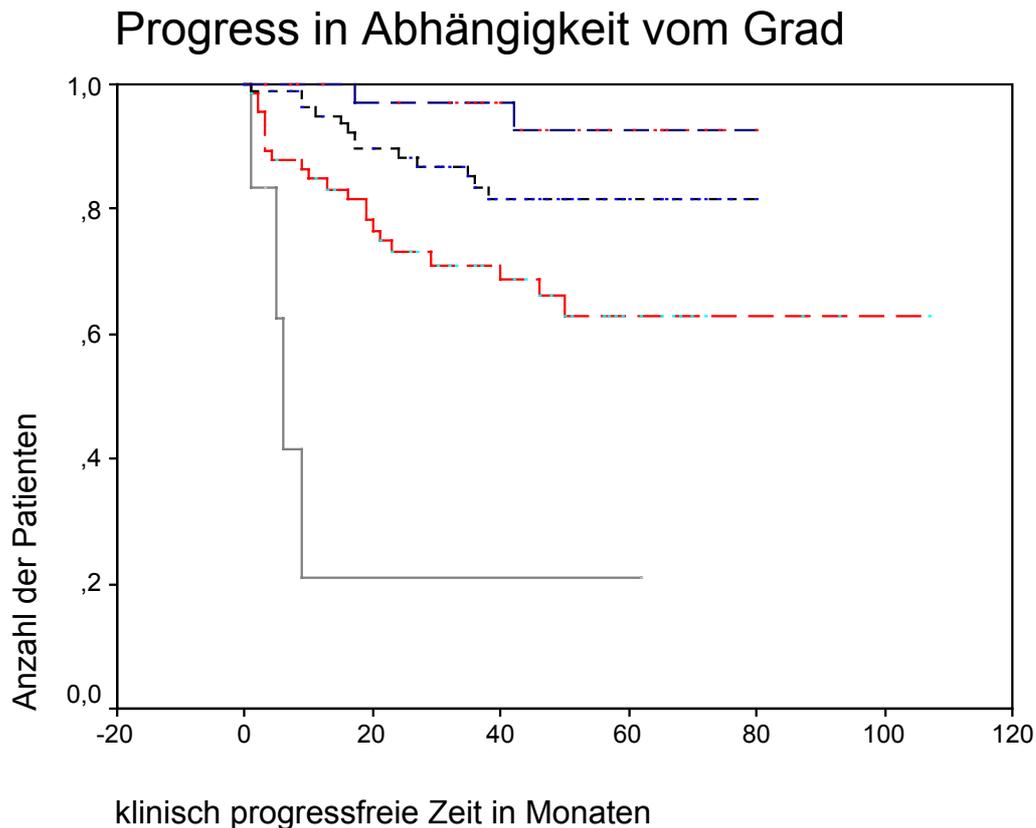


Diagramm 14

Progressfreie Zeit von 197 Blasentumorpatienten aufgeteilt nach dem Differenzierungsgrad des Primärtumors

Kaplan-Meier-Kurve, Log-Rank-Test: $p=0,001$

von oben nach unten:

blau gestrichelt: Grad I, schwarz gepunktet: Grad II, rot gestrichelt: Grad III, grau: Grad IV

3.1.3.3.2 Korrelation des Auftretens eines klinischen Progresses mit der Bcl-Überexpression

Die Bcl2-Überexpression zeigt im Zusammenhang mit dem klinischen Progreß eine wichtige Einflußnahme.

Bei 60% der Patienten, die später einen klinischen Progreß bekommen, zeigte sich eine Bcl2-Überexpression. Jedoch ist der Einfluß einer Bcl2-Überexpression allein nicht entscheidend (Log-Rank-Test für Positivität bzw. Färbeintensität $p=0,1053$ bzw. $p=0,2498$).

Hier gewinnt die Verteilung der Färbung entscheidende Bedeutung. Wie Diagramm 15 zeigt, überwiegen bei den Patienten, die später einen Progreß erleiden, die BCL-2 positiven Tumoren mit diffusem Verteilungsmuster.

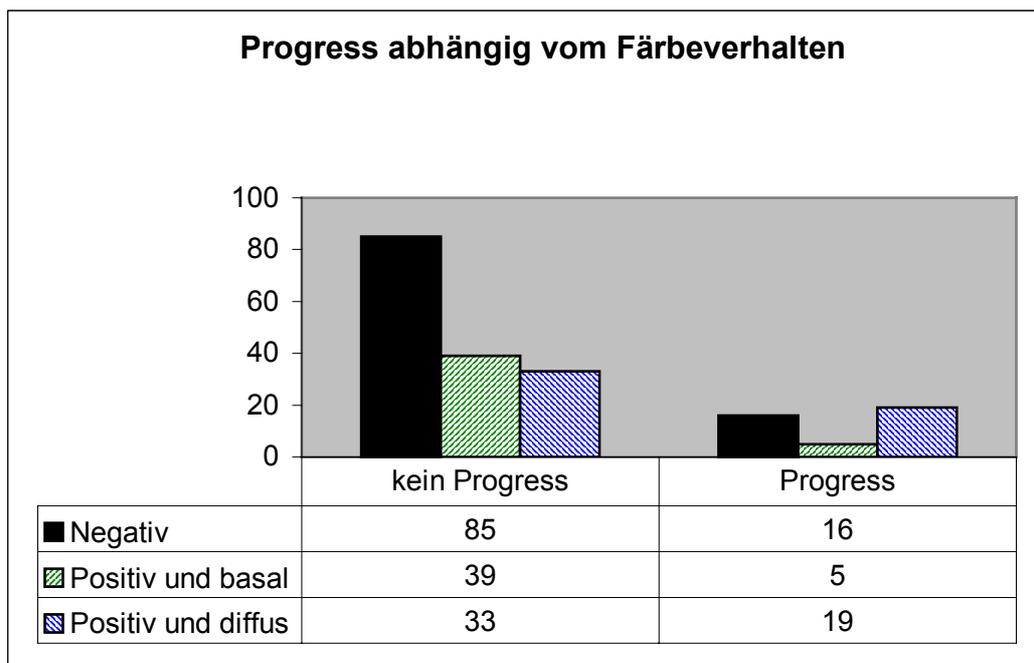


Diagramm 15

Verteilung des Bcl2-Färbemusters in Abhängigkeit vom klinischen Progress der jeweiligen Patienten

Chi-Quadrat-Test: $p=0,003$

schwarz: negative Bcl2-Färbung, grün: positive Bcl2-Färbung und basales Verteilungsmuster, blau: positive Bcl2-Färbung und diffuses Verteilungsmuster

In der Gegenüberstellung der positiven, diffus gefärbten Tumoren gegenüber den positiven, aber basal gefärbten und negativen Tumoren zusammen hat ein Bcl2 positiver, diffuser Tumor eine signifikant schlechtere Prognose (Log-Rank-Test $p=0,0003$). Im unten dargestellten Diagramm (Dia. 16) sieht man den deutlichen Einfluss des diffusen Färbemusters auf die Länge der progressfreien Zeit.

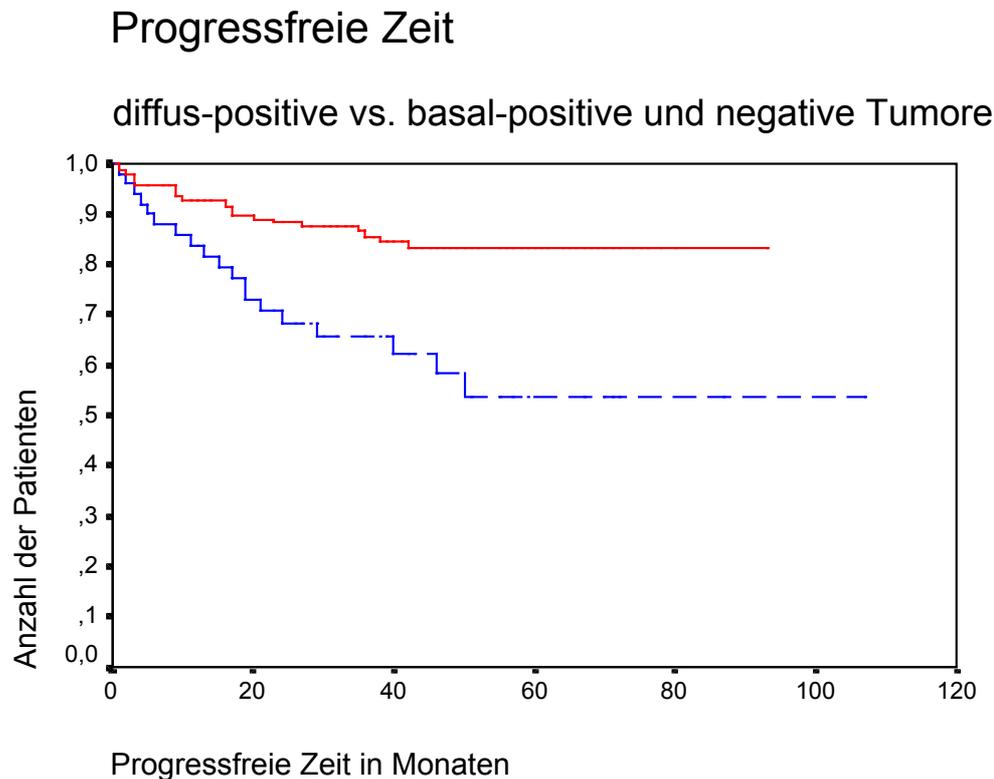


Diagramm 16

Progressfreie Zeit von 197 Blasen-Tumorpatienten aufgeteilt nach der immunhistochemischen Positivität für Bcl2 in Abhängigkeit des Verteilungsmusters

Kaplan-Meier-Kurve, Log-Rank-Test: $p=0,0003$

blaue, gestrichelte Linie: positive und diffuse Tumore, rote Linie: nicht diffuse Tumore (=negative Färbung oder positive Färbung mit basaler Verteilung)

3.1.3.3 Regressionsanalyse für das Auftreten eines Progresses und Bcl2-Expression

In der Cox-Regression zeigt sich der Einfluss der Bcl2-Überexpression unter Berücksichtigung des Verteilungsmusters (diffus gefärbte Tumore gegenüber den basal gefärbten und negativen Tumoren) nur in der dritten Berechnungsmodalität, d.h wenn T-Stadium und Differenzierungsgrad weggelassen werden ($p=0,002$).

In den übrigen Berechnungen und bei alleiniger Betrachtung der Bcl2-Färbung (positive gegenüber negativen Tumoren) ist das nicht der Fall.

Sowohl Alter und Geschlecht nehmen signifikanten Einfluß (Cox-Regression: jeweils $p < 0,05$). Dieser Effekt liegt an der Tatsache, daß 33,3% der Frauen, aber nur 15% der Männer einen Progreß erleiden. Ebenso haben ältere Patienten ein höheres Risiko, einen Progreß zu erleiden.

3.1.3.3.4 Korrelation des Auftretens eines Progresses mit der Bcl2-Überexpression bei Untergruppen der T-Stadien

Schließlich soll noch der Einfluß der Bcl2-Expression innerhalb der oben beschriebenen Untergruppen der T-Stadien dargestellt werden.

Die Überexpression von Bcl2 zeigt lediglich in der Untergruppe der Ta-Tumore einen Einfluss auf das zeitlich frühere Auftreten eines Progresses. Dies ist der Fall, wenn die diffus-positiven den basal-positiven zusammen mit den negativen Tumoren gegenübergestellt werden (Log-Rank-Test: $p = 0,0338$). Diagramm 17 zeigt diesen Zusammenhang für die Untergruppe der Ta-Tumore.

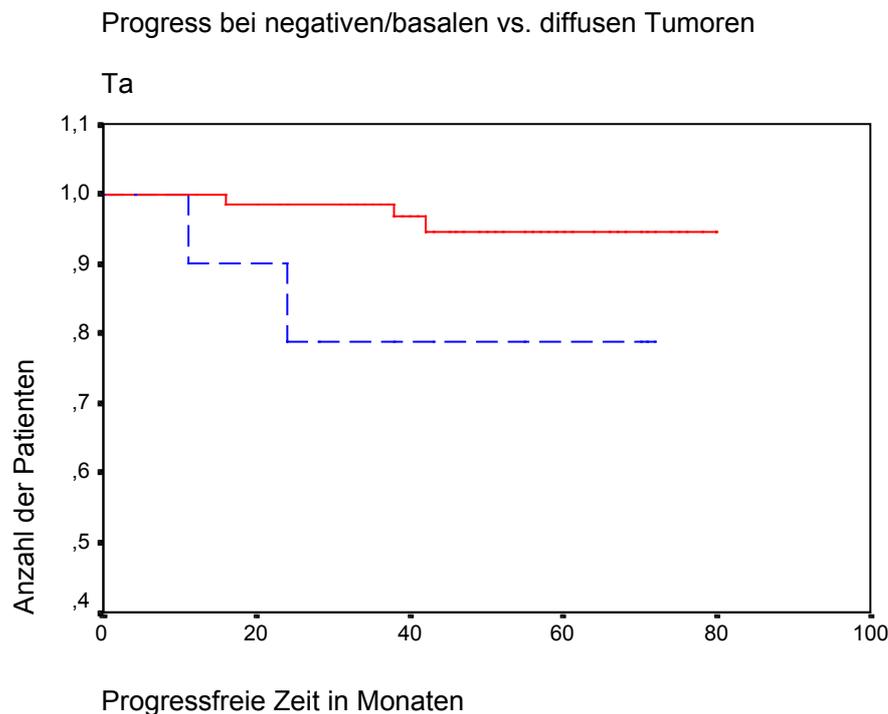


Diagramm 17

Progressfreie Zeit von 89 Blasen tumorpatienten mit T-Stadium Ta aufgeteilt nach der immunhistochemischen Positivität für Bcl2 in Abhängigkeit des Verteilungsmusters

Kaplan-Meier-Kurve, Log-Rank-Test: $p = 0,0338$

rot: negative und basal-positiv, blau gestrichelt: diffus-positiv

In der Regressionsanalyse zeigt sich, dass die Bcl2-Überexpression in keiner der Untergruppen ein statistisch signifikanter, unabhängiger Prognosefaktor ist.

3.1.3.3.5 Zusammenfassung des Einflusses von Bcl2 auf das Auftreten eines Progresses

Fasst man die oben dargestellten Analysen zusammen, so korreliert lediglich die diffuse Verteilung von Bcl2 im Tumor mit dem zeitlich früheren Auftreten eines klinischen Progresses der betroffenen Patienten. Dies betrifft das gesamte Patientenkollektiv und im Besonderen diejenigen Patienten mit Tumoren des Stadiums Ta.

In der Regressionsanalyse stellt sich der Nachweis eines Bcl2-positiven Tumors mit diffusem Verteilungsmuster als unabhängiger Prognosefaktor dar. Dies trifft jedoch nur zu, wenn das T-Stadium und der Differenzierungsgrad der jeweiligen Harnblasentumoren nicht mit in die Cox-Regressionsanalyse miteinbezogen. Dies bezieht sich auf das gesamte Patientenkollektiv und ist sonst in keiner der einzelnen Untergruppe der T-Stadien nachweisbar.

Wird aber T-Stadium und/oder Differenzierungsgrad mit in die Berechnung eingeschlossen, so ist weder die positive Bcl2-Färbung noch das diffuse Verteilungsmuster ein unabhängiger Prognosefaktor. Auch das trifft -soweit berechenbar- auch für die jeweiligen Untergruppen der T-Stadien zu.

3.1.3.4 Korrelation zwischen Bcl2-Überexpression und dem Überleben

Wie dem untenstehenden Diagramm (Dia. 18) zu entnehmen ist, wurde bei 17 der 32 verstorbenen Patienten eine Bcl2-Überexpression nachgewiesen. Weiterhin zeigt das Diagramm eine Unterteilung der Bcl2-Überexpression in diffuses und basales Verteilungsmuster.

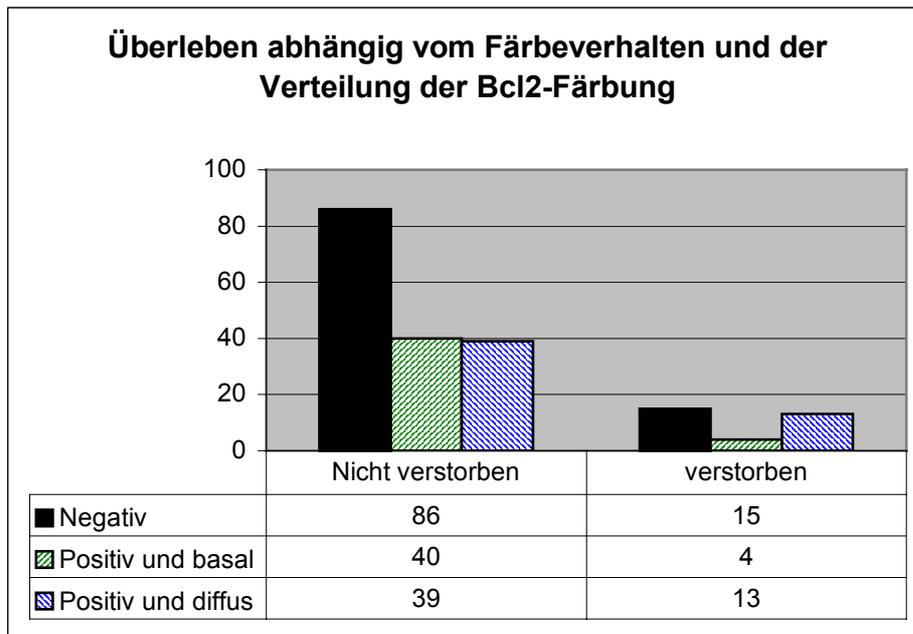


Diagramm 18

Überleben abhängig vom Färbeverhalten und der Verteilung der Bcl2-Färbung

Chi-quadrat-Test: $p=0,094$

schwarz: negative Bcl2-Färbung, grün: positive Bcl2-Färbung und basales Verteilungsmuster, blau: positive Bcl2-Färbung und diffuses Verteilungsmuster

Das Risiko, tumorbedingt zu versterben, ist durch das Vorhandensein eines Bcl2-positiven Tumors mit diffusem Verteilungsmusters signifikant erhöht (Log-Rank-Test $p=0,0289$). Im Diagramm 19 wird das frühe Versterben der Patienten mit einem Bcl2-positiven Tumor mit diffusem Verteilungsmuster deutlich.

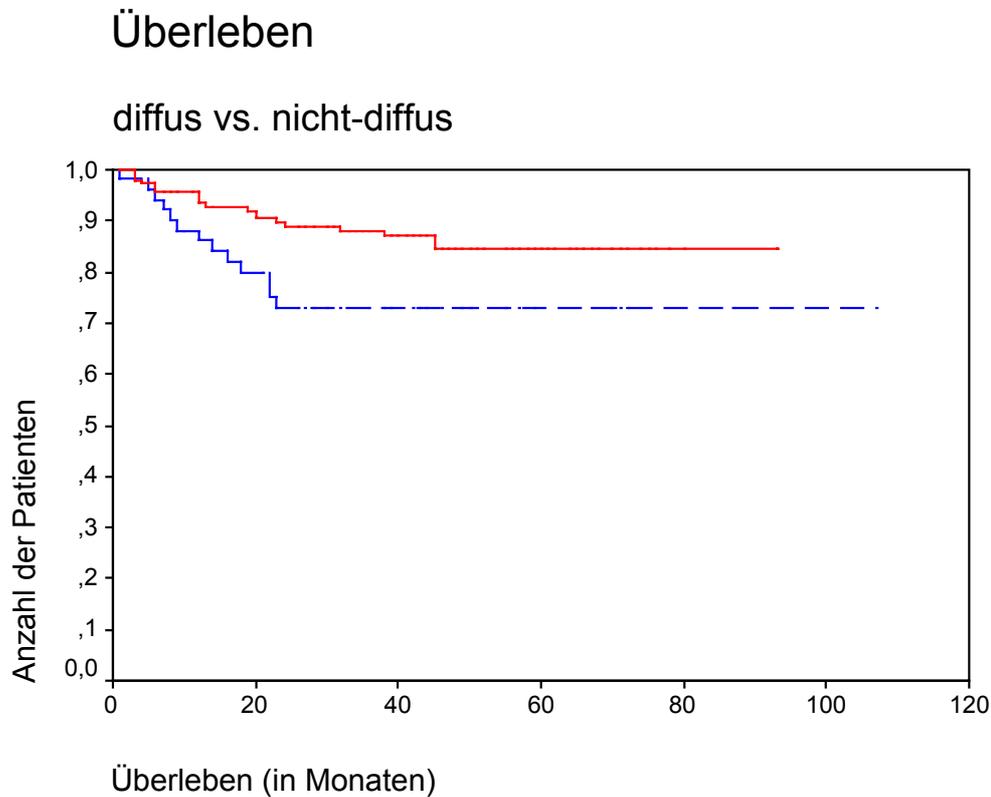


Diagramm 19

Überleben von 197 Blasen tumorpatienten aufgeteilt nach der immunhistochemischen Positivität für Bcl2 in Abhängigkeit des Verteilungsmusters

Kaplan-Meier-Kurve für Überleben, Log-Rank-Test: $p=0,0289$

blaue, gestrichelte Linie: positive und diffuse Tumore, rote Linie: basal-positiv und negativ(=nicht diffus) Tumore

3.1.3.4.1 Regressionsanalyse für das Überleben und Bcl2-Expression

In der Regressionsanalyse nach Cox zeigt die Überexpression von Bcl2 in keiner Berechnungsmodalität als unabhängiger Prognosefaktor. Das schließt sowohl die Untersuchung der Bcl2-positiven gegenüber den Bcl2-negativen Tumoren als auch die Berücksichtigung des Verteilungsmusters ein.

Lediglich das T-Stadium und das Geschlecht der Patienten ist in der ersten Berechnungsmodalität unabhängiger Prädiktor ($p < 0,001$ bzw. $p < 0,05$).

3.1.3.4.2 Korrelation des Überlebens mit der Bcl2-Überexpression bei Untergruppen der T-Stadien

Nach Aufteilung der T-Stadien in Untergruppen zeigt sich in keiner der einzelnen Gruppen ein statistisch signifikanter Einfluß der Bcl2-exprimierenden Tumoren auf das zeitlich frühere Versterben (Log-Rank-Test: jeweils $p > 0,05$). Das gilt für die Bcl2-Expression mit oder ohne Berücksichtigung des Verteilungsmusters.

Auch in der Regressionsanalysen nach Cox zeigt sich die Expression von Bcl2 in keiner Gruppierung der T-Stadien als unabhängiger Prognosefaktor. Das gilt wiederum für die Bcl2-Expression mit oder ohne Berücksichtigung des Verteilungsmusters.

3.1.3.4.3 Zusammenfassung des Einflusses von Bcl2 auf das Überleben

Die Expression von Bcl2 korreliert mit dem zeitlich früheren Versterben, wenn die Bcl2-positiven Tumore mit diffusem Verteilungsmuster den übrigen Harnblasentumoren gegenübergestellt werden. Dieser Zusammenhang zeigt sich im gesamten Patientenkollektiv, jedoch nicht in den einzelnen Untergruppen der T-Stadien.

Die Expression von Bcl2 fungiert nicht als unabhängiger Prädiktor. Dies gilt für die Bcl2-Expression mit oder ohne Berücksichtigung des Verteilungsmusters und in den jeweiligen Untergruppen der T-Stadien.

3.1.4 Immunhistochemischer Nachweis des Bcl2-Onkoprotein in benignem Gewebe

Zu nahezu jedem Tumorpräparat (bei 92% der Fälle) wurde eine Probe mitgefärbt, die bei transurethraler Resektion aus einer Probebiopsie stammt oder bei Zystektomie-Präparaten aus Anteilen der Blase, die noch nicht maligne verändert sind. Diese wurden histologisch auf ihre Benignität untersucht und wiesen alle die Schichtung von unverändertem Urothel auf. Es wurden 185 gutartige Gewebeproben untersucht.

Bei der Auswertung der immunhistochemischen Färbung zeigte sich ein recht homogenes Bild. In 86,7% der Fälle zeigte sich eine positive basale Anfärbung, nur 13,3% wurden als negativ bewertet. Bei 8 Fällen waren die oberen Schichten des Urothels allerdings auf dem Objektträger nicht mehr vorhanden, da sie wahrscheinlich während der Hitzedemaskierung abgeschwommen sind. Diese wiesen aber in den untersten vorhandenen Zellschichten eine positive Färbung auf, so daß sie bei der basalen Färbung subsummiert wurden.

Die Abbildung 9 zeigt das Bild eines unveränderten Urothels, das die charakteristische Färbung der basalen Zellschichten aufweist.

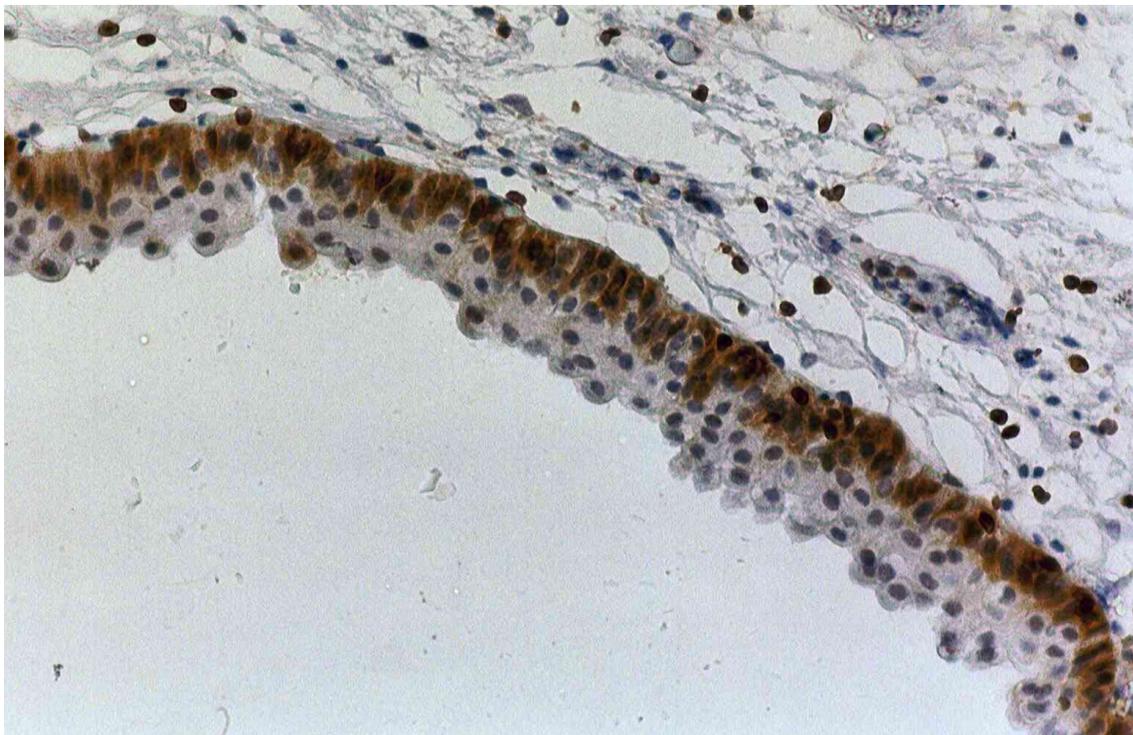


Abbildung 8

Benignes Gewebe eines Blasentumors nach Bcl2-Antikörper-Färbung mit basaler Anfärbung (320x Vergrößerung)

3.2 Ergebnisse der Untersuchung des Onkoproteins Her2/neu

3.2.1 Ergebnisse der immunhistochemischen Auswertung

Für die Untersuchung des Protoonkogens Her2/neu wurden 163 Schnitte von Harnblasenkarzinomen gefärbt. Tabelle 9 zeigt eine Übersicht über epidemiologische, klinische und pathologische Daten der untersuchten Patienten.

| Epidemiologische Daten | |
|--|-----------------------------------|
| Patientenzahl | 163 |
| Männer | 116 |
| Frauen | 47 |
| Alter | 24-90 |
| Medianes Alter | 68,0 (Standardabweichung 11,7) |
| Klinische und pathologische Daten | |
| Transurethrale Resektion (TUR) | 136 |
| Zystektomie | 27 |
| Tis | 3 |
| Ta | 52 |
| T1 | 55 |
| T2 | 29 |
| T3 | 16 |
| T4 | 8 |
| benignes Gewebe gefärbt | 150 |

Tabelle 9

Übersicht über die Zusammensetzung des Patientenkollektiv nach epidemiologischen, klinischen und pathologischen Daten

Das Diagramm 20 zeigt die grafische Darstellung des Zusammenhangs zwischen T-Stadien und Differenzierungsgrad.

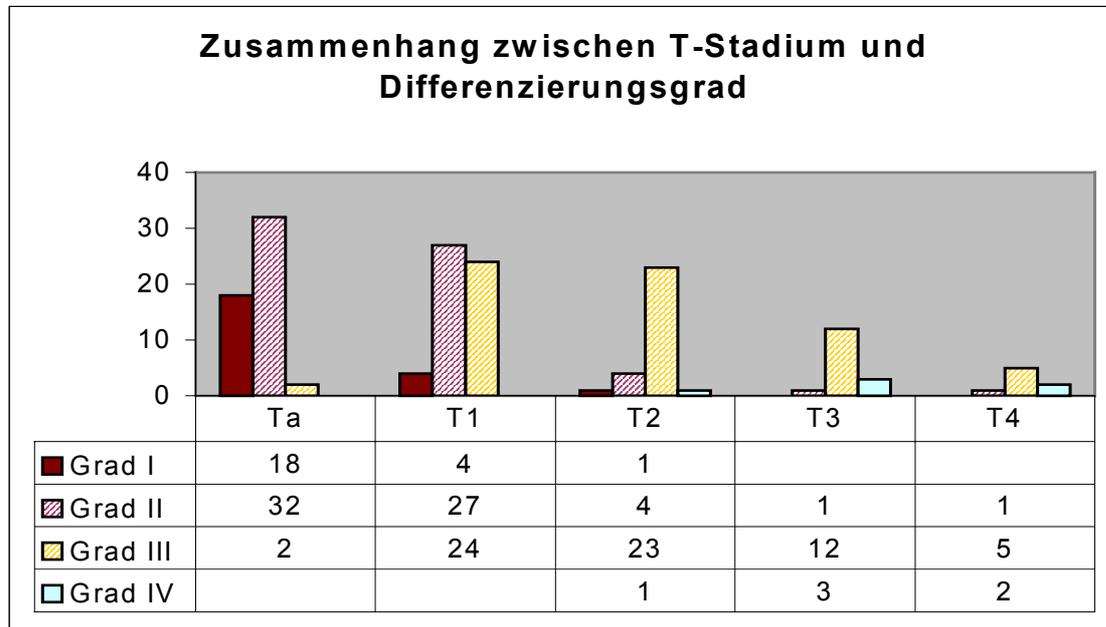


Diagramm 20

Zusammenhang zwischen T-Stadium und histopathologischem Differenzierungsgrad der Her2/neu gefärbten Harnblasentumore von 163 Patienten

rot: Grad I, gestreift rot: Grad II, orange: Grad III, türkis: Grad IV

Dabei waren 84 Tumore (51,5%) Her2/neu-negativ und 79 Tumore (48,5%) waren Her2/neu-positiv. Es wurden bei 48 Patienten (29,4%) keine Expression von Her2/neu nachgewiesen, bei 36 Patienten (22,1%) wurde nur eine sehr schwache oder zytoplasmatische Färbung gefunden. Hingegen wiesen 50 Patienten (30,7%) eine moderate und 29 Patienten (17,8%) eine starke membrangebundene Färbung auf.

Im folgenden Diagramm (Dia. 21) sind die absoluten Zahlen dargestellt, wobei hier die Bewertung nach der Färbeintensität mit den Kategorien Score 0, 1+, 2+ und 3+, verwendet wird.

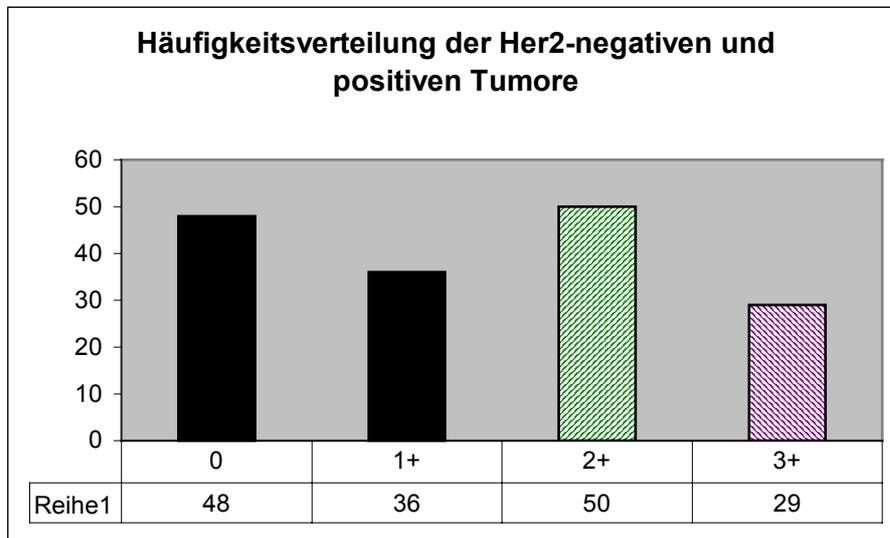


Diagramm 21

Häufigkeitsverteilung der Her2-negativen und positiven Harnblasentumore von 163 Patienten

schwarz: Her2/neu negative Färbung (0 und 1+), grün gestreift: schwach positive Her2/neu Färbung (2+), lila gestreift: stark positive Her2/neu Färbung (3+)

Sowohl der Score 0 als auch 1+ werden als Her2/neu-negativ gewertet. Dies war u. a. der Fall, wenn die Membranfärbung nicht zirkumferent, d.h. die ganze Membran umgebend war.

Das folgende Bild (Abb. 9) zeigt einen Tumor (T1/G2), bei dem zwar eine Membranfärbung vorhanden ist, diese ist jedoch nur unvollständig ausgeprägt. Mehr als 10% der Tumorzellen sind positiv gefärbt. Also wurde dieser Tumor gemäß unseren Kriterien mit dem Score 1+ bewertet.

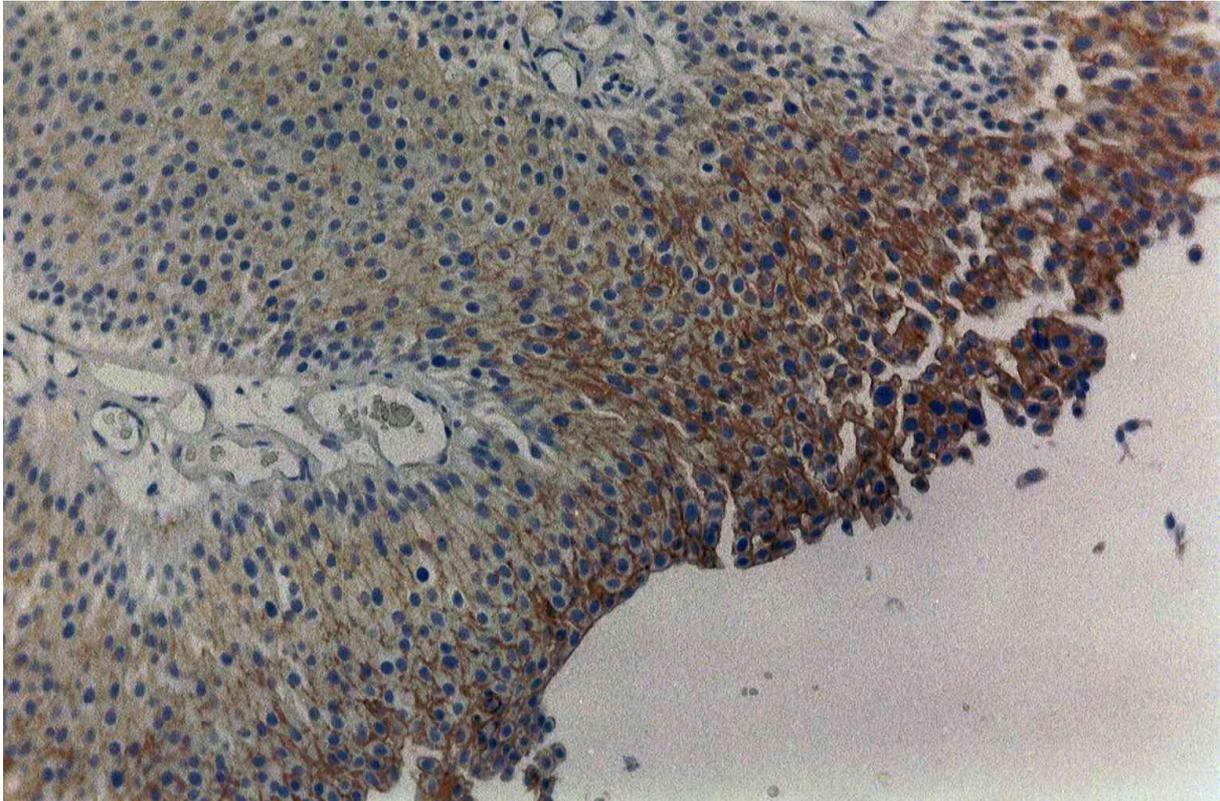


Abbildung 9

Blasentumor nach Her2/neu-Antikörper-Färbung, hier: Her2/neu-negativer Tumor mit Score 1+ (Vergrößerung 100x)

Das nächste Bild (Abb. 10) zeigt einen Her2/neu-positiven Tumor mit vollständiger, sehr starker Membranfärbung. Es sind mehr als 10% der Tumorzellen positiv gefärbt. Dieser Tumor (T2/G3) wurde mit 3+ bewertet.

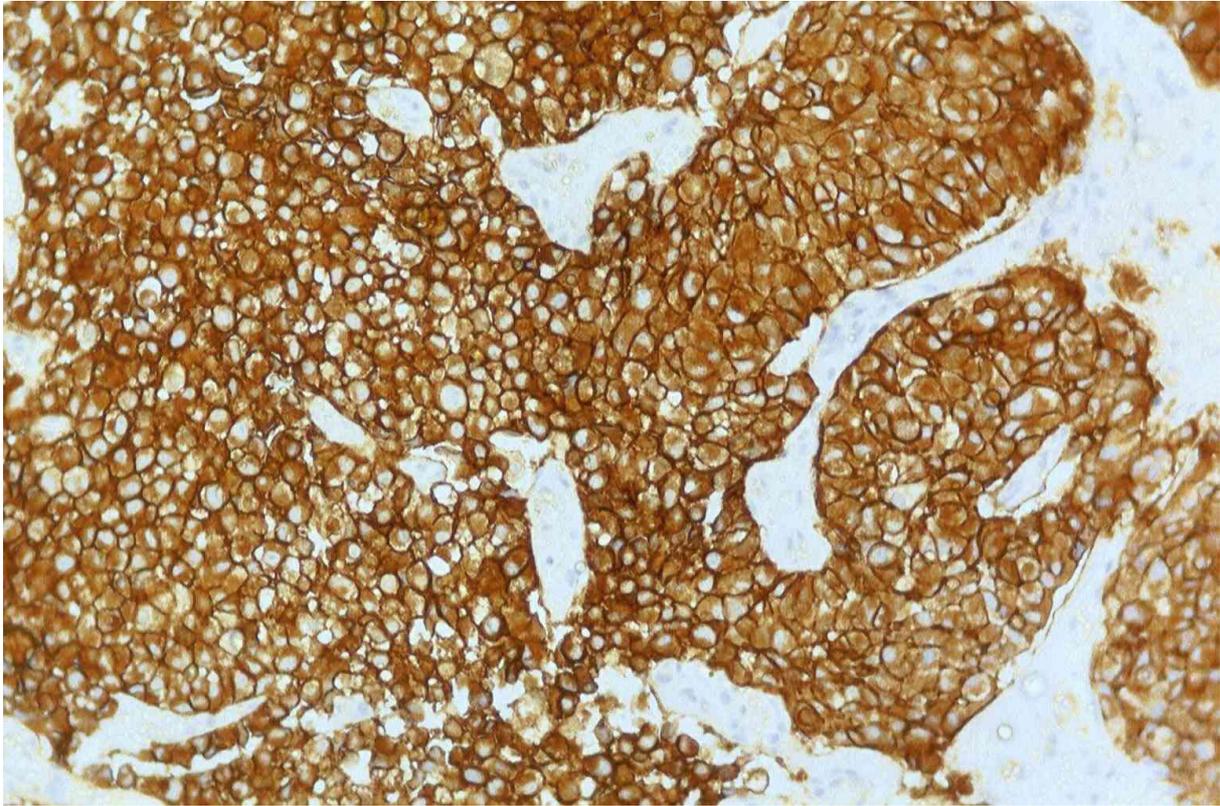


Abbildung 10

Blasentumor nach Her2/neu-Antikörper-Färbung, hier: Her2/neu-positiver Tumor mit Score 3+ (Vergrößerung 200x)

3.2.2 Korrelation mit pathologischen Parametern

Die Verteilung der Her2/neu-negativen und positiven Tumoren auf die jeweiligen T-Stadien ergibt unten stehendes Diagramm (Dia. 22). Die Carcinomata in situ wurden aufgrund der geringen Fallzahl außer Acht gelassen.

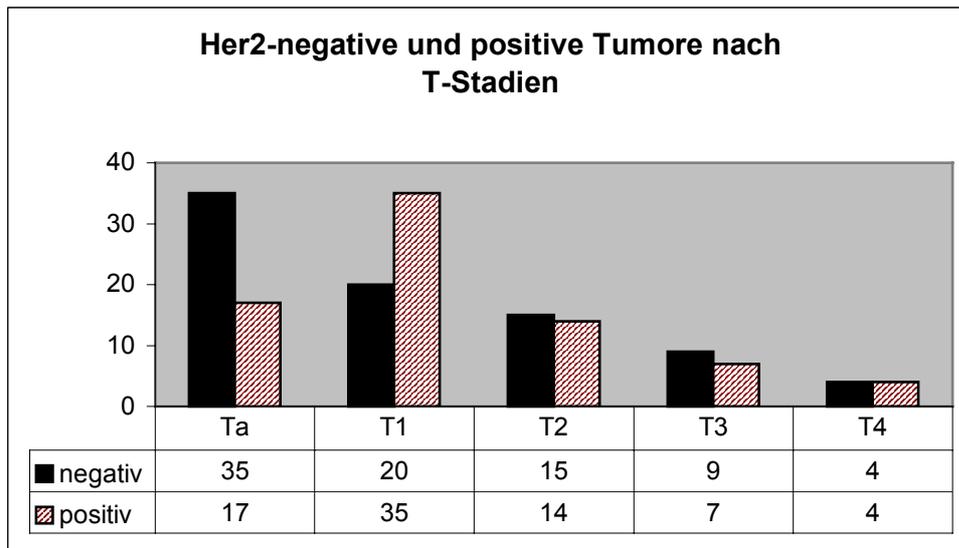


Diagramm 22

Häufigkeitsverteilung der Her2-negativen und positiven Tumore nach T-Stadien bei 160 Patienten mit Harnblasentumor ($p>0,05$)

schwarz: Her2/neu negative Färbung (0 und 1+), dunkelrot: Her2/neu positive Färbung (2+ und 3+)

Dabei besteht kein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen einer Her2-Überexpression und dem T-Stadium ($p>0,05$). Lediglich das Überwiegen positiver Färbung bei T1-Tumoren (63,6% positiver gegenüber 36,4% negativer Tumore) fällt auf (siehe Diagramm 23).

Ebenfalls besteht kein Zusammenhang zwischen der Her2/neu-Färbung und dem Differenzierungsgrad der Harnblasenkarzinome ($p > 0,05$). Dies wird in Diagramm 23 dargestellt.

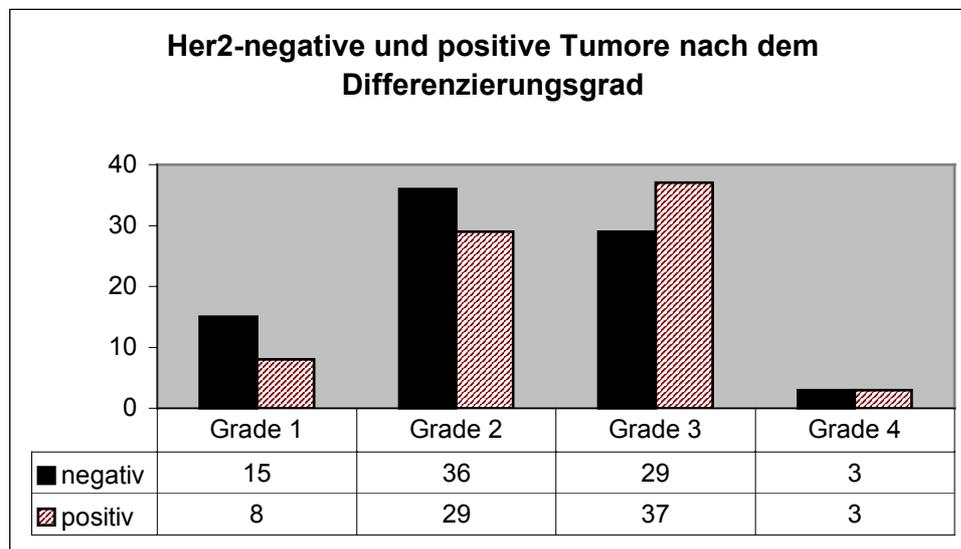


Diagramm 23

Häufigkeitsverteilung der Her2-negativen und positiven Tumore nach dem histopathologischen Differenzierungsgrad bei 160 Patienten mit Harnblasentumor ($p > 0,05$)

schwarz: Her2/neu negative Färbung (0 und 1+), dunkelrot: Her2/neu positive Färbung (2+ und 3+)

3.2.3 Korrelation mit klinischen Parametern

Für die Untersuchung eines Zusammenhangs zwischen klinischen Parametern und einer Her2/neu-Überexpression werden die gleichen Kriterien angewendet wie bei der Untersuchung des Bcl2-Onkoproteins. Es wird der Zusammenhang mit der Rezidivfreiheit, dem Auftreten eines Progresses und dem tumorbedingten Versterben untersucht.

3.2.3.1 Korrelation zwischen Her2/neu-Überexpression und der Rezidivfreiheit

Von den 160 in die Untersuchung einbezogenen Patienten erlitten 74 (46,3%) ein Rezidiv in der Harnblase.

Für die statistische Untersuchung werden jeweils die Bewertungen 0 und 1+ zur Gruppe „negativ“ und die Bewertungen 1+ und 2+ zur Gruppe „positiv“ zusammengefaßt.

Von den 74 Patienten, bei denen nach der Operation wieder ein Tumor auftrat, wiesen 40 Patienten (50,1%) ursprünglich eine Überexpression von Her2/neu auf. Bei den restlichen 34 Patienten (45,9%) konnte kein Nachweis einer Her2/neu-Expression bewiesen werden. Von den 86 Patienten, die im Laufe des Untersuchungszeitraums kein Rezidiv bekommen haben, zeigten 49 Patienten (57%) in der immunhistochemischen Untersuchung einen Her2/neu-negativen und nur 37 Patienten (43%) einen Her2/neu-positiven Tumor.

Dies zeigt folgendes Diagramm (Dia. 24):

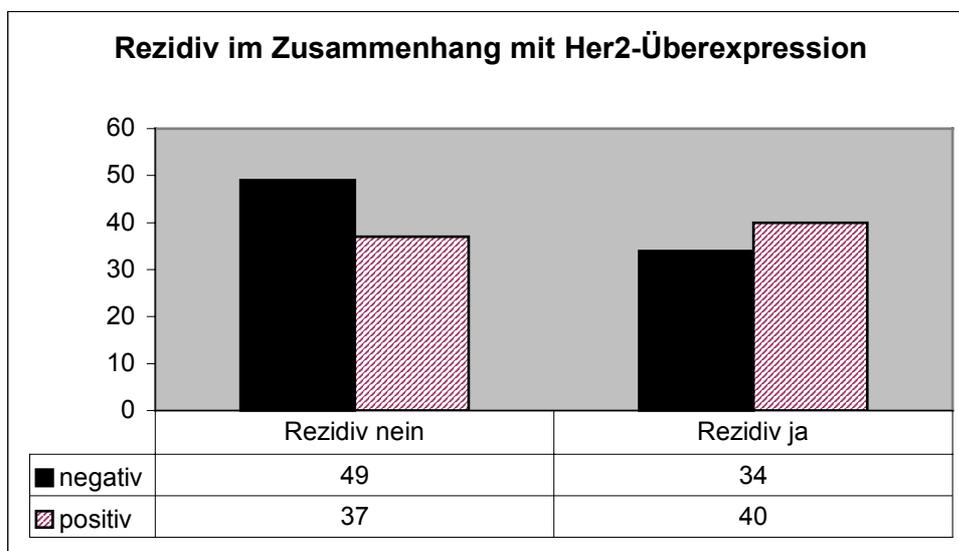


Diagramm 24

Auftreten eines Rezidives im Zusammenhang mit Her2-Überexpression bei 160 Patienten mit Harnblasentumor ($p > 0,05$)

schwarz: Her2/neu negative Färbung (0 und 1+), dunkelrot: Her2/neu positive Färbung (2+ und 3+)

Es besteht jedoch kein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen dem Auftreten eines Rezidivs und der Expression von Her2/neu ($p > 0,05$).

Allerdings besteht ein Zusammenhang zwischen der zeitlich frühen Rezidivierung eines Harnblasenkarzinoms und dessen Überexpression von Her2/neu. Patienten, die einen Her2/neu-positiven Tumor aufweisen, haben ein höheres Risiko für ein zeitlich früheres Wiederauftreten eines Harnblasenkarzinoms (Kaplan-Meier-Kurve, Log-Rank-Test $p = 0,0158$).

Bei der Betrachtung der einzelnen Bewertungseinheiten (0,1+,2+ und 3+) zeigt sich eine fast deckungsgleiche Kurve für die beiden negativen Ausprägungen (0 und 1+). Bei den beiden positiven Ausprägungen ergibt es sich, daß die Kurve der Patienten mit Score 3+ leicht über

derjenigen der Patienten mit 2+ liegt. Ein Zusammenfassen der beiden negativen und beiden positiven Scores scheint sinnvoll und gerechtfertigt zu sein.

Das unten dargestellte Diagramm (Dia. 25) zeigt das frühe Auftreten von Rezidiven bei Her2-negativen und -positiven Tumoren.

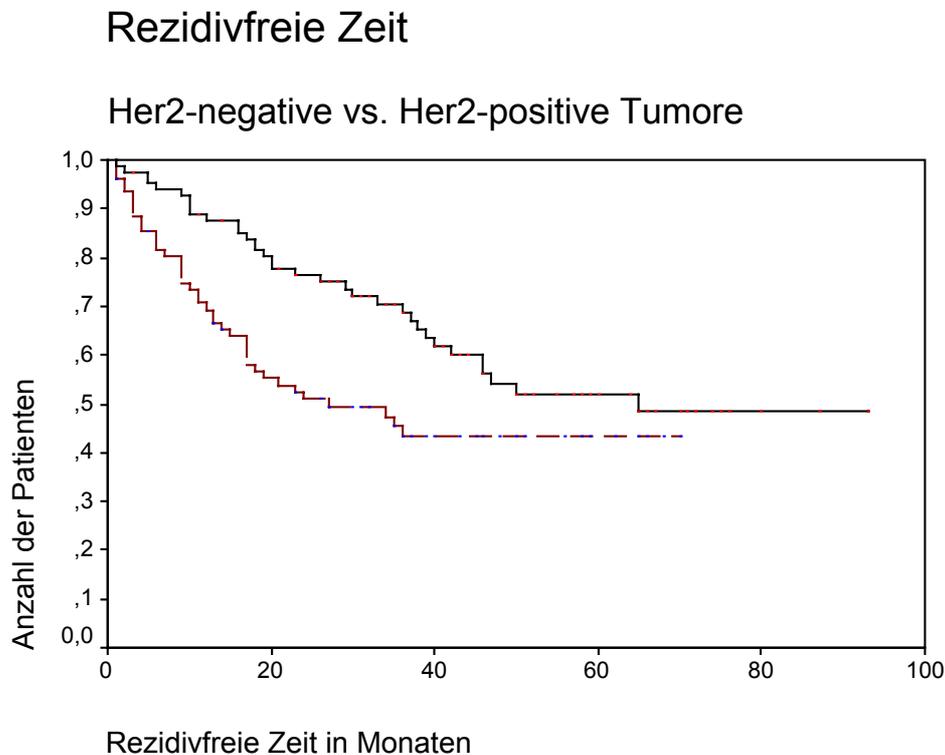


Diagramm 25

Rezidivfreie Zeit von 160 Blasen tumorpatienten aufgeteilt nach der immunhistochemischen Positivität für Her2/neu

Kaplan-Meier Kurve, Log-Rank-Test $p=0,0158$

Dunkelrote, gestrichelte Linie: Her2-positive Tumore (2+ und 3+), schwarze Linie: Her2-negative Tumore (0 und 1+)

Bei der Analyse des Einflusses der Her2/neu-Expression auf das Auftreten eines Rezidives innerhalb der vier Untergruppierungen der T-Stadien, ergab sich innerhalb keiner Untergruppe eine statistisch signifikante Einflußnahme durch das Her2/neu-Onkoprotein.

Die Bedeutung der Überexpression des Her2/neu-Proteins wird in der Berechnung der Cox-Regression deutlich. So ergibt sich ein starker Einfluß der Her2-Überexpression auf das Risiko eines früh auftretenden Rezidivs ($p=0,018$). Dieser Einfluß liegt vor dem nicht signifikanten Einfluß des T-Stadiums und des Grading ($p=0,270$ bzw. $p=0,930$), aber nach dem Geschlecht der Patienten ($p=0,007$). Da in der obigen statistischen Auswertung deutlich wurde,

daß kein Zusammenhang zwischen T-Stadium und Differenzierungsgrad der Tumoren besteht, kann auf die zwei weiteren Berechnungsmodalitäten der Cox-Regression (ohne T-Stadium und Grading), die bei den Berechnungen im Zusammenhang mit dem Onkoprotein Bcl2 angewandt wurden, verzichtet werden. Es werden hier also immer die Variablen T-Stadium, Grading, Risikofaktoren, Alter und Geschlecht mit einbezogen.

Als unabhängiger Prädiktor zeigt sich das Onkoprotein Her2/neu ebenfalls in den Untergruppen der T-Stadien, die die muskelinvasiven Tumoren umfassen. So ist die Expression von Her2/neu jeweils in der Gruppe T1-T4 bzw. T2-T4 statistisch signifikant (jeweils $p < 0,05$), nicht jedoch in den Untergruppen Ta und Ta/T1 (jeweils $p > 0,05$)

3.2.3.2 Korrelation zwischen Her2/neu-Überexpression und dem Auftreten eines pathologischen Progresses

Bei 10 Patienten trat ein neuer Tumor auf, der nach der Behandlung eines ursprünglich oberflächlichen Tumors nun muskelinvasiv war. Sechs dieser Patienten (60%) wiesen eine Her2/neu-Überexpression auf. Das Diagramm 26 zeigt diesen Zusammenhang, der aber statistisch nicht signifikant ist (Log-Rank-Test $p=0,2642$).

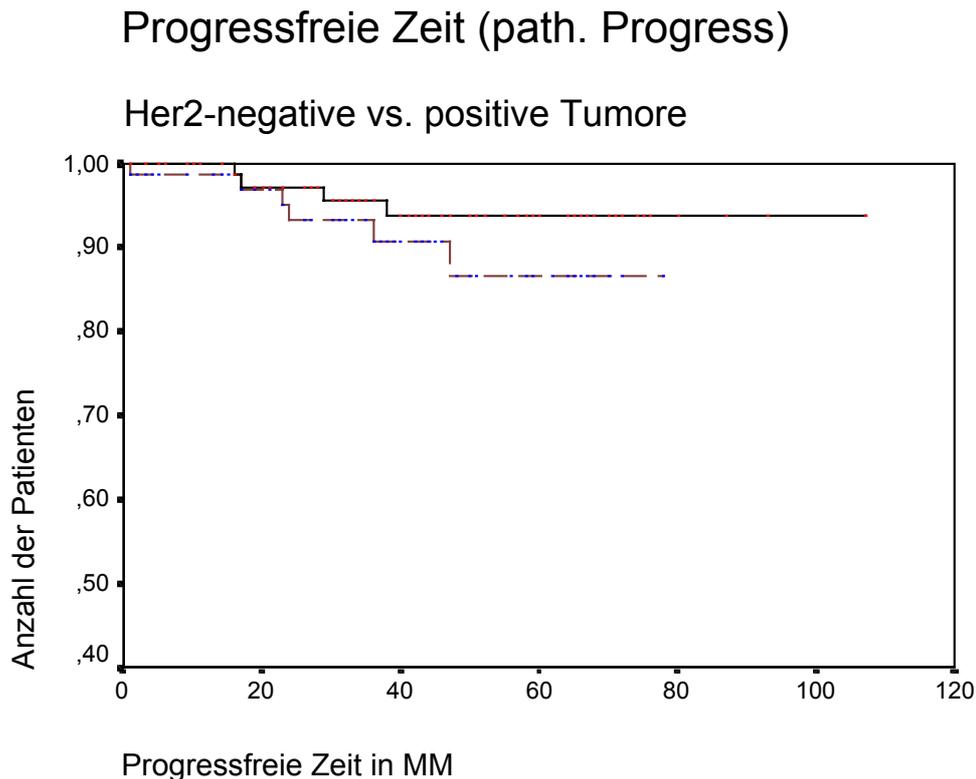


Diagramm 26

Progressfreie Zeit von 160 Blasentumorpatienten aufgeteilt nach der immunohistochemischen Positivität für Her2/neu

Kaplan-Meier-Kurve (pathologischer Progreß), Log-Rank-Test: $p=0,2642$

Dunkelrote, gestrichelte Linie: Her2-positive Tumore (2+ und 3+), schwarze Linie: Her2-negative Tumore (0 und 1+)

Ähnlich der Berechnung des Vorhersagewertes von Bcl2 hat keiner der pathologischen Parameter (T-Stadium oder Grade) oder anderer Werte (Alter, Geschlecht, Risikofaktoren, aber auch Her2/neu: $p=0,215$) ein prognostisches Potential.

3.2.3.3 Korrelation zwischen Her2/neu-Überexpression und dem Auftreten eines klinischen Progresses

Der klinische Progreß trat bei 38 Patienten auf. Wie oben beschrieben, umfasst der Progreß drei Kriterien: das Auftreten eines muskelinvasiven Tumors nach Behandlung des ursprünglich oberflächlichen Tumors, das spätere Auftreten von Metastasen oder das tumorbedingte Versterben.

Die Diagramme 27 und 28 zeigen das Auftreten eines Progresses in Abhängigkeit vom T-Stadium einerseits und dem Differenzierungsgrad andererseits.

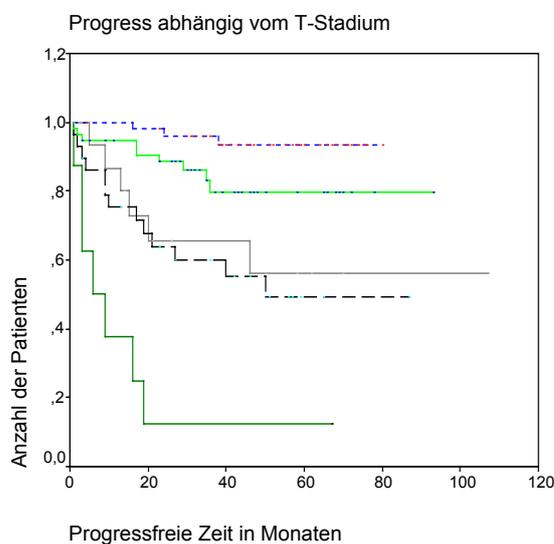


Diagramm 27

Progressfreie Zeit von 160 Blasentumorpatienten aufgeteilt nach den T-Stadien

Kaplan-Meier-Kurve

von oben nach unten:

blau gepunktet: T1, hellgrün: T2, grau: T3,
schwarz gestrichelt: T4, dunkelgrün: T4

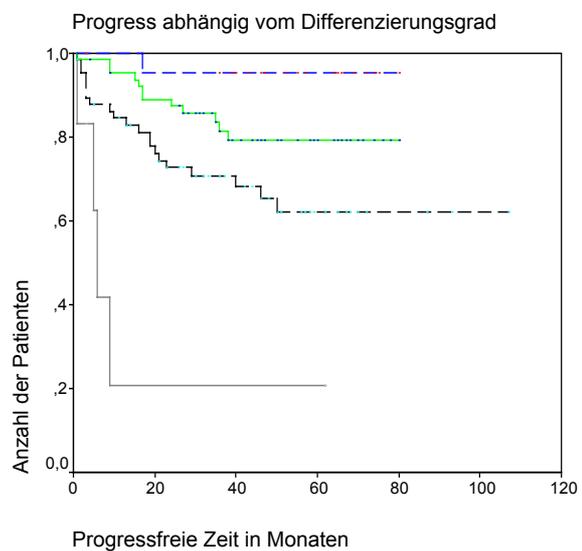


Diagramm 28

Progressfreie Zeit von 160 Blasentumorpatienten aufgeteilt nach dem Differenzierungsgrad

Kaplan-Meier-Kurve

von oben nach unten:

blau gestrichelt: Grad I, grün: Grad II,
schwarz gestrichelt: Grad III, grau: Grad IV

Bei 23 (60,5%) der 38 Patienten mit einem solchem Progreß lag eine Überexpression des Her2/neu-Onkoproteins vor, während bei 15 (39,5%) der Patienten, die eine Krankheitsverschlechterung erlitten, keine Überexpression von Her2/neu festgestellt werden konnte.

Bei 122 Patienten trat kein Progreß auf. Von diesen wiesen mehr Patienten (55,7%) einen Her2/neu-negativen Tumor als eine Her2/neu-positive Tumor (44,3%) auf.

Das folgende Diagramm zeigt dieses Verhältnis (Dia. 29):

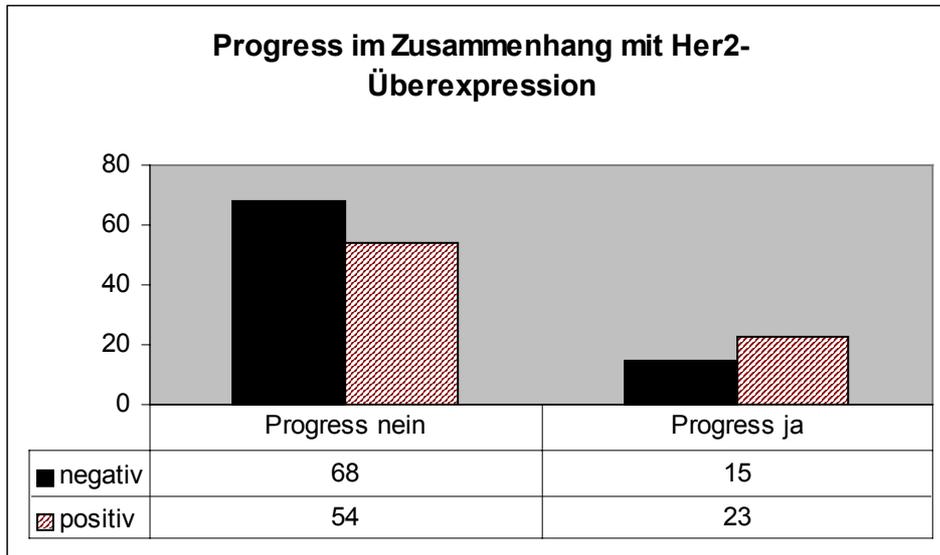


Diagramm 29

Auftreten eines Progresses im Zusammenhang mit Her2-Überexpression bei 160 Patienten mit Harnblautumor ($p > 0,05$)

schwarz: Her2/neu negative Färbung (0 und 1+), dunkelrot: Her2/neu positive Färbung (2+ und 3+)

Das Vorliegen einer Her2-Überexpression erhöht das Risiko für ein früheres Fortschreiten der Tumorerkrankung signifikant (Log-Rank-Test: $p=0,0378$).

Das frühere Eintreten eines klinischen Progresses bei Her2-Überexpression bezogen auf das gesamte Kollektiv der untersuchten Patienten mit Harnblasenkarzinom wird in Diagramm 30 deutlich.

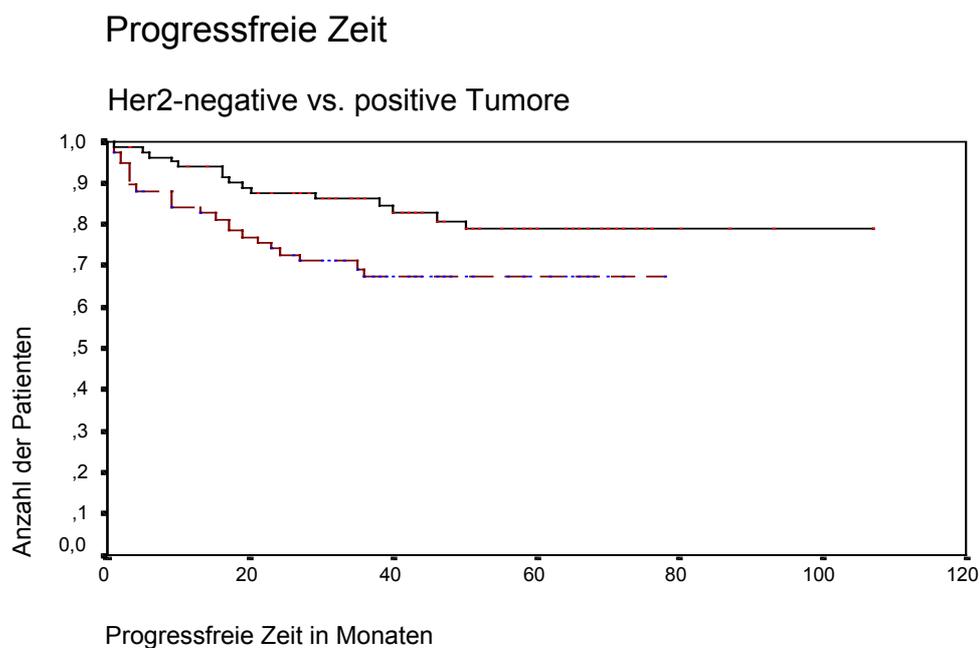


Diagramm 30

Progressfreie Zeit von 160 Blasentumorpatienten aufgeteilt nach der immunohistochemischen Positivität für Her2/neu

Kaplan-Meier-Kurve, Log-Rank-Test: $p=0,0378$

dunkelrote, gestrichelte Linie: Her2-positive Tumore, schwarze Linie: Her2-negative Tumore

In den einzelnen Untergruppen war jedoch kein signifikanter Einfluss bezüglich des zeitlich früheren Auftretens eines klinischen Progresses nachweisbar (jeweils $p>0,05$).

Die Einflußnahme auf das Auftreten eines Progresses wird in der Berechnung der Wertigkeit von Her2/neu als unabhängiger prognostischer Faktor deutlich. So ist der Einfluß der Her2-Überexpression nach dem des T-Stadiums (Cox-Regression $p<0,001$) der zweit stärkste (Cox-Regression $p=0,006$). Danach folgt das Geschlecht der Patienten ($p=0,008$).

Ähnlich wie bei Berechnung der Überlebenskurven (Kaplan-Meier-Kurve) zeigt sich auch in der Cox-Regression lediglich für die invasiven T-Stadien (T2-T4) ein statistisch signifikanter Einfluß von Her2/neu im Sinne eines unabhängigen Prognosefaktor (Cox-Regression: jeweils $p<0,05$).

3.2.3.4 Korrelation zwischen Her2/neu-Überexpression und dem Überleben

Zum Ende des jeweiligen Untersuchungszeitraums sind 29 Patienten der 160 in die statistische Analyse einbezogenen Patienten (18,1%) verstorben. Dies war u.a. von der Infiltrations-tiefe des jeweiligen Tumors (T-Stadium) abhängig ($p < 0,05$). Das Diagramm 31 zeigt das frühe Versterben derjenigen Patienten mit höheren T-Stadium.

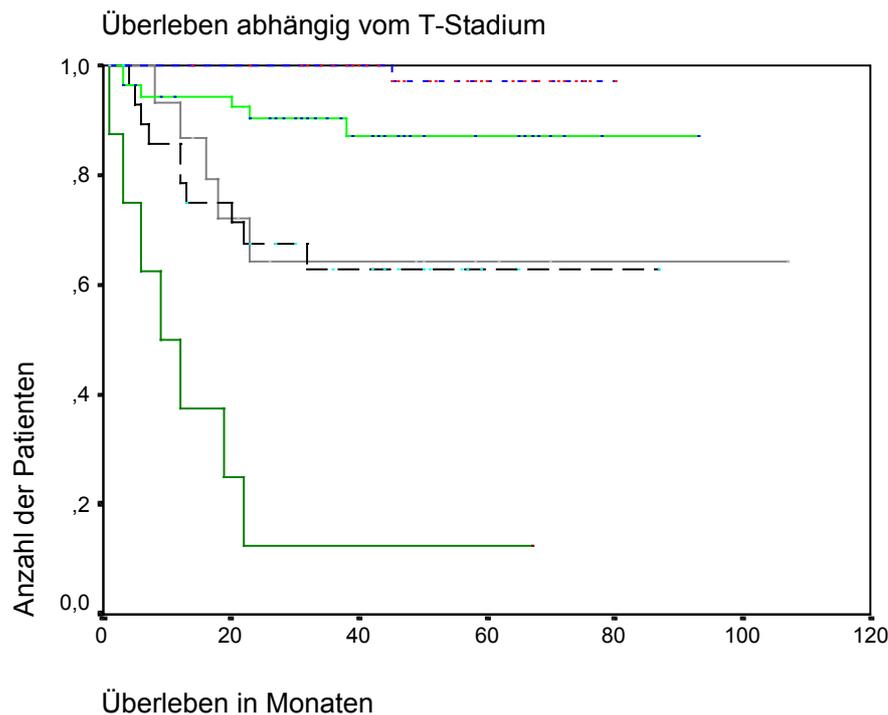


Diagramm 31

Überleben von 160 Blasen-tumorpatienten aufgeteilt nach dem T-Stadium Kaplan-Meier-Kurve von oben nach unten:

blau gepunktet: T0, hellgrün: T1, grau: T3, schwarz gestrichelt: T2, dunkelgrün: T4

Von den 29 an ihrer Blasen-tumorerkrankung verstorbenen Patienten wiesen 19 (65,5%) eine Her2-Überexpression auf, während die restlichen zehn Patienten (34,5%) einen Her2/neu-negativen Tumor hatten. 131 Patienten sind bis zum Ende des jeweiligen Beobachtungszeitraums nicht verstorben. Hier zeigte sich, daß bei den nicht verstorbenen Patienten der prozentuale Anteil der Her2/neu-Überexpression geringer ist als bei den verstorbenen Patienten. Lediglich 44,3% der nicht verstorbenen Patienten wiesen einen Her2/neu-positiven Tumor auf. Hingegen zeigte sich bei 55,7% der nicht verstorbenen Patienten keine Her2/neu-Expression.

In Diagramm 32 wird der größere Anteil der Patienten mit Her2/neu-positiven Tumor an den verstorbenen Patienten deutlich.

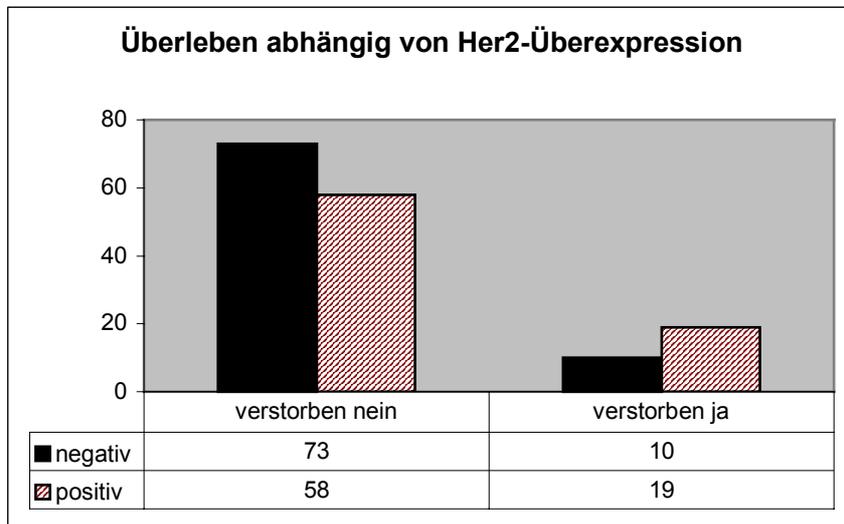


Diagramm 32

Tumorbedingtes Versterben von 160 Patienten mit Harnblasentumor in Abhängigkeit von der immun-histochemischen Positivität von Her2/neu ($p < 0,05$)

schwarz: Her2/neu negative Färbung (0 und 1+), dunkelrot: Her2/neu positive Färbung (2+ und 3+)

Ähnlich wie die progreeßfreie Zeit ist auch das Überleben derjenigen Patienten, die einen Her2/neu-positiven Tumor aufweisen, statistisch signifikant verkürzt (Log-Rank-Test $p=0,0243$). Dies wird in Diagramm 33 deutlich.

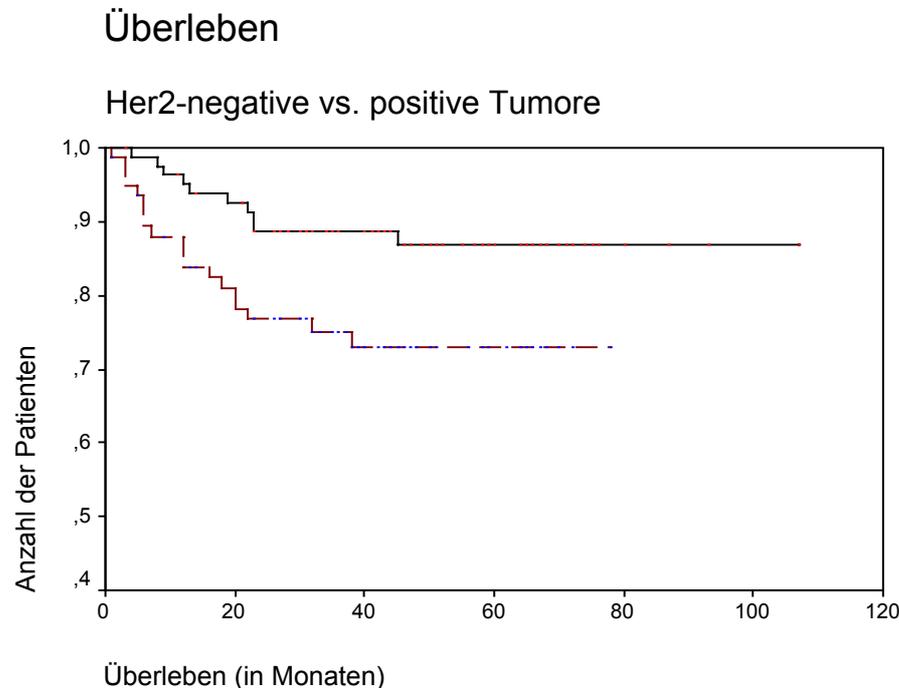


Diagramm 33

Krankheitsspezifisches Überleben von 160 Patienten mit Harnblasentumor aufgeteilt nach der immunohistochemischen Positivität für Her2/neu

Kaplan-Meier-Kurve, Log-Rank-Test: $p=0,0243$

Dunkelrote, gestrichelte Linie: Her2-positive Tumore (2+ und 3+), schwarze Linie: Her2-negative Tumore (0 und 1+)

Die Parameter, die eine prognostische Aussage zum tumorspezifischen Überleben liefern können, ähneln denen, die ein Auftreten eines Progresses vorhersagen können.

So hat das T-Stadium den stärksten Einfluß (Cox-Regression $p<0,001$) auf das Risiko, früher am Harnblasentumor zu versterben. Auch das Geschlecht der Patienten hat einen starken Einfluß ($p=0,002$), gefolgt von der Her2/neu-Überexpression ($p=0,003$).

In den Untergruppen des T-Stadiums, deren Zusammenfassung nach klinischen Gesichtspunkten wichtig ist, zeigt sich nur in der Gruppe T2-T4 ein Einfluss der Her2/neu-Expression ($p<0,05$), nicht jedoch in den anderen Gruppierungen.

Der Einfluß der wichtigen Faktoren lassen sich folgendermaßen zusammenfassen:

das T-Stadium korreliert mit dem Versterben der Patienten ($p=0,01$) und ist unabhängiger Prognosefaktor für ein frühzeitiges Versterben (Cox-Regression $p<0,001$).

Die Her2/neu-Expression weist ebenfalls auf ein frühzeitiges Versterben der Patienten mit Harnblasenkarzinom hin (Kaplan-Meier-Kurve, Log-Rank-Test $p=0,0243$). Zudem ist es unabhängiger Prädiktor für das Überleben der Patienten (Cox-Regression $p=0,003$).

3.2.4 Immunhistochemischer Nachweis des Her2/neu-Onkoprotein in benignem Gewebe

In benignem Gewebe ließ sich praktisch nie eine Überexpression des Protoonkogen Her2/neu nachweisen. So waren 147 (98%) der 150 gefärbten Schnitte mit benignem Gewebe negativ (98 waren Score 0, 49 Score 1+). Nur einer der drei positiven Schnitte wies eine stark positive Färbung auf (Score 3+).

Diese drei Schnitte waren im Gegensatz zu den anderen verwendeten Gewebeproben, die entweder aus einer Probiopsie bei transurethraler Resektion (TUR) oder aus anhängender, unveränderter Schleimhaut bei Zystektomiepräparaten bestanden, histologische Schnitte von Harnleitern, die bei der pathologischen Begutachtung der Zystektomiepräparate angefertigt wurden. Diese wurden mitgefärbt, da kein normales, benignes Urothel vorhanden war.

Diese Schnitte weisen im Gegensatz zu der meist klaren membrangebundenen Färbung der Her2/neu-positiven Tumoren lediglich eine sehr starke zytoplasmatische Färbung auf.

3.3 Gemeinsame Expression von Bcl2 und Her2/neu

Zuletzt soll noch ein kurzer Überblick über die Untersuchung bei gemeinsamer Expression beider Onkoproteine gegeben werden.

Bei 42 (26,3%) der 160 Patienten, bei denen sowohl das Onkoprotein Bcl2 als auch Her2/neu untersucht wurde, waren beide Parameter immunhistochemisch positiv. Allerdings bestand kein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen der positiven Färbung von Bcl2 und Her2/neu ($p > 0,05$).

Wie die obige Untersuchung aber gezeigt hat, war die Differenzierung in basales oder diffuses Verteilungsmuster bei der Untersuchung der Bcl2-Expression am wichtigsten, so daß dieses auch berücksichtigt werden soll. So war bei 22 (13,8%) der 160 untersuchten Tumoren ein diffuses Verteilungsmuster bei der Bcl2-Färbung und eine positive Färbung bei der Her2-Färbung vorhanden ($p > 0,05$). Für alle klinischen Parameter außer dem pathologischen Progreß (Log-Rank-Test $p = 0,7677$) trat eine statistisch signifikante Risikoerhöhung ein, wenn beide Onkoproteine überexprimiert und dabei Bcl2 diffus verteilt war (jeweils $p < 0,05$).

Wurden nur die Expression beider Onkoproteine untersucht und die Verteilung der Bcl2-positiven Tumoren außer Acht gelassen, war zwar der Einfluß auf Rezidivneigung und Risiko für einen Progreß weiterhin statistisch signifikant ($p = 0,0204$ bzw. $p = 0,0282$), jedoch verlor sich jetzt der Einfluß auf das Überleben ($p = 0,1586$).

Dieser Zusammenhang soll exemplarisch in Diagramm 34 gezeigt werden, in dem das frühere Versterben derjenigen Patienten mit Her2-positiven und Bcl2-diffus-positiven Tumoren deutlich wird.

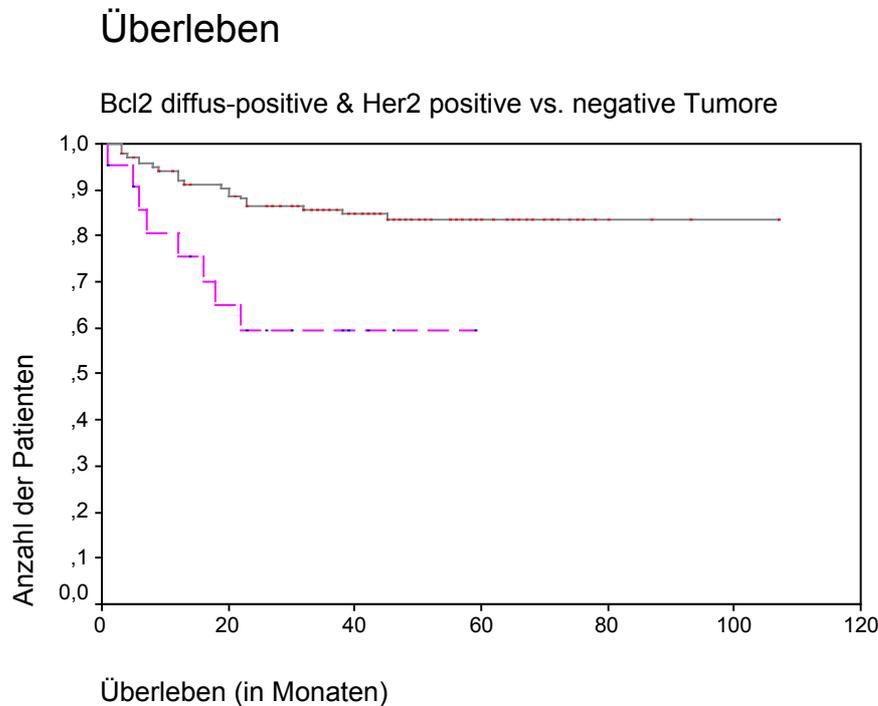


Diagramm 34

Tumorspezifisches Überleben von 160 Patienten mit Harnblasentumoren aufgeteilt nach der gemeinsamen Überexpression von Bcl2 und Her2/neu

Kaplan-Meier-Kurve, Log-Rank-Test $p=0,0026$

**rosa, gestrichelte Linie: Bcl2 diffus-positiv (1 und 2) & Her2 positiv (2+ und 3+),
graue Linie: Bcl2 negativ (0) & Her2/neu negativ (0 und 1+) Tumore**

In der Cox-Regressionsanalyse ist die gemeinsame Expression für die untersuchten Ereignisse Rezidiv und Progreß immer statistisch signifikanter unabhängiger Prognosefaktor, für das Überleben nur bei gemeinsamer Expression und diffusem Verteilungsmuster von Bcl2.

Bei den Untergruppen der T-Stadien mußten bei der statistischen Analyse gewisse Einschränkungen in Kauf genommen werden, da in einzelnen Gruppe keine gemeinsame Expression der beiden Onkogene vorhanden war oder keines der zu untersuchenden Ereignisse eingetreten ist.

In den möglichen Untergruppen wurde die immunhistochemische Befundkonstellation getrennt für Her2/neu-positiv und für Bcl2-positiv einerseits und für Her2/neu-positiv und Bcl2-positiv mit diffusem Verteilungsmuster andererseits untersucht.

Es ergab sich ein recht einheitliches Bild:

für alle drei Ereignisse (Rezidiv, Progrefß und Überleben) zeigte die Expression beider Onkoproteine mit oder ohne diffuser Verteilung von Bcl2 jeweils ein verfrühtes Auftreten des jeweiligen Ereignisses in der Untergruppe der muskelinvasiven Tumoren (Kaplan-Meier, Log-Rank-Test jeweils $p < 0,05$), jedoch nicht in der Gruppe der oberflächlichen Tumoren (Kaplan-Meier, Log-Rank-Test jeweils $p > 0,05$). Der Übersichtlichkeit halber befinden sich die genauen p-Werte im Anhang (siehe Tabelle 1 des Anhangs).

Zuletzt wurde noch für die möglichen Untergruppen eine Analyse der gemeinsamen Expression von Her2/neu und Bcl2 als unabhängige Prognosefaktoren berechnet. Die gemeinsame Expression ist in der Untergruppe der muskelinvasiven Tumoren unabhängiger Prognosefaktor (Cox-Regression, jeweils $p < 0,05$), jedoch nicht in der jeweiligen Gruppe der oberflächlichen Tumoren (Cox-Regression, jeweils $p > 0,05$). Eine Übersicht befindet sich ebenfalls im Anhang (siehe Tabelle 2 des Anhangs).

Zusammenfassend kann gesagt werden, daß die gemeinsame Expression beider Onkoproteine, wobei die Kombination von gleichzeitiger Expression von Her2/neu und Bcl2 mit diffuser Verteilung am sinnvollsten erscheint, für die drei untersuchten Ereignisse sowohl in der Überlebensanalyse nach Kaplan-Meier, als auch in der Berechnung der unabhängigen Prognosefaktoren durch die Regressionsanalyse nach Cox einen statistisch signifikanten Einfluß zeigt.

In den Untergruppen der T-Stadien ist die gemeinsame Expression von Her2/neu und Bcl2 nur in den muskelinvasiven Tumorstadien als unabhängiger Prognosefaktor zu werten.

Der Nachweis beider Onkoproteine ist also unabhängiger Prädiktor, ist jedoch der alleinigen Bestimmung einer Her2/neu-Überexpression nicht überlegen, da diese ebenfalls als unabhängiger Prädiktor im gesamten Kollektiv einerseits und in den muskelinvasiven T-Stadien andererseits fungiert und somit zur Risikoabschätzung ausreicht.

Eine Bestimmung mehrerer immunhistochemischer Faktoren ist durch die alleinige Bestimmung der Her2/neu-Expression möglicherweise unnötig.

4 Diskussion

Die Ergebnisse der immunhistochemischen Untersuchung der beiden Onkoproteine ergab eine einheitliche Aussage: Der wichtigste Prognosefaktor zur Risikovorhersage sowohl eines Rezidives, Progresses als auch des tumorbedingten Versterbens ist und bleibt das T-Stadium, also die Infiltrationstiefe des Tumors.

Die Überexpression eines der beiden Onkoproteine zeigte unterschiedliche Ergebnisse und nimmt auch eine unterschiedliche Stellung bezüglich ihrer Wertigkeit als unabhängiger Prognosefaktor ein. Daher sollen Bcl2 und Her2/neu getrennt diskutiert werden.

4.1 Diskussion der Untersuchung des Onkoproteins Bcl2

4.1.1 Aktuelle Datenlage

Die Datenlage zur Expression des Onkoproteins Bcl2 und dessen Wertigkeit als Prognosefaktor ist uneinheitlich:

So gibt es Arbeiten, die bei einer sehr geringen Anzahl der untersuchten Blasen tumorproben eine Bcl2-Expression nachweisen (*King et al. 1996, S.316*: Bcl2-Überexpression bei 5,3%; *Kirsh et al. 1998, S.1350*: Bcl2-Überexpression bei 7%). Der Großteil der anderen Arbeiten findet aber weit mehr Harnblasenkarzinome mit Bcl2-Überexpression. Die meisten Untersuchungen ergeben, daß zwischen 41% (*Liukkonen et al. 1997 S.1*) und 68% der Tumore (*Lipponen et al. 1996, S.137*) Bcl2 überexprimieren. Bei unserer Untersuchung wurde eine Bcl2-Überexpression bei 47,8% der Harnblasenkarzinome gefunden.

Ebenso variiert die Zahl der untersuchten Proben bzw. Patienten. Teilweise wurden nur sehr wenige Proben untersucht (*Furihata et al. 1996, S.134*: 21 Patienten, *Lu et al. 1998, S.29*: 29 Patienten). Das größte Patientenkollektiv findet sich bei Liukkonen (*Liukkonen et al. 1997, S.2*) mit 185 Patienten. Da die Anzahl der untersuchten Proben wichtigen Einfluß auf eine valide statistische Auswertung hat, haben wir Proben von 201 Patienten in unsere Untersuchung der Bcl2-Expression einbezogen.

Ebenso uneinheitlich sind die Aussagen bezüglich pathologischer und klinischer Parameter. Viele Arbeiten finden weder eine Assoziation von Bcl2 und T-Stadium und/oder Differenzierungsgrad der Tumore (*Glick et al. 1996, S.1755*; *Lu et al. 1997, S.30*; *Kirsh et al. 1998, S.1350*) und somit oft auch keinen Einfluß auf das tumorbedingte Versterben (*Cooke et al.*

2000, S.831). Andere Untersucher finden eine negative Korrelation zwischen Bcl2- und T-Stadium und/oder Differenzierungsgrad und Überexpression (*Shiina et al. 1996, S.397; Nakopolou et al. 1998, S.149*).

Andererseits wird in vielen Arbeiten ein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen Bcl2-Überexpression und T-Stadium und/oder Differenzierungsgrad beschrieben (*King et al. 1996, S.319; Liukkonen et al. 1997, S.3*).

Auch findet sich bei vielen Arbeiten ein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen Bcl2-Überexpression und Auftreten von Rezidiven und/oder tumorbedingtem Versterben (*Ong et al. 2001, S.171-172; Wolf et al. 2001 bei T1/G3-Tumoren, S.332*). Lipponen beschreibt eine Korrelation zwischen Bcl2-Expression und T-Stadium, Grading und Überleben, wenn nur die positiven Tumorzellen mit nicht-basaler Verteilung beachtet werden (*Lipponen et al. 1996, S.137-138*); allerdings bestätigt sich dieser Zusammenhang nicht mehr in multivariater Analyse.

4.1.2 Diskussion unserer Ergebnisse

Die Untersuchung des noch nicht maligne veränderten Urothels hat eine fast durchwegs vorhandene Anfärbung der basalen Zellschichten ergeben. Diese Expression von Bcl2 in den unteren Zellschichten ist scheinbar physiologisch und hat keinen Zusammenhang zu einer möglichen Entartung des Urothels, da sie einheitlich bei Bcl2-positiven wie auch Bcl2-negativen Tumoren auftritt, aber auch einheitlich im Urothel gesunder Patienten gefunden wird (*Li et al. 1998, S.236*).

Dies scheint auf die physiologische Aufgabe von Bcl2 hinzuweisen, die unteren Zellschichten, von denen Wachstum und Differenzierung des Urothels ausgehen, vor einem vorzeitigen Zelltod zu bewahren. Diese Aufgabe erfüllt Bcl2 durch die Hemmung der Apoptose. Auch in den Epithelien anderer Organe wie kolorektaler oder zervikaler Schleimhaut wurde dieser Befund erhoben und mit der antiapoptotischen Potenz von Bcl2 in Verbindung gebracht (*Kaklamanis et al. 1996, S.11ff.; bzw. Harmsel et al. 1996, S.28*).

Ebenso läßt sich dadurch die Abwesenheit von Bcl2 in den oberen Zellschichten des Urothels gut erklären, da der antiapoptotische Effekt hier nicht mehr erwünscht ist: die Zellen sind differenziert und dürfen, sobald sie ihre Aufgabe erfüllt haben, zugrunde gehen, damit sie durch neue, leistungsfähigere Zellen ersetzt werden können.

Maligne Neoplasien können auf vielerlei Weise entstehen. Einer der möglichen Auslösemechanismen für unkontrolliertes Wachstum könnte eine verminderte Hemmung der physiologischen Apoptose sein. Daran ist das Onkogen Bcl2 sicher auch beteiligt.

Wir haben bei knapp 48% der Harnblasenkarzinome eine Bcl2 Überexpression nachgewiesen. Von diesen waren 65% moderat positiv und 35% stark positiv.

Es bestand ein deutlicher Zusammenhang zwischen T-Stadium und dem Bcl2-Nachweis. Dieser Zusammenhang war auch für den Differenzierungsgrad signifikant. Es zeigte sich aber, daß hier der entscheidende Einfluß nicht von der Intensität (also „moderat“ oder „stark positiv“) ausging, sondern lediglich, ob Bcl2 vorhanden war oder nicht. Dies läßt sich unter der unten ausführlich dargestellten Annahme erklären, daß Bcl2 nicht an sich ein malignes Potential mit Wachstumsreiz besitzt, sondern eher den Boden für das Wirken anderer Faktoren bereitet:

Das Onkoprotein Bcl2 scheint nicht der alleinige Faktor für verlängertes Lebens bestimmter Zellen und deren Verharren in der G0-Phase zu sein.

Dies wird an zwei Tatsachen deutlich: der Abwesenheit von Bcl2 in einem Teil der von uns untersuchten Harnblasenkarzinome und der mangelnden Aussagekraft des Bcl2-Nachweises als unabhängiger prognostischer Faktor bezüglich der von uns gewählten klinischen Fragestellung.

Über die Hälfte der von uns untersuchten Harnblasenkarzinome wies überhaupt keine oder eine nur sehr geringe Bcl2-Expression auf. Hier müssen andere Faktoren und Mechanismen zu Wachstumsreiz oder Selektion der malignen Zellen geführt haben.

Da Bcl2 aber wie oben beschrieben sogar physiologisch in gesundem Urothel vorkommt, müßte es auch in diesem nun veränderten Urothel vorhanden sein. Das Modell der „Mehrschrittkarzinogenese“ geht von der schrittweisen Akkumulation genetischer Veränderung aus, die zu einer Labilität des Urothels führen, die sowohl zu einer Anhäufung als auch zu einem Verlust bestimmter Produkte wie hier Bcl2 führen kann (*Grimm et al. 1998, S.808*). So ist es erklärbar, daß Bcl2 zwar in unverändertem Urothel vorhanden ist, jedoch in einem Teil der Harnblasentumoren nicht mehr nachweisbar ist. Dies bestätigt sich in der häufigen Beobachtung, daß das normale Urothel in unmittelbarer Umgebung des Tumors noch in den basalen Zellschichten Bcl2 exprimiert, im Tumor Bcl2 aber nicht mehr nachweisbar ist.

In den übrigen 48% der Tumoren war Bcl2 nachweisbar. Wie im Ergebnisteil beschrieben, nimmt weder das alleinige Vorhandensein von Bcl2, noch die Intensität der Bcl2-Expression

einen statistischen Einfluß auf Rezidivhäufigkeit, Auftreten eines Progresses oder tumorbedingtes Versterben.

In einem Teil der Bcl2-positiven Tumoren ließ sich eine definierte Bande der positiven Zellen nachweisen. Diese war meist dem Lumen abgeneigt, so daß dies dem Färbeverhalten in normalem Urothel sehr ähnlich war. Auf Grund dieser Tatsache haben wir dieses Färbeverhalten „basal“ wie in unverändertem Urothel genannt.

Wie die statistische Analyse gezeigt hat, hatte ein Tumor der dieses basale Verteilungsmuster der Bcl2-positiven Zellen aufwies, keine schlechtere Prognose als ein Bcl2-negativer Tumor.

Dieses Ergebnis und der Befund, daß das basale Verteilungsmuster meist in oberflächlichen Tumoren nachweisbar war, legt den Schluß nahe, daß eine Tumorentstehung in einem Urothel stattgefunden hat, das zumindest das Onkoprotein Bcl2 betreffend noch dem unverändertem Urothel entsprach. Bcl2 scheint hier keinen entscheidenden Einfluß auf die Tumorentwicklung genommen zu haben.

Anders sieht das Ergebnis aus, wenn die Bcl2-Expression nicht mehr auf die ursprünglichen basalen Zellschichten beschränkt war, sondern ein diffuses Verteilungsbild aufwies.

War dies der Fall, hatten die Patienten eine schlechtere Prognose. Bei ihnen trat früher ein Progreß auf und sie verstarben früher an ihrem Harnblasentumor. Dieses Ergebnis war zumindest in univariater Analyse statistisch signifikant. Wurden in die Analyse allerdings die starken prognostischen Faktoren wie T-Stadium mit einbezogen, war diese Aussage nicht mehr haltbar. Bcl2-Expression und T-Stadium waren zu stark von einander abhängig, als daß wir eine Bcl2-Überexpression als unabhängigen prognostischen Faktor etablieren konnten.

Das diffuse Verteilungsmuster legt den Schluß nahe, daß gerade durch die antiapoptotische Wirkung der Bcl2-Überexpression ein verlängertes Überleben und somit eine Selektion dieser Zellen stattgefunden hat. Diese Zellen überleben solange, bis andere Wachstumsfaktoren ihr Wachstum wieder fördern können. Jetzt kann ein pathologisches Wachstum dieser Zellklone auftreten. Auf diese Weise sind nun diese Tumorzellen auf die ganze Tumormasse verteilt und erscheinen in der immunhistochemischen Färbung als diffus angeordnet.

Neben dieser Stimulation durch andere Wachstumsreize gibt es noch einen weiteren Grund für die Malignität dieser selektierten Zellen. Die Bcl2-positiven Zellen überleben solange, daß sich chromosomale Mutationen anhäufen, die dann das eigentliche maligne Potential dieser Zellen bedeuten. Jetzt können verschiedene Faktoren ein ungehindertes Wachstum bewirken.

Dies kann zu einer Zunahme der Tumormasse, zu rezidivierenden und invasiveren Tumoren, aber auch Metastasierung und damit zum Tod der Patienten führen.

Bcl2 scheint also eher ein frühes Ereignis der Karzinogenese zu sein, das durch den Überlebensvorteil bestimmter Zellen eine Basis für die Wirkung anderer molekularer Faktoren schafft (*Li et al. 1998, S.239*).

Unter dieser Annahme kann erklärt werden, daß ein Bcl2-positiver Tumor ein aggressiveres Verhalten aufweist als ein Bcl2-negativer Tumor, obwohl dieses Onkoprotein nicht eigentliche Ursache dafür ist. Unter diesem Hintergrund kann man den Einfluß von Bcl2 auf das frühe Auftreten eines Progresses und frühes Versterben verstehen. Der mangelnde Einfluß auf das Auftreten eines Rezidives wird aber auch unter der oben beschriebenen Annahme erklärbar, wenn man annimmt, daß das Onkoprotein Bcl2 nicht der eigentliche Wachstumsfaktor ist, sondern eben nur Zellen für die Wirkung anderer Faktoren bereitstellt. Wie und wann diese wirken, kann ein Nachweis der Bcl2-Überexpression nicht voraussagen.

Das gleiche gilt für den pathologischen Progreß. Hier würde eine gesteigerte Aggressivität der Tumoren eine Zunahme der Infiltrationstiefe des rezidivierenden Tumors bewirken. Einerseits war die Anzahl derjenigen Patienten, die einen pathologischen Progreß erlitten haben, für eine abschließende Aussage über die mögliche Beteiligung von Bcl2 zu gering. Andererseits kann wieder die oben angeführte Erklärung dafür gegeben werden, daß Bcl2 nicht der eigentliche Promotor ist. Ein weiterer Faktor, der die Wertigkeit des pathologischen Progreß einschränkt, ist die Tatsache, daß die exakte Bestimmung des T-Stadiums nicht immer möglich ist: so beschreibt Yaman, daß eine korrekte Bestimmung des T-Stadiums nur bei 46% der Patienten, die mit transurethraler Resektion behandelt wurden, möglich war (*Yaman et al. 1996, S.198*). Dies schränkt die Aussagemöglichkeit der rein histopathologischen Parameter ein, da sowohl eine Unter- als auch Überbewertung des T-Stadiums eine Berechnung des rein pathologischen Progresses negativ beeinflussen kann. So könnte ein schon muskelinvasiver Tumor als oberflächlicher Tumor unterbewertet werden und wird, falls er jetzt als ebenfalls muskelinvasiver Tumor rezidiviert, zu Unrecht als pathologischer Progreß gewertet. Der gegenteilige Fall ist auch denkbar. Daher haben wir uns in unserer Arbeit auf diejenige Form des Progresses festgelegt, die als Endpunkt den pathologischen Progreß, aber auch das Auftreten von Metastasen und den tumorbedingten Tod definiert, so daß die Wertigkeit der Unter- und Überbewertung des Tumors minimiert wird und das krankheitsspezifische Verhalten des Tumors betont wird.

Zu einem unserem sehr ähnlichen Ergebnis kommt Lipponen, der auch die Bedeutung der nicht-basalen Zellen betont. Lipponen findet ebenso wie wir eine positive Assoziation von pathologischen und klinischen Parametern mit einer Bcl2-Überexpression und kann auch keinen statistisch signifikanten Einfluß von Bcl2 in multivariater Analyse bestätigen (*Lipponen et al. 1996, S.138*).

Eine Untergliederung der Patienten in verschiedene Untergruppen des T-Stadiums hat ebenfalls nicht den erwünschten Erfolg gebracht, die Expression von Bcl2 in bestimmten Kollektiven als Prognosefaktor zu etablieren.

So kann der Nachweis einer diffus verteilten Expression von Bcl2 möglicherweise als Hinweis für eine Krankheitsverschlechterung im gesamten Patientenkollektiv gewertet werden. Eine Selektion von Patienten, die von einer immunhistochemischen Untersuchung bezüglich Bcl2 profitieren können, scheint also nicht möglich zu sein.

4.2 Diskussion der Untersuchung des Onkoproteins Her2/neu

4.2.1 Aktuelle Datenlage

Die Untersuchungen über die Expression des Onkoprotein Her2/neu bei Harnblasenkarzinomen ergeben ein uneinheitliches Bild. Diese Forschungsergebnisse differieren ähnlich wie diejenigen über das Onkoprotein Bcl2. Allerdings hat Her2/neu schon die Aufnahme in die Sekundärliteratur gefunden (*Grimm et al. 1998, S.828; Korman et al. 1997, S. 257*) und wird zusammen mit „ras“ und dem „epidermal growth factor receptor“ (EGFR) als das wichtigste Onkogen beim Harnblasenkarzinom bezeichnet (*Brandau et al. 2001, S.492*).

Wie schon Untersuchungen des Onkoprotein Bcl2 gezeigt haben, herrscht keine Einigkeit darüber, wie hoch derjenige Anteil der Harnblasenkarzinome ist, die Her2/neu-exprimieren. So schwanken die Angaben zwischen 8% (*Tetu et al. 1996, S.1786*) und 74% (*Zhau et al. 1990 aus Rübber, 1998 S.829*). Diese beiden Extremwerte sind aber sicher nicht repräsentativ, da die Untersuchungen späterer Jahre meist Zahlen zwischen ungefähr 34% (*Ye et al. 1993, S.40*) und 53% (*Haitel et al. 2001, S.1482*) ergeben haben.

Unser Ergebnis mit 48,5% positiver Tumore scheint wieder im Mittelfeld, wenn auch in der oberen Hälfte, zu liegen.

Wenn sich jedoch eine Tendenz dorthin gehend abzeichnet, daß der Nachweis einer Her2/neu-Überexpression mit einer schlechteren Prognose in Verbindung gebracht wird (*Haitel et al. 2001, S.1484; Gorgoulis et al. 1995, S.761*), so wurde auch das gegenteilige Ergebnis, daß Patienten mit Her2/neu-negativem Tumor die schlechteren Aussichten haben, beschrieben (*Ravery et al. 1997, S.14*).

Die Zahl der untersuchten Patientenproben ist wie bei den Bcl2-Studien sehr unterschiedlich.

Auf die möglichen Ursachen der unterschiedlich ausfallenden Ergebnisse wird bei der Begründung unserer Ergebnisse eingegangen.

4.2.2 Diskussion unserer Ergebnisse

Wir haben 163 Harnblasenkarzinome auf die Expression von Her2/neu untersucht und haben bei 79 Tumoren eine Expression von Her2/neu gefunden. Diese war in 30,7% der Fälle moderat und in 17,8% der Fälle stark positiv ausgeprägt.

In normalem Urothel konnten wir praktisch keine Expression von Her2/neu nachweisen. 98% der untersuchten benignen Gewebe wiesen keine oder nur eine sehr schwache Färbung auf. Bei den drei Schnitten, die einen positive Nachweis gezeigt haben, handelte es sich anders als bei den anderen Geweben um Schnitte der Harnleiter. Diese weisen aber scheinbar im Gegensatz zu normalem Urothel oft eine Her2/neu-Expression auf (*Mellon et al. 1996, S.324*). In der Literatur findet sich überwiegend eine Übereinstimmung über die Abwesenheit von Her2/neu in normalem Urothel (*Ye et al. 1993, S.40; Kee et al. 2001, S.580*). Die Tatsache, daß Her2/neu nicht in normalem Urothel nachgewiesen werden kann, kann möglicherweise die Annahme bestätigen, daß das Onkoprotein Her2/neu an der Entstehung von Tumoren beteiligt ist, aber keinen offensichtlichen, physiologischen Zweck im gesunden Urothel erfüllt. Diese Annahme wird durch den Befund gestützt, daß die Intensität der immunhistochemischen Her2/neu-Färbung vom Her2/neu-negativen, unverändertem Urothel über dysplastische Veränderung hin zum invasiven Karzinom zunimmt (*Kee et al. 2001, S.581*). Jedoch scheint diese Aussage auf das jeweilige Gewebe limitiert zu sein, da z.B. in normaler Mukosa des Kolons ein hoher Anteil von Her2/neu nachgewiesen werden kann (*Cohen et al. 1989, S. 82*).

Wie im Ergebnisteil beschrieben, konnten wir mit vielen klinischen Parametern eine positive Assoziation zu der Überexpression von Her2/neu nachweisen. Diese war aber nicht abhängig von der Intensität der immunhistochemischen Färbung, sondern nur davon, ob Her2/neu vorhanden war oder nicht. Das Verfahren der Immunhistochemie sei zwar ein geeigneter Weg, generell eine Überexpression von Her2/neu nachzuweisen, allerdings stimme der Grad der Intensität der Membranfärbung nicht mit der Menge des Her2/neu-Proteins überein, die im Western Blot nachgewiesen werden kann (*Tannapfel et al. 1996, S.157*). Trotzdem besteht einigen Studien zufolge eine gute Übereinstimmung von vorhandener Genamplifikation (Southern Blot), nachgewiesener mRNA-Menge (Northern Blot) und dem Anteil der immunhistochemisch positiven Zellen (*Coombs et al. 1991, S.606*). Obwohl zwar diese Aussage nicht von allen Studien geteilt wird (*Lipponen et al. 1991, S.241*), besteht gemeinsame Übereinstimmung darin, dass das Produkt, also das Onkoprotein Her2/neu, die biologische Wirkung vermittelt und nicht die Genamplifikation. Ein Zusammenfassung der beiden positiven Bewertungen „Score 2+“ und „Score 3+“ ist also möglich und sinnvoll.

Wenn wir dieses Bewertungsschema angewandt haben, bedeutete die Expression von Her2/neu ein erhöhtes Risiko für ein Rezidiv, einen Progress der Krankheit und ein früheres Versterben der Patienten. Eine Assoziation von Her2/neu bestand weder zu dem T-Stadium noch zum Differenzierungsgrad. Der pathologische Progress unterliegt wieder der geringen Aussagekraft, die schon bei der Diskussion der Bcl2-Expression festgestellt wurde. Daher ist auch dessen mangelnde Assoziation mit der Expression von Her2/neu nicht verwunderlich und soll auch nicht in die Beurteilung des biologischen Verhaltens der Her2/neu-positiven Tumoren mit einfließen.

Eine Korrelation der Her2/neu-Expression und des T-Stadiums bestand nicht. Wäre diese vorhanden, könnte man allein durch die mit Her2/neu-assoziierte Zunahme der Infiltrationstiefe ein aggressives biologisches Verhalten der Her2/neu-positiven Tumoren erklären. Bei uns zeigten jedoch die T1-Tumoren einen besonders hohen Anteil an Her2/neu-positiven Tumoren. Betrachtet man die Wahrscheinlichkeit für einen Progress von einem oberflächlichen zu einem muskelinvasiven Tumor getrennt für Ta-Tumoren und T1-Tumore, zeigt sich dass Ta-Tumore mit einer Wahrscheinlichkeit von 0-4%, T1-Tumore aber in 27-46% der Fälle ein nun muskelinvasives Rezidiv zeigen (*Korman et al. 1997, S.258*). Ein solcher Befund könnte mit dem unterschiedlichen Expressionsverhalten verschiedener molekularer Marker in Verbindung gebracht werden. Moch et al. kommen zu dem gleichen Ergebnis und begründen dieses Phänomen mit der Annahme, dass „die Überexpression von Her2/neu ein kennzeichnender früher Schritt der Tumorentwicklung vom nicht-invasiven zum invasiven Phenotyp“ (*Moch et al. 1993, S.332*) sei. In einer anderen Studie wurde lediglich eine höhere Rezidivrate von Her2/neu-positiven T1-Tumoren festgestellt, wohingegen Her2/neu-positive Tumoren mit anderem T-Stadium dieses Verhalten nicht zeigten (*Mellon et al. 1996, S.323*).

Die Expression von Her2/neu konnte nicht in Zusammenhang mit dem Differenzierungsgrad der Tumoren gebracht werden. Jedoch zeigten sich in den entdifferenzierten Tumoren (Differenzierungsgrad III und IV) ein zu den Her2/neu-Positivität hin verschobenes Verhältnis: 44,6% der Tumoren waren Her2/neu-negativ, während 55,4% Her2/neu-positiv waren. Diese auch geringe Verschiebung des Verhältnisses von negativen und positiven Tumoren mag zu der Zunahme der Aggressivität der Her2/neu-positiven Harnblasenkarzinome führen, wenn man beachtet, dass bei oberflächlichen Tumoren des Differenzierungsgrades II ein 10-Jahres-Überleben von 87%, der Differenzierungsgrad III aber nur von 35% bedeutet (*Korman et al. 1997, S.256*).

Gerade aber wegen des mangelnden Zusammenhangs zwischen Her2/neu und T-Stadium oder Differenzierungsgrad kann das Onkoprotein Her2/neu einen statistisch signifikanten Einfluss auf die klinischen Parameter in der multivariaten Analyse nach Cox gewinnen. In dieser Analyse war trotzdem das T-Stadium der wichtigste Einflussfaktor (nicht bei der Risikoberechnung eines Rezidives), jedoch immer gefolgt von der Überexpression von Her2/neu.

Der wichtigste und bedeutendste Parameter für die Beurteilung einer Krankheit ist immer noch das Überleben der Patienten. Dabei lebten die Patienten, die einen Her2/neu-positiven Tumor aufwiesen, durchschnittlich noch 12,7 Monate nach der Operation und damit 5,1 Monate kürzer als die Patienten mit einem Her2/neu-negativen Tumor. Der Tod dieser Patienten wurde direkt auf den Harnblasentumor zurückgeführt. Die Ursache waren meist Metastasen oder Infiltration benachbarter Organe. Aufgrund unserer Datenlage konnten wir den Zusammenhang zwischen Metastasierung zum Zeitpunkt der Operation und Her2/neu-Expression nicht untersuchen, dafür beschreiben aber andere Studien diese Beziehung (*Moch et al. 1993, S.332*). Jedoch beinhaltet unsere Definition des Progresses der Krankheit das spätere Auftreten von Metastasen und deren mögliche Beteiligung am Versterben der Patienten. Hier konnte ein starker Einfluss von Her2/neu nachgewiesen werden.

Da auch Rezidive bei Patienten, die ursprünglich einen Her2/neu-positiven Tumor aufwiesen, früher auftraten, kann daraus gefolgert werden, dass Her2/neu an der Instabilität des Urothels beteiligt ist, da die Rezidive meist keine Lokalrezidive waren, sondern an einer anderen Stelle der Harnblase auftraten.

Einige Autoren schließen aus der Tatsache, dass Her2/neu erst in malignen Neoplasien, noch nicht aber in dysplastischen Veränderungen nachweisbar ist, dass das Auftreten von Her2/neu ein spätes Ereignis in der Karzinogenese des Harnblasenkarzinoms ist (*Gorgoulis et al. 1995, S. 763; Kee et al. 2001, S.581*).

Manche Arbeiten haben auch die Expression anderer Mitglieder der Her-Familie wie Her3 oder Her4 untersucht und kommen zu dem Ergebnis, dass zwar das Expressionsprofil der anderen Rezeptoren wichtigen Hinweis auf das Verhalten der Harnblasentumore geben kann (*Chow et al. 2001, S.1959*), da aber Her2/neu der wichtigste Partner der Heterodimerisierung ist, kann ein Nachweis der Her2/neu-Expression allein auch wichtigen Aufschluss über das mögliche Verhalten der Harnblasenkarzinome geben (*Klapper et al. 2000, S.49ff*) und damit Ziel einer Behandlung durch therapeutische Antikörper werden (*Klapper et al. 2000, S.57*).

Wie oben beschrieben, sind die Ergebnisse über die Expression von Her2/neu und dessen Wertigkeit als prognostischer Faktor höchst unterschiedlich. Mehrere Arbeiten stimmen mit

der vorliegenden Arbeit überwiegend in der Beurteilung der wichtigen klinischen Parameter in Abhängigkeit der Her2/neu-Expression überein (*Haitel et al. 2001, S.1481; Coombs et al. 1991, S.601; Imai et al. 1995, S. 70; Gorgoulus et al. 1995, S.758; Sato et al. 1992, S.2495*). Trotzdem darf nicht vergessen werden, dass eine direkte Vergleichbarkeit der Ergebnisse nicht immer gewährleistet ist, da einerseits unterschiedliche diagnostische Antikörper verwendet werden, andererseits die Auswertung der immunhistochemischen Färbung unterschiedlich ist. Meist wird die auch von uns gewählte membrangebundene Färbung als einziges Kriterium akzeptiert, es finden sich aber auch Bewertungen, die lediglich eine „deutliche Positivität“ der Zellen als Kriterium benutzen (*Moriyama et al. 1991, S.424*). Auf diese Umstände muss genauso wie auf Unterschiede im Färbeprotokoll geachtet werden.

Unserer Meinung nach kann der Nachweis einer Überexpression von Her2/neu wichtige Hinweise auf eine Verschlechterung der Harnblasentumorerkrankung geben und so mögliche Änderungen des Therapieregimes beeinflussen.

Da ohnehin die muskelinvasiven Tumorstadien einen schlechte Prognose darstellen und in unserer Untersuchung gerade in diesem Kollektiv ein Nachweis von Her2/neu mit einer möglichen Verschlechterung der Erkrankung einhergeht, erscheint die immunhistochemische Untersuchung bezüglich Her2/neu hier besonders wertvoll.

4.3 Diskussion der Untersuchung der gemeinsamen Expression von Bcl2 und Her2/neu

Von insgesamt 160 auf beide Onkoproteine untersuchten Patienten zeigten 42 (26,3%) eine Überexpression beider Marker. Dabei fand sich bei 22 Patienten (13,8%) eine positive Expression von Her2/neu gemeinsam mit einer Überexpression von Bcl2 mit diffusem Expressionsmuster. Das diffuse Verteilungsmuster der Bcl2-Expression hat sich in der alleinigen Untersuchung der Einflußnahme von Bcl2 als sinnvoll erwiesen. Daher soll dieses Kriterium auch hier miteinbezogen werden.

Bei diesen 22 Patienten war die gemeinsame Expression beider Onkoproteine unabhängiger Prognosefaktor für das Auftreten eines Rezidives, Progresses und das Versterben der betroffenen Patienten.

Das T-Stadium war ebenfalls unabhängiger Prädiktor für Progrefreiheit und Überleben, nicht jedoch für die Rezidivfreiheit.

Besonders in den Untergruppen der T-Stadien mit muskelinvasiver Ausprägung ist die gemeinsame Expression von Her2/neu und Bcl2 auffällig und kann hier eine mögliche Verschlechterung der Krankheit anzeigen.

Jedoch spiegeln die hier dargestellten Ergebnisse hauptsächlich den Einfluß der Her2/neu-Überexpression wider. So ist die alleinige Her2/neu-Expression ebenfalls unabhängiger Prognosefaktor für Rezidivfreiheit, Progrefreiheit und Überleben.

Daher erscheint die Bestimmung dieser beiden Parameter als nicht notwendig, da der alleinige Nachweis einer Her2/neu-Überexpression als unabhängiger, prognostischer Faktor Aufschluß über eine mögliche Gefährdung der Patienten geben kann.

5 Zusammenfassung

In die Untersuchung der Expression der beiden Onkoproteine Bcl2 und Her2/neu wurden 201 bzw. 163 Patienten einbezogen. Der Nachweis einer Überexpression der beiden molekularen Marker wurde immunhistochemisch mit Hilfe der LSAB-Methode an histologischen Resektionspräparaten durchgeführt.

Es fand sich für beide Marker ein relativ ähnlich hoher Anteil Bcl2- bzw. Her2/neu-positiver Tumoren. Bei 49,7% wurde eine Überexpression des Onkoproteins Bcl2 festgestellt, während 48,5% als Her2/neu-positiv gewertet wurden.

Trotz dieser ähnlichen Verteilung ergaben sich unterschiedliche Ergebnisse bezüglich pathologischer und klinischer Parameter, aber auch in Bezug auf die Wertigkeit der Onkoproteine als unabhängiger Prognosefaktor.

Während eine Bcl2-Überexpression mit T-Stadium und Differenzierungsgrad der Tumore korrelierte, konnte dieser Zusammenhang bei Her2/neu nicht nachgewiesen werden.

Es ließen sich zwei Expressionsmuster bei dem Nachweis von Bcl2 voneinander abgrenzen. Es zeigte sich einerseits eine basale Verteilung der immunhistochemisch gefärbten Tumorzellen, andererseits waren die Bcl2-positiven Zellen diffus im Tumorgewebe angeordnet. Lediglich das diffuse Expressionsmuster korrelierte mit Rezidivneigung, Progredienz und tumorbedingtem Versterben.

Dieses Ergebnis ließ sich gut mit dem biologischen Verhalten des Onkoprotein Bcl2 erklären. Bcl2 ist auch in den basalen Zellschichten von nicht entarteten Geweben vorhanden und schützt diese Zellschichten, von denen noch physiologisches Wachstum und Differenzierung ausgehen soll, vor einem frühzeitigem Untergang. Die übrigen Zellschichten sollen jedoch nach Erfüllen ihrer Aufgabe durch neue, leistungsfähigere Zellen ersetzt werden. Besteht nun der antiapoptotische Reiz von Bcl2 in diesen Zellen weiter, können sich in diesen Zellen im Sinne der „Mehrschrittkarzinogenese“ genetische Defekte kumulieren und somit eine Entartung der Zellen bewirken. Bcl2 scheint daher ein frühes Ereignis der Karzinogenese zu sein und allein die diffuse Verteilung von Bcl2 hat eine Beziehung zur Malignität der Karzinome.

Wegen der engen Korrelation der Bcl2-Expression mit dem T-Stadium konnte sich die Überexpression von Bcl2 nicht als unabhängiger prognostischer Faktor behaupten.

Die Expression des Onkoproteins Her2/neu korrelierte mit der Tumorprognose (Aufreten eines Rezidives, Progreß und Überleben), es zeigte sich jedoch keine Korrelation mit dem pathologischen Tumorstadium (T-Stadium).

Ebenfalls erwies sich Her2/neu als unabhängiger Prognosefaktor. Diese Wirkung konnte durch das biologische Verhalten von Her2/neu erklärt werden und steht im Einklang mit neueren Forschungsergebnissen.

Her2/neu lässt sich nicht in unverändertem Urothel nachweisen, findet sich jedoch in einem großen Anteil von Harnblasenkarzinomen. Innerhalb der Her2/neu-positiven Tumore ist allein die Anwesenheit von Her2/neu für die weitere Prognose des Patienten relevant, nicht jedoch die immunhistochemisch nachgewiesene Quantität von Her2/neu.

Daher scheint das Onkogen Her2/neu eine eigene Rolle mit Einfluß auf die Labilität des Urothels und damit auf die Karzinogenese zu spielen.

Aus diesen Ergebnissen lässt sich die Wertigkeit der Differenzierung zwischen Her2/neu-negativen und -positiven Harnblasenkarzinomen ableiten. Aufgrund dieser Klassifikation kann eine Modifikation der bekannten Therapieregime vorgenommen werden. Zuletzt steht jedoch diese Unterscheidung auch an der Basis neuer Therapiemöglichkeiten: so ist eine Therapie mittels spezifischer, therapeutischer Antikörper, die am Genprodukt oder direkt am Genort angreifen, denkbar.

6 Literaturangaben

Adams JM, Cory S.

The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival.
Science. 1998 Aug 28;281(5381):1322-6.

Alpert Li, Chao D

Detection of HER-2 overexpression. A new laboratory challenge
Medn Lab Obs. 1999: 28-37

Amundson SA, Myers TG, Fornace AJ Jr.

Roles for p53 in growth arrest and apoptosis: putting on the brakes after genotoxic stress.
Oncogene. 1998 Dec 24;17(25):3287-99.

Asci R, Yildiz L, Sarikaya S, Buyukalpelli R, Yilmaz AF, Kandemir B.

p53 and bcl-2 Overexpression as Associated Risk Factors in Patients 40 Years Old or Less with Transitional Cell Carcinoma of the Bladder.
Urol Int. 2001;67(1):34-40.

Attardi LD, Lowe SW, Brugarolas J, Jacks T.

Transcriptional activation by p53, but not induction of the p21 gene, is essential for oncogene-mediated apoptosis
EMBO J. 1996 Jul 15;15(14):3702-12.

Bissonnette RP, Echeverri F, Mahboubi A, Green DR.

Apoptotic cell death induced by c-myc is inhibited by bcl-2.
Nature. 1992 Oct 8;359(6395):552-4.

Block T, Kriegmair M, Busch M, Weiss M

Harnblasenkarzinom
aus: <http://www.krebsinfo.de/ki/empfehlung/uro/S37.HTM>, 1998

Boise LH, Gonzalez-Garcia M, Postema CE, Ding L, Lindsten T, Turka LA, Mao X, Nunez G, Thompson CB.

bcl-x, a bcl-2-related gene that functions as a dominant regulator of apoptotic cell death.
Cell. 1993 Aug 27;74(4):597-608.

Brandau S, Bohle A.

Bladder cancer. I. Molecular and genetic basis of carcinogenesis.
Eur Urol. 2001 May;39(5):491-7. Review.

Briggs NC, Young TB, Gilchrist KW, Vaillancourt AM, Messing EM.

Age as a predictor of an aggressive clinical course for superficial bladder cancer in men.
Cancer 1992 Mar 15;69(6):1445-51

Canalis E.

Growth factors and their potential clinical value.
J Clin Endocrinol Metab. 1992 Jul;75(1):1-4.

Cattoretti G, Pileri S, Parravicini C, Becker MH, Poggi S, Bifulco C, Key G, D'Amato L, Sabbatini E, Feudale E

Antigen unmasking on formalin-fixed, paraffin-embedded tissue sections.
J Pathol. 1993 Oct;171(2):83-98.

Cattoretti G.

Standardization and reproducibility in diagnostic immunohistochemistry.
Hum Pathol. 1994 Oct;25(10):1107-9.

Chiarugi V, Magnelli L, Cinelli M.

Complex interplay among apoptosis factors: RB, p53, E2F, TGF-beta, cell cycle inhibitors and the bcl2 gene family.
Pharmacol Res. 1997 Apr;35(4):257-61.

Chow NH, Chan SH, Tzai TS, Ho CL, Liu HS.

Expression profiles of erbB family receptors and prognosis in primary transitional cell carcinoma of the urinary bladder.
Clin Cancer Res. 2001 Jul;7(7):1957-62.

Chow NH, Liu HS, Yang HB, Chan SH, Su IJ.

Expression patterns of erbB receptor family in normal urothelium and transitional cell carcinoma. An immunohistochemical study.
Virchows Arch. 1997 Jun;430(6):461-6.

Cleary ML, Smith SD, Sklar J.

Cloning and structural analysis of cDNAs for bcl-2 and a hybrid bcl-2/immunoglobulin transcript resulting from the t(14;18) translocation.
Cell. 1986 Oct 10;47(1):19-28.

Cohen JA, Weiner DB, More KF, Kokai Y, Williams WV, Maguire HC Jr, LiVolsi VA, Greene MI.

Expression pattern of the neu (NGL) gene-encoded growth factor receptor protein (p185neu) in normal and transformed epithelial tissues of the digestive tract.
Oncogene. 1989 Jan;4(1):81-8.

Cooke PW, James ND, Ganesan R, Burton A, Young LS, Wallace DM.

Bcl-2 expression identifies patients with advanced bladder cancer treated by radiotherapy who benefit from neoadjuvant chemotherapy.
BJU Int. 2000 May;85(7):829-35.

Coombs LM, Pigott DA, Sweeney E

Amplification and over-expression of c-erbB-2 in transitional cell carcinoma of the urinary bladder
British journal of Cancer 1991 63(4) s601-8

Cotter TG, Lennon SV, Glynn JG, Martin SJ.

Cell death via apoptosis and its relationship to growth, development and differentiation of both tumour and normal cells.
Anticancer Res. 1990 Sep-Oct;10(5A):1153-9.

Dako

Atlas for Interpretation of HercepTest Staining
aus: www.dako.com, 2001: 1-4

Desoize B.

Anticancer drug resistance and inhibition of apoptosis.
Anticancer Res. 1994 Nov-Dec;14(6A):2291-4. Review.

DiGiovanni M

Clinical Significance of Her2/neu Overexpression
Principles and Practice of Oncology, 1999 13(9), S. 1-14

Droller M

Diagnosis and Staging of Bladder Cancer

in: "Urologic Onkology", Oesterling R., W.B. Saunders Company, Philadelphia, 1997, S. 245-255

Duggan BJ, Maxwell P, Kelly JD, Canning P, Anderson NH, Keane PF, Johnston

The effect of antisense Bcl-2 oligonucleotides on Bcl-2 protein expression and apoptosis in human bladder transitional cell carcinoma.

J Urol. 2001 Sep;166(3):1098-105.

Eissa S, Seada LS.

Quantitation of bcl-2 protein in bladder cancer tissue by enzyme immunoassay: comparison with Western blot and immunohistochemistry.

Clin Chem. 1998 Jul;44(7):1423-9.

Elias JM, Gown AM, Nakamura RM, Wilbur DC, Herman GE, Jaffe ES

Quality control in immunohistochemistry. Report of a workshop sponsored by the Biological Stain Commission.

Am J Clin Pathol. 1989 Dec;92(6):836-43.

Fanidi A, Harrington EA, Evan GI.

Cooperative interaction between c-myc and bcl-2 proto-oncogenes.

Nature. 1992 Oct 8;359(6395):554-6

Fitzpatrick JM, Reda M.

Bladder carcinoma in patients 40 years old or less.

J Urol 1986 Jan;135(1):53-4

Furihata M, Sonobe H, Ohtsuki Y, Yamashita M, Morioka M, Yamamoto A, Terao N, Kuwahara M, Fujisaki N.

Detection of p53 and bcl-2 protein in carcinoma of the renal pelvis and ureter including dysplasia.

J Pathol. 1996 Feb;178(2):133-9.

Gazzaniga P, Gradilone A, Silvestri I, Gandini O, Giuliani L, Vincenzoni A,

Variable levels of bcl-2, bcl-x and bax mRNA in bladder cancer progression.

Oncol Rep. 1998 Jul-Aug;5(4):901-4.

Garnick M. B., Richie J. P.

Urologic Cancer: A Multidisciplinary Perspektive

Plenum Publishing Corporation, 1983

Glick SH, Howell LP, White RW.

Relationship of p53 and bcl-2 to prognosis in muscle-invasive transitional cell carcinoma of the bladder.

J Urol. 1996 May;155(5):1754-7.

Gorgoulis VG, Barbatis C, Poulas I, Karameris AM.

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. 1995 Sep;8(7):758-64.

Grimm M, Schulz W, Ackermann R

Molekulare Grundlagen der Karzinogenese

in: "Uroonkologie", Rübgen H, Springer-Verlag, 1998, 3.Auflage, Kap. 18

Gross A, McDonnell JM, Korsmeyer SJ.

BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis.
Genes Dev. 1999 Aug 1;13(15):1899-911.

Haitel A, Posch B, El-Baz M, Mokhtar AA, Susani M, Ghoneim MA, Marberger M.

Bilharzial related, organ confined, muscle invasive bladder cancer: prognostic value of apoptosis markers, proliferation markers, p53, E-cadherin, epidermal growth factor receptor and c-erbB-2.
J Urol. 2001 May;165(5):1481-7.

Harmsel BT, Smedts F, Kuijpers J, Jeunink M, Trimbos B, Ramaekers F

Bcl2 immunoreactivity increases with severity of CIN: a study of normal cervical epithelial, CIN, an cervical carcinoma
J Pathol 1996 179:26-34

Hautmann R, Humann H

Urologie
Springer Verlag, Berlin, 2001, 2. Auflage

Hockenbery D, Nunez G, Milliman C, Schreiber RD, Korsmeyer SJ.

Bcl-2 is an inner mitochondrial membrane protein that blocks programmed cell death.
Nature. 1990 Nov 22;348(6299):334-6.

Hockenbery DM, Oltvai ZN, Yin XM, Milliman CL, Korsmeyer SJ.

Bcl-2 functions in an antioxidant pathway to prevent apoptosis.
Cell. 1993 Oct 22;75(2):241-51

Hockenbery DM, Zutter M, Hickey W, Nahm M, Korsmeyer SJ.

BCL2 protein is topographically restricted in tissues characterized by apoptotic cell death.
Proc Natl Acad Sci U S A. 1991 Aug 15;88(16):6961-5.

Hockenbery DM.

The bcl-2 oncogene and apoptosis.
Semin Immunol. 1992 Dec;4(6):413-20.

Hunter J, Parslow T

A peptide sequence from Bax that converts Bcl-2 into an activator of apoptosis
J Biol Chem 1996 271, 7440-7444

Imai T, Kimura M, Takeda M, Tomita Y

Significance of epidermal growth factor receptor and c-erbB-2 protein expression in transitional cell cancer of the upper urinary tract for tumour recurrence at the urinary bladder.
Br J Cancer 1995 Jan;71(1):69-72

Ioachim E, Charchanti A, Stavropoulos NE, Skopelitou A, Athanassiou ED, Agnantis NJ

Immunohistochemical expression of retinoblastoma gene product (Rb), p53 protein, MDM2, c-erbB-2, HLA-DR and proliferation indices in human urinary bladder carcinoma.
Histol Histopathol 2000 Jul;15(3):721-7

Jacobson MD, Burne JF, King MP, Miyashita T, Reed JC, Raff MC.

Bcl-2 blocks apoptosis in cells lacking mitochondrial DNA.
Nature. 1993 Jan 28;361(6410):365-9.

Jacobson MD, Burne JF, Raff MC.

Mechanisms of programmed cell death and Bcl-2 protection.
Biochem Soc Trans. 1994 Aug;22(3):600-2.

Jimenez RE, Hussain M, Bianco FJ Jr, Vaishampayan U, Tabazcka P, Sakr WA,

Her-2/neu overexpression in muscle-invasive urothelial carcinoma of the bladder: prognostic significance and comparative analysis in primary and metastatic tumors
Clin Cancer Res. 2001 Aug;7(8):2440-7.

Joensuu H, Pylkkanen L, Toikkanen S.

Bcl-2 protein expression and long-term survival in breast cancer.
Am J Pathol. 1994 Nov;145(5):1191-8.

Kaklamanis L, Savage A, Mortensen N, Tsiotos P, Doussis-Anagnostopoulou I, Diddolph S, Whitehouse R, Harris AI, Gatter KC

Early Expression of Bcl2 protein in adenoma-carcinoma sequence of colorectal neoplasia
J Pathol 1996 179:10-23

Kee KH, Lee MJ, Ro JY.

Oncoprotein changes in the flat lesions with atypia and invasive neoplasms of the urinary bladder.
Oncol Rep. 2001 May-Jun;8(3):579-83.

Kernohan NM, Cox LS.

Regulation of apoptosis by Bcl-2 and its related proteins: immunochemical challenges and therapeutic implications.
J Pathol. 1996 May;179(1):1-3.

Kerns BJ, Jordan PA, Huper G, Marks JR, Iglehart JD, Layfield LJ.

Assessment of c-erbB-2 amplification by immunohistochemistry in paraffin-embedded breast cancer.
Mod Pathol. 1993 Nov;6(6):673-8.

Kerns BJ, Pence JC, Huper G, Kinney RB, Iglehart JD.

c-erbB-2 expression in breast cancer detected by immunoblotting and immunohistochemistry.
J Histochem Cytochem. 1990 Dec;38(12):1823-30.

Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR.

Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics.
Br J Cancer. 1972 Aug;26(4):239-57.

King ED, Matteson J, Jacobs SC, Kyprianou N.

Incidence of apoptosis, cell proliferation and bcl-2 expression in transitional cell carcinoma of the bladder: association with tumor progression.
J Urol. 1996 Jan;155(1):316-20.

Kirsh EJ, Baunoch DA, Stadler WM.

Expression of bcl-2 and bcl-X in bladder cancer.
J Urol. 1998 Apr;159(4):1348-53.

Klapper LN, Kirschbaum MH, Sela M, Yarden Y.

Biochemical and clinical implications of the ErbB/HER signaling network of growth factor receptors.
Adv Cancer Res. 2000;77:25-79.

Klein, Rüdiger

Expression des Apoptose-assoziierten Proto-Onkogens Bcl-2 in Magenkarzinomen
Dissertation an der Universität Würzburg, 1995

Kong G, Shin KY, Oh YH, Lee JJ, Park HY, Woo YN, Lee JD.

Bcl-2 and p53 expressions in invasive bladder cancers.
Acta Oncol. 1998;37(7-8):715-20.

Korkolopoulou P, Christodoulou P, Kapralos P, Exarchakos M, Bisbiroula A, Hadjiyannakis M, Georgountzos C, Thomas-Tsagli E.

The role of p53, MDM2 and c-erb B-2 oncoproteins, epidermal growth factor receptor and proliferation markers in the prognosis of urinary bladder cancer.
Pathol Res Pract. 1997;193(11-12):767-75.

Korman H, Watson R, Soloway M

Superficial Transitional Cell Carcinoma of the Bladder
in: "Urologic Onkology", Oesterling R., W.B. Saunders Company, Philadelphia, 1997, S.256-271

Korsmeyer SJ.

Bcl-2 initiates a new category of oncogenes: regulators of cell death.
Blood. 1992 Aug 15;80(4):879-86.

Koyuncuoglu M, Kargi A, Cingoz S, Kirkali Z

Investigation of p53, c-erbB-2, PCNA immunoreactivity, DNA content, AgNOR and apoptosis in bladder carcinoma as prognostic parameters.
Cancer Lett 1998 Apr 24;126(2):143-8

Krajewski S, Tanaka S, Takayama S, Schibler MJ, Fenton W, Reed JC.

Investigation of the subcellular distribution of the bcl-2 oncoprotein: residence in the nuclear envelope, endoplasmic reticulum, and outer mitochondrial membranes.
Cancer Res. 1993 Oct 1;53(19):4701-14.

Kroemer G.

The proto-oncogene Bcl-2 and its role in regulating apoptosis.
Nat Med. 1997 Jun;3(6):614-20.

Lee SE, Chow NH, Chi YC, Tzai TS, Yang WH, Lin SN.

Expression of c-erbB-2 protein in normal and neoplastic urothelium: lack of adverse prognostic effect in human urinary bladder cancer.
Anticancer Res. 1994 May-Jun;14(3B):1317-24

Lengyel, Ernst-Robert

Prognosekriterien des Mammakarzinoms am Beispiel der Keratine und des Onkoproteinprodukts Her2/neu
Dissertation an der Ludwig-Maximilians-Universität, 1993

Li B, Kanamaru H, Noriki S, Yamaguchi T, Fukuda M, Okada K.

Reciprocal expression of bcl-2 and p53 oncoproteins in urothelial dysplasia and carcinoma of the urinary bladder.
Urol Res. 1998;26(4):235-41.

Liebert M

Growth factors in bladder cancer.
World J Urol 1995;13(6):349-55

Lipponen P

Expression of c-erbB-2 oncoprotein in transitional cell bladder cancer.
Eur J Cancer 1993;29A(5):749-53

Lipponen P, Eskelinen M, Syrjanen S, Tervahauta A, Syrjanen K.

Use of immunohistochemically demonstrated c-erb B-2 oncoprotein expression as a prognostic factor in transitional cell carcinoma of the urinary bladder.
Eur Urol. 1991;20(3):238-42.

Lipponen P, Eskelinen M.

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. 1994 Jun;69(6):1120-5.

Lipponen PK, Aaltomaa S, Eskelinen M.

Expression of the apoptosis suppressing bcl-2 protein in transitional cell bladder tumours
Histopathology. 1996 Feb;28(2):135-40.

Liukkonen TJ, Lipponen PK, Helle M, Jauhiainen KE.

Immunoreactivity of bcl-2, p53 and EGFr is associated with tumor stage, grade and cell proliferation in superficial bladder cancer. Finnbladder III Group.
Urol Res. 1997;25(1):1-7.

Lu QL, Laniado M, Abel PD, Stamp GW, Lalani EN.

Expression of bcl-2 in bladder neoplasms is a cell lineage associated and p53-independent event.
Mol Pathol. 1997 Feb;50(1):28-33.

Mostofi F, Sobin L, Torlini H

Histological typing of urinary bladder tumors. International Histological Classification of Tumors No. 10
World Health Organisation, Geneva, 1973

Mellon JK, Lunec J, Wright C, Horne CH, Kelly P, Neal DE

C-erbB-2 in bladder cancer: molecular biology, correlation with epidermal growth factor receptors and prognostic value.
J Urol 1996 Jan;155(1):321-6

Miyake H, Hara S, Arakawa S, Kamidono S, Hara I.

Overexpression of Bcl-2 regulates sodium butyrate- and/or docetaxel-induced apoptosis in human bladder cancer cells both in vitro and in vivo.
Int J Cancer. 2001 Jul 1;93(1):26-32.

Moch H, Sauter G, Moore D, Mihatsch MJ, Gudat F, Waldman F.

p53 and erbB-2 protein overexpression are associated with early invasion and metastasis in bladder cancer.
Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol. 1993;423(5):329-34.

Moriyama M, Akiyama T, Yamamoto T, Kawamoto T, Kato T, Sato K, Watanuki T, Hikage T, Katsuta N, Mori S.

Expression of c-erbB-2 gene product in urinary bladder cancer.
J Urol 1991 Feb;145(2):423-7

Nakopoulou L, Vourlakou C, Zervas A, Tzonou A, Gakiopoulou H, Dimopoulos MA.

The prevalence of bcl-2, p53, and Ki-67 immunoreactivity in transitional cell bladder carcinomas and their clinicopathologic correlates.
Hum Pathol. 1998 Feb;29(2):146-54.

Neumann, Barbara

Blasenkarzinom: Befunde und Langzeitergebnisse in der Region München
Dissertation an der Ludwig-Maximilians-Universität, 1995

Newton K, Strasser A.

The Bcl-2 family and cell death regulation.
Curr Opin Genet Dev. 1998 Feb;8(1):68-75.

Noll S, Schaub-Kuhnen S

Praxis der Immunhistochemie
Urban & Fischer, München, 2000

Nunez G, London L, Hockenbery D, Alexander M, McKearn JP, Korsmeyer SJ.

Deregulated Bcl-2 gene expression selectively prolongs survival of growth factor-deprived hemopoietic cell lines.
J Immunol. 1990 May 1;144(9):3602-10.

Ong F, Moonen LM, Gallee MP, ten Bosch C, Zerp SF, Hart AA, Bartelink H, Verheij M.

Prognostic factors in transitional cell cancer of the bladder: an emerging role for Bcl-2 and p53.
Radiother Oncol. 2001 Nov;61(2):169-75.

Plastiras D, Moutzouris G, Barbatis C, Presvelos V, Petrakos M, Theodorou C.

Can p53 nuclear over-expression, Bcl-2 accumulation and PCNA status be of prognostic significance in high-risk superficial and invasive bladder tumours?
Eur J Surg Oncol. 1999 Feb;25(1):61-5.

Press MF, Hung G, Godolphin W, Slamon DJ.

Sensitivity of HER-2/neu antibodies in archival tissue samples: potential source of error in immunohistochemical studies of oncogene expression.
Cancer Res. 1994 May 15;54(10):2771-7.

Pressler L, Petrylak D, Olsson C

Invasive Transitional Cell Carcinoma of the Bladder
in: "Urologic Onkology", Oesterling R., W.B. Saunders Company, Philadelphia, 1997, S. 275-289

Ravery V, Grignon D, Angulo J, Pontes E, Montie J, Crissman J, Chopin D.

Evaluation of epidermal growth factor receptor, transforming growth factor alpha, epidermal growth factor and c-erbB2 in the progression of invasive bladder cancer.
Urol Res. 1997;25(1):9-17

Reed JC.

Bcl-2 family proteins.
Oncogene. 1998 Dec 24;17(25):3225-36.

Rübben H.

Uroonkologie, 3. Auflage
Springer Verlag, 1998, 3. Auflage

Sato K, Moriyama M, Mori S, Saito M, Watanuki T, Terada K, Okuhara E, Akiyama T,

An immunohistologic evaluation of C-erbB-2 gene product in patients with urinary bladder carcinoma.
Cancer 1992 Nov 15;70(10):2493-8

Shiina H, Igawa M, Urakami S, Honda S, Shirakawa H, Ishibe T.

Immunohistochemical analysis of bcl-2 expression in transitional cell carcinoma of the bladder
J Clin Pathol. 1996 May;49(5):395-9.

Singleton TP, Niehans GA, Gu F, Litz CE, Hagen K, Qiu Q, Kiang DT, Strickler

Detection of c-erbB-2 activation in paraffin-embedded tissue by immunohistochemistry.
Hum Pathol. 1992 Oct;23(10):1141-50.

Soini Y, Paakko P.

bcl-2 is preferentially expressed in tumours of muscle origin but is not related to p53 expression.
Histopathology. 1996 Feb;28(2):141-5.

Tannapfel A, Kuhn R, Kessler H, Wittekind C.

Expression of c-erbB2 oncogene product in different tumours and its standardised evaluation.
Anal Cell Pathol. 1996 Mar;10(2):149-60.

Tetu B, Fradet Y, Allard P, Veilleux C, Roberge N, Bernad P

Prevalence and clinical significance of Her2/neu, p53 and Rb Expression in primary superficial bladder cancer
J Urol. 1996 May;155(5):1784-88

Tsujimoto Y, Croce CM.

Analysis of the structure, transcripts, and protein products of bcl-2, the gene involved in human follicular lymphoma.
Proc Natl Acad Sci U S A. 1986 Jul;83(14):5214-8.

Vaux DL, Cory S, Adams JM.

Bcl-2 gene promotes haemopoietic cell survival and cooperates with c-myc to immortalize pre-B cells.
Nature. 1988 Sep 29;335(6189):440-2.

Veintenhansl, Martin

Immunohistochemische Untersuchungen zur Expression von basischem Fibroblasten-Wachstumsfaktor (bFGF) und bcl-2-Oncoprotein an benignem und verändertem humanem Schilddrüsengewebe ex vivo
Dissertation an der Ludwig-Maximilians-Universität, 1999

Williams GT, Smith CA.

Molecular regulation of apoptosis: genetic controls on cell death. Cell. 1993 Sep 10;74(5):777-9.

Wolf HK, Stober C, Hohenfellner R, Leissner J.

Prognostic value of p53, p21/WAF1, Bcl-2, Bax, Bak and Ki-67 immunoreactivity in pT1 G3 urothelial bladder carcinomas.
Tumour Biol. 2001 Sep-Oct;22(5):328-36.

Wright, Mellon, jonston et al.

Expression of mutant p53, c-erbB-2 and the epidermal growth factor receptor in TCC of the human urinary bladder
British journal of Cancer 1991 63(4) s967-970

Yaman O, Baltaci S, Arikan N, Yilmaz E, Gogus O.

Staging with computed tomography, transrectal ultrasonography and transurethral resection of bladder tumour: comparison with final pathological stage in invasive bladder carcinoma.
Br J Urol. 1996 Aug;78(2):197-200.

Ye DW, Zheng JF, Qian SX, Ma YJ

Correlation between the expression of oncogenes ras and c-erbB-2 and the biological behavior of bladder tumors.
Urol Res 1993 Jan;21(1):39-43

7 Anhang

Tabellen des Anhangs

| Kaplan-Meier-Kurve (Log-Rank-Test) | | Her2-positiv & Bcl2-positiv | Her2-positiv und Bcl2-diffus-positiv |
|------------------------------------|-------------|-----------------------------|--------------------------------------|
| Rezidiv | Ta/T1 | p=0,1419 | p=0,2252 |
| | T2/T3/T4 | p=0,0544 | p=0,0378* |
| | T1/T2/T3/T4 | p=0,0516 | p=0,0203* |
| | | | |
| | Ta | nicht möglich | nicht möglich |
| Progreß | Ta/T1 | p=0,3584 | p=0,7956 |
| | T2/T3/T4 | p=0,0217* | p=0,0161* |
| | T1/T2/T3/T4 | p=0,1624 | p=0,0226* |
| | | | |
| | Ta | nicht möglich | nicht möglich |
| Überleben | Ta/T1 | p=0,6082 | p=0,4773 |
| | T2/T3/T4 | p=0,0243* | p=0,0306* |
| | T1/T2/T3/T4 | p=0,3608 | p=0,0259* |
| | | | |
| | Ta | nicht möglich | nicht möglich |

Tabelle 1 des Anhangs

Übersicht über p-Werte der Überlebenskurven (Kaplan-Meier) für Rezidiv, Progreß und Überleben bei den Untergruppen der T-Stadien bei gemeinsamer Expression von Bcl2 und Her2/neu (*=signifikante Werte)

| Cox-Regression | | Her2-positiv & Bcl2-positiv | Her2-positiv und Bcl2-diffus-positiv |
|------------------|-------------|-----------------------------|--------------------------------------|
| Rezidiv | Ta/T1 | p=0,211 | p=0,211 |
| | T2/T3/T4 | p=0,039* | p=0,023* |
| | T1/T2/T3/T4 | p=0,063 | p=0,040* |
| | | | |
| | Ta | nicht möglich | nicht möglich |
| Progreß | Ta/T1 | p=0,644 | p=0,998 |
| | T2/T3/T4 | p=0,010* | p=0,008* |
| | T1/T2/T3/T4 | p=0,236 | p=0,061 |
| | | | |
| | Ta | nicht möglich | nicht möglich |
| Überleben | Ta/T1 | p=0,615 | p=0,991 |
| | T2/T3/T4 | p=0,010* | p=0,018* |
| | T1/T2/T3/T4 | p=0,485 | p=0,072 |
| | | | |
| | Ta | nicht möglich | nicht möglich |

Tabelle 2 des Anhangs

Übersicht über p-Werte der Cox-Regression für Rezidiv, Progreß und Überleben bei den Untergruppen der T-Stadien bei gemeinsamer Expression von Bcl2 und Her2/neu (*=signifikante Werte)

Curriculum Vitae

| | |
|---------------|--|
| Name | Robert Fäustle |
| Geburtsdatum | 07. Januar 1977 |
| Familienstand | ledig |
| Eltern | Dr. med. Barbara Fäustle, geb. Kieser, Ärztin für Psychotherapie Dr. med. Rudolf Fäustle, Arzt für Frauenheilkunde und Geburtshilfe |

Schulbildung

| | |
|-----------|---------------------------|
| 1983-1987 | Grundschule Waldtrudering |
| 1987-1996 | Ernst-Mach-Gymnasium Haar |
| 6/1996 | Allgemeine Hochschulreife |

Wehrdienst:

| | |
|---------------|--|
| 7/1996-4/1997 | Sanitäter der Luftwaffe in Fürstenfeldbruck u. München |
|---------------|--|

Universitätsausbildung

| | |
|----------------|--|
| ab 5/1997 | Studium der Medizin Universität Würzburg |
| 3/1998 | Ärztliche Vorprüfung |
| 3/2000 | 1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung |
| ab 6/2000 | Studium der Medizin an der Technischen Universität München |
| 9/2002 | 2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung |
| 10/2002-9/2003 | Praktisches Jahr Pharmakologie, TU München, Prof. Dr. Hofmann Chirurgie, Spital Interlaken/Schweiz, Dres. Noesberger/Kohler Innere Medizin, Krankenhaus Bogenhausen, Prof. Dr. Delius |
| 9/2003 | 3. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung |

Beruflicher Werdegang

| | |
|-----------|--|
| ab 3/2004 | AiP in der Abteilung für Diagnostische Radiologie und Strahlenmedizin Krankenhaus Bogenhausen, Prof. Ingrisch |
|-----------|--|

Danksagung

Besonders möchte ich mich bei meinem Betreuer Herrn Dr. Roger Paul bedanken, mit dessen Hilfe es mir gelungen ist, die Arbeit erfolgreich abzuschließen.

Ebenfalls bedanke ich mich bei Herrn Dr. Hartwig Schwaibold, der die Arbeit initiiert hat und grundlegend bei der experimentellen Arbeit beratend zur Seite stand. Obwohl er das Klinikum Rechts der Isar in München verlassen hat, haben wir es trotz der Entfernung geschafft, in regelmäßigem wissenschaftlichen Disput zu bleiben.

Herrn Prof. Dr. R. Hartung möchte ich für die Möglichkeit, in seiner Klinik zu arbeiten und zu promovieren, meinen Dank aussprechen.

Ebenso möchte ich mich bei Herrn Dr. Gregor Weirich aus dem Pathologischen Institut der TU München bedanken, der mir bei der Auswertung der histologischen Präparate sehr geholfen hat und sehr viel seiner Zeit investiert hat. Er hatte immer ein offenes Ohr und war an der Bewältigung vieler Probleme beteiligt.

Ganz herzlich bedanke ich mich bei Frau Doris Langer, die mir als MTA im Labor der Urologie bei der immunhistochemischen Färbung der Präparate eine sehr große Hilfe war und für eine freundliche und unterhaltsame Stimmung während der Arbeit gesorgt hat.

Auch bei Frau Sabine Jung (MTA im Pathologischen Institut) möchte ich mich für unterstützende Hilfe bedanken.

Für die Hilfestellung bei den statistischen Berechnungen und Ausarbeitungen möchte ich mich bei Herrn Dr. Stefan Wagenpfeil und Frau Sabine Krostina bedanken.

Weiterhin möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Markward Marshall bedanken, der mir ebenfalls in allen Lebenslagen beigestanden ist und mir stets eine ausgesprochen wertvolle Hilfe war.

Zuletzt bedanke ich mich von ganzem Herzen bei meinen Eltern, die mir nicht nur das Medizinstudium ermöglicht haben, sondern mir in jeder Situation beistehen und beigestanden sind.