

Aus der Urologischen Klinik der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Direktor: Prof. Dr. med. R. Ackermann

**Prognostische und funktionelle Aspekte der Expression des
Wachstumsfaktors HB-EGF und seines Rezeptors EGFR im
invasiven Harnblasenkarzinom**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

Der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität

Düsseldorf

vorgelegt von

Christopher Kramer

2006

**Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf**

gez.: Univ.-Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Bernd Nürnberg
Dekan

Referent: Priv.-Doz. Dr. med. Marc-Oliver Grimm

Korreferent: Univ.-Prof. Dr. med. Hans Bojar

1. Einleitung	1
1.1. Das Harnblasenkarzinom.....	2
1.2. Molekulare Veränderungen beim Harnblasenkarzinom.....	4
1.2.1. Tumorsuppressorgene.....	4
1.2.2. Onkogene.....	4
1.2.3. Zellzyklusregulation durch Onkogene und Tumorsuppressorgene.....	5
1.2.4. Wachstumsfaktoren und Wachstumsfaktorrezeptoren.....	7
1.2.4.1. Die EGF Rezeptor-Familie.....	8
1.2.4.2. Liganden der EGF Rezeptor-Familie.....	10
1.3. Fragestellung der Arbeit.....	14
2. Material	15
2.1. Reagenzien, Verbrauchsmaterial, Antikörper.....	15
2.2. Lösungen.....	16
2.3. Geräte.....	16
3. Patientenkollektiv und Gewebeproben	17
4. Methoden	20
4.1. Gewebeaufarbeitung.....	20
4.2. Hematoxilin/Eosin-Färbung.....	20
4.3. Immunhistochemie.....	21
4.3.1. HB-EGF.....	21
4.3.2. EGFR.....	23
4.4. Semiquantitative Evaluation.....	24
4.5. Statistische Auswertung.....	27
5. Ergebnisse	28
5.1. Prognostische Aussagekraft etablierter histopathologischer Parameter.....	28
5.2. Expressionsanalyse von EGFR.....	29
5.2.1. Korrelation mit klinischen und histopathologischen Parametern.....	31
5.2.2. Korrelation mit dem klinischen Verlauf.....	33
5.3. Expressionsanalyse von HB-EGF.....	35
5.3.1. Zytoplasmatische Färbung.....	35

5.3.1.1.	Korrelation mit klinischen und histopathologischen Parametern	37
5.3.1.2.	Korrelation mit dem klinischen Verlauf.....	39
5.3.2.	Nukleäre Färbung	41
5.3.2.1.	Korrelation mit klinischen und histopathologischen Parametern	44
5.3.2.2.	Korrelation mit dem klinischen Verlauf.....	46
5.3.3.	Verknüpfung zytoplasmatischer und nukleärer HB-EGF Expression.....	48
5.3.3.1.	Korrelation mit klinischen und histopathologischen Parametern	48
5.3.3.2.	Korrelation mit dem klinischen Verlauf.....	50
5.4.	Korrelation von EGFR und HB-EGF Expression.....	52
5.4.1.	Korrelation mit klinischen und histopathologischen Parametern.....	52
5.4.2.	Korrelation mit dem klinischen Verlauf	52
6.	Diskussion	54
6.1.	Molekulare „Marker“ als prognostische Faktoren.....	55
6.2.	Zusammensetzung des Patientenkollektivs.....	56
6.3.	Expression von EGFR und Prognose.....	58
6.4.	Prognostische Bedeutung von HB-EGF	61
6.4.1.	Expression von HB-EGF	61
6.4.2.	Bedeutung der proteolytischen Spaltung von proHB-EGF	64
6.4.3.	Regulation der proteolytischen Spaltung von proHB-EGF.....	66
6.4.4.	Korrelation von HB-EGF und EGFR und Prognose	66
7.	Ausblick	68
8.	Zusammenfassung	70
9.	Literaturverzeichnis	72
10.	Veröffentlichungen	84
10.1.	Publizierte Abstracts.....	84
10.2.	Posterbeiträge	84
10.3.	Publikationen in Zeitschriften	84
11.	Danksagung	85
12.	Lebenslauf	86

1. Einleitung

In den letzten Jahren hat die rasche Entwicklung in der molekularbiologischen Forschung zu einem wesentlich verbesserten Verständnis der Entstehung und Progression maligner Tumore geführt. Neben der Identifizierung von Genen, die bei malignen Tumoren gehäuft Veränderungen aufzeigen, ist es in zunehmendem Maße gelungen, das komplexe biologische Zusammenspiel einzelner Gene bei der Tumorentstehung bzw. -progression auf molekularer Ebene nachzuvollziehen. Daraus entsteht ein wachsendes Interesse, die Ergebnisse der Grundlagenforschung in Form verbesserter Diagnostik und Therapie in den klinischen Alltag zu integrieren.

Die histopathologischen Parameter, die heute ganz wesentlich therapiebestimmend sind, haben nur eine begrenzte Aussagefähigkeit für den tatsächlichen Verlauf einer malignen Erkrankung. Neben der Histologie könnten molekulare prognostische Marker wichtige zusätzliche Informationen über den Krankheitsverlauf geben und dadurch hilfreich bei der Entscheidung für die geeignete Therapieform sein. Beispielsweise entscheidet in einer laufenden internationalen Multicenterstudie mit Patienten, die aufgrund eines Harnblasenkarzinoms zystektomiert wurden, die Veränderung des p53 Gens in den Tumorzellen darüber, ob der einzelne Patient eine adjuvante Polychemotherapie erhalten kann.

Durch die Identifizierung veränderter Gene und deren Funktion in maligne entarteten Zellen besteht zudem die Möglichkeit, diese, bzw. die von ihnen kodierten Proteine in ihrer Funktion gezielt zu blockieren. Damit ergibt sich die Möglichkeit, die für das Wachstum der Tumorzellen bedeutenden und dementsprechend verstärkt aktivierten Signalkaskaden zu inhibieren. Dabei werden momentan in klinischen Studien vor allem Antikörper bzw. Tyrosinkinaseinhibitoren gegen membranständige Wachstumsfaktorrezeptoren wie zum Beispiel gegen den EGF Rezeptor eingesetzt.

Für die Proliferation von normalen Urothelzellen sind der Wachstumsfaktor Heparin-binding Epidermal Growth Factor-like Growth Factor (HB-EGF) und sein Rezeptor (EGFR) von entscheidender Bedeutung. Beim Harnblasenkarzinom konnte dem EGF-Rezeptor in mehreren Studien eine prognostische Relevanz in Bezug auf das rezidivfreie und tumorspezifische Überleben nachgewiesen werden. Diese Arbeit soll dazu beitragen, die Bedeutung der HB-EGF/EGFR Signalkaskade bei der Entstehung und Progression des invasiven Harnblasenkarzinoms näher zu analysieren.

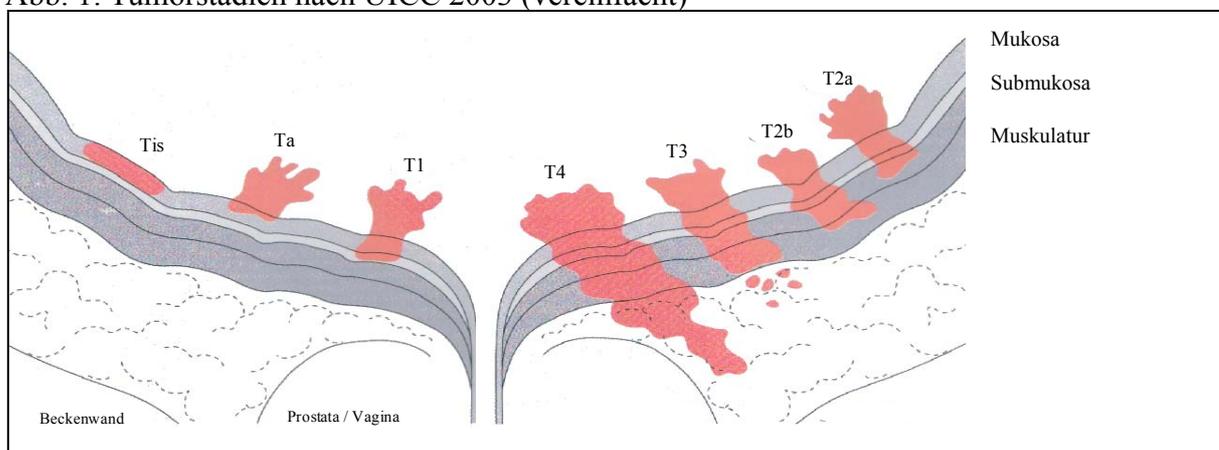
1.1. Das Harnblasenkarzinom

Das Harnblasenkarzinom ist mit einer für die USA geschätzten Inzidenz von 60.240 Neuerkrankungen für das Jahr 2004 nach dem Prostatakarzinom der zweithäufigste maligne Tumor des Urogenitaltraktes [Jemal et al. 2004]. In Deutschland macht das Harnblasenkarzinom etwa 2% aller malignen Erkrankungen aus; dabei sind Männer dreimal häufiger als Frauen betroffen. Harnblasenkarzinome treten vorwiegend jenseits des 60. Lebensjahres auf [Rübben H. 2001].

Inzwischen ist eine Vielzahl von Karzinogenen beschrieben, die in ursächlichem Zusammenhang mit der Entstehung von Harnblasenkarzinomen stehen. Hierzu zählen polyzyklische Kohlenwasserstoffverbindungen und aromatische Amine, wie Benzidin, Naphthylamin, Chlortoluidin und Aminodiphenyl, die in industriellen Fertigungen Verwendung finden [Kogevinas et al. 2003]. Weitere Risikofaktoren sind Rauchen, bestimmte Medikamente wie Cyclophosphamid oder Phenacetin, ionisierende Strahlen und chronische Entzündungen der ableitenden Harnwege [Rübben H. 2001].

Histologisch werden in Europa am häufigsten Übergangsepithelkarzinome (Transitionalzellkarzinome, TCC) (~95%) gefunden, während Plattenepithel- und Adenokarzinome mit zusammen ~5% selten sind [Rübben H. 2001]. Die Beurteilung der Tumorausbreitung (Staging) erfolgt nach der TNM Klassifikation gemäß den Empfehlungen der UICC [Union International Contre le Cancer 2003] (Abb. 1). Dazu werden die Tiefenausdehnung des Primärtumors (T), Befall der regionären Lymphknoten (N) und das Vorhandensein von Fernmetastasen beurteilt (M). Die Einteilung des Malignitätsgrades (Grading) erfolgt nach dem Grad der zellulären Anaplasie in die Grade G1 (gut differenziert) bis G4 (entdifferenziert) [Bergkvist et al. 1965].

Abb. 1: Tumorstadien nach UICC 2003 (vereinfacht)



Erstsymptom bei etwa 80% der Patienten ist eine schmerzlose Mikro- oder Makrohämaturie. Die verbleibenden 20% weisen häufig Symptome wie bei einer Blasenentzündung, z.B. Pollakisurie, Dysurie, Nykturie oder Inkontinenz auf [Raghavan und Huben 1995].

Bei Verdacht auf einen Blasentumor wird zunächst eine Zystoskopie durchgeführt. Bestätigt sich der Verdacht, erfolgt eine transurethrale Resektion (TUR), in deren Anschluss das Resektionsmaterial histologisch aufgearbeitet wird. Dadurch kann die definitive Diagnose gestellt und eine Beurteilung der Tiefenausdehnung des Tumors vorgenommen werden.

Für das weitere klinische Vorgehen ist die vereinfachte Einteilung in oberflächliche und invasiv wachsende Tumore wichtig (Abb. 1). Als oberflächliche Tumore werden Ta-, Tis- und T1-Tumore zusammengefasst, die etwa 80% aller Harnblasenkarzinome ausmachen und mit einer vergleichsweise guten Prognose behaftet sind. Von diesen haben lediglich die T1-Tumore die Basalmembran durchbrochen und sind somit durch Zugang zu Lymph- bzw. Blutgefäßen in der Lage zu metastasieren. Für die oberflächlichen Tumore stellt die aus diagnostischen Zwecken durchgeführte TUR auch gleichzeitig die Therapie dar. Ein besonderes Problem oberflächlicher Tumore ist die Neigung zu Rezidiven, die in 30-85% der Fälle auftreten [Kurth et al. 2000]. Die Tumorrezidive sind in 10-15% der Fälle mit einer Progression des Tumorstadiums und in 10-30% mit einer Verschlechterung des Differenzierungsgrades vergesellschaftet [Kroft und Oyasu 1994]. Multifokales Wachstum, Carcinoma in situ und der Nachweis von Tumorzellen in der urinzytologischen Untersuchung zeigen ein erhöhtes Rezidiv- und/oder Progressionsrisiko an [Colquhoun und Mellon 2002]; die Rezidivneigung kann durch eine zusätzliche intravesikale Chemo- oder Immuntherapie (BCG) günstig beeinflusst werden.

Die muskelinvasiven Tumore T2 – T4 sind mit einer ungleich schlechteren Prognose für den Patienten behaftet. Therapie der Wahl bei diesen Tumoren ist die radikale Zystektomie mit pelviner Lymphadenektomie [Hall und Dinney 1996]. Trotz dieser aggressiven Therapie treten bei etwa jedem zweiten Patienten im Stadium T3 und T4 innerhalb von zwei Jahren Fernmetastasen auf [Stein et al. 2001]. Ursache dafür sind zum Zeitpunkt der Operation bereits vorhandene Mikrometastasen, die durch alleinige lokale Therapieansätze nicht zu heilen sind. Eine adjuvante Chemotherapie nach Zystektomie führt zu einer Verlängerung der rezidivfreien Überlebenszeit bei Patienten mit fortgeschrittenem invasiven Harnblasenkarzinom [Skinner et al. 1991; Freiha et al. 1996; Stöckle et al. 1996]. Bei Patienten, die aufgrund von Begleiterkrankungen oder ihrer körperlichen Verfassung

für eine Radikaloperation nicht in Frage kommen, kann eine Bestrahlung und/oder Chemotherapie als Therapieoption in Betracht gezogen werden.

1.2. Molekulare Veränderungen beim Harnblasenkarzinom

In der Erforschung der Karzinogenese des Harnblasenkarzinoms sind in den letzten Jahrzehnten eine Reihe genetischer Veränderungen wie chromosomale Aberrationen und Mutationen nachgewiesen worden [Rabbani und Cordon-Cardo 2000]. Chromosomale Veränderungen im Harnblasenkarzinom umfassen sowohl Verluste als auch die Zunahme von Allelen, Translokationen und Amplifikationen. Diese Veränderungen korrelieren häufig mit dem Stadium und Malignitätsgrad des Tumors. Von den genannten Veränderungen ist der Verlust des langen und kurzen Arms des Chromosoms 9 am häufigsten [Knowles 1999].

Physiologisch besteht in normalem Gewebe ein Gleichgewicht zwischen proliferationsfördernden und –hemmenden Stimuli. In den Tumorzellen ist dieses komplex regulierte Gleichgewicht häufig jedoch gestört. So führt die Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen oder die Aktivierung von Onkogenen zu einer Verschiebung des Gleichgewichts in Richtung Proliferation.

1.2.1. Tumorsuppressorgene

Die durch Tumorsuppressorgene kodierten Proteine regulieren durch inhibitorische Kontrolle des Zellzyklus Wachstum und Lebensdauer einer Zelle. Werden Tumorsuppressorgene inaktiviert, kann es verstärkt zu unkontrolliertem Tumorwachstum kommen. Wichtigste Vertreter sind das p53-Tumorsuppressorgen und das Retinoblastomgen (Rb), die beide sehr häufig Aberrationen, vor allem bei fortgeschrittenen Harnblasenkarzinomen, aufweisen.

1.2.2. Onkogene

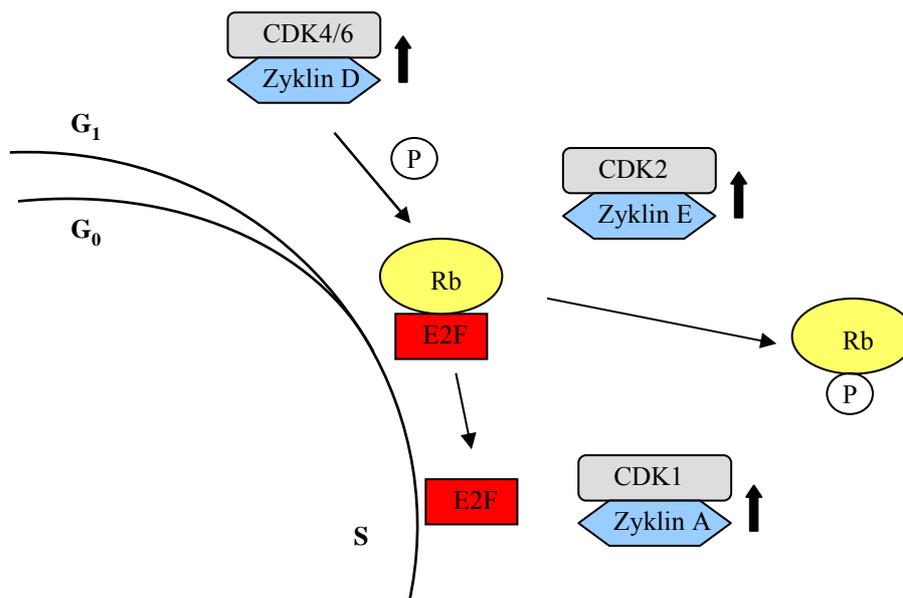
Zu den von Onkogenen kodierten Proteinen gehören Wachstumsfaktoren, Transkriptionsfaktoren, Signaltransduktoren, Proteinkinasen und Wachstumsfaktorrezeptoren, wie z. B. der Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR = ErbB1 = HER1). Kommt es zu einer Aktivierung oder Überexpression dieser Proteine, ist häufig eine unkontrollierte Proliferation die Folge. Ursächlich für eine Aktivierung können Deletionen, chromosomale Translokationen der Regulatorregionen, Punktmutationen, Genamplifikationen oder Provirus-Insertionen von Onkogenen sein.

1.2.3. Zellzyklusregulation durch Onkogene und Tumorsuppressorgene

Der Zellzyklus der meisten Zellen im menschlichen Körper umfasst vier abgrenzbare Stadien: Zellwachstum (=G1-Phase), DNA-Replikation (=S-Phase), Verteilung der verdoppelten Chromosomen (=G2-Phase) und Zellteilung (=M-Phase). Entscheidend für die ordnungsgemäße Weitergabe der genetischen Information von einer Zelle auf die beiden entstehenden Tochterzellen ist die Kontrolle des Übergangs von einer Zellphase in die nächste. Dies gewährleisten verschiedene Kontrollpunkte, so genannte „Checkpoints“, die den Übertritt erst dann zulassen, wenn die vorherige Phase vollständig und fehlerfrei abgeschlossen wurde. Eingehend untersucht ist der Übergang von der G1 in die S-Phase. Sollte die DNA in der späten G1-Phase nicht intakt sein, z.B. durch Einwirkung physikalischer oder chemischer Noxen, wird entweder der Eintritt in die S-Phase verzögert, um eine Reparatur der Defekte zu gewährleisten, oder die Zelle geht durch programmierten Zelltod, Apoptose, unter.

Hauptregulatoren der Progression innerhalb des Zellzyklus sind zyclinabhängige Proteinkinasen: CDKs (Cyclin Dependent Kinases). Sie koordinieren extra- und intrazelluläre Signale und bilden in ihrer aktiven Form Heterodimere mit Zyklinen (Abb. 2). Die Zykline selbst sind notwendige regulatorische Untereinheiten. Abhängig von den Phasen des Zellzyklus interagieren verschiedene Proteinkinasen mit unterschiedlichen Zyklinen [Ganchevska und Sarafian 2004]. In der G1-Phase werden vorwiegend Zyclin D, das an CDK 4 und 6 bindet und Zyclin E, das an CDK2 bindet, exprimiert. Die entstehenden Zyclin-CDK-Komplexe phosphorylieren u.a. das Retinoblastom-Protein, das dadurch inaktiviert wird. Durch die Inaktivierung des Retinoblastom-Proteins wird die Inhibition des Transkriptionsfaktors E2F aufgehoben [Shirodkar et al. 1992]. Der Transkriptionsfaktor E2F kann dann für die Replikation notwendige Gene, u. a. DNA-Polymerase aktivieren. Parallel dazu bindet in der späten G1-Phase Zyclin E vermehrt an CDK2. In der Folge steigt die Expression von Zyclin A an, wodurch vermehrt CDK1 gebunden wird. Dadurch wird der Eintritt in die S-Phase vermittelt.

Abb. 2: Regulation des Überganges von der G1 in die S-Phase des Zellzyklus



Hemmend auf die Aktivierung von zyclinabhängigen Proteinkinasen wirken CKIs (Cyclin Dependent Kinase Inhibitors), die sich in zwei Gruppen unterteilen lassen: Die INK4 Gruppe (Polypeptide Inhibitors of CDK4 and CDK6) und die CIP Gruppe (CDK Interacting Protein). Zur INK4 Familie gehören die Proteine p15, p16, p18 und p19, die eine Komplexbildung zwischen Zykin D mit CDK4 und CDK6 kompetitiv hemmen. Die CIP Familie besteht aus den Proteinen p21, p27 und p57, welche die Aktivität von intakten Komplexen zwischen CDK2, CDK4 und CDK6 mit den dazugehörigen Zyklinen blockieren [Matsuoka et al. 1995].

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass CDKs, CKIs und Zykline wichtige Vermittler zwischen extrazellulären Signalen und dem Phosphorylierungsstatus des Retinoblastom-Proteins und damit der Progression der Zelle von der G1-Phase in die S-Phase sind.

Bei maligne entarteten Zellen ist das Gleichgewicht der Regulationssysteme des Zellzyklus empfindlich gestört. Dies kann durch Inhibition oder Verlust der Funktion von Rb, p53, p15 oder p16 entstehen, die als Regulationsfaktoren den Zellzyklus hemmen. Ebenso können Zykline, die den Zellzyklus voranbringen, vermehrt exprimiert werden. All dies führt zur Hemmung der Apoptose, Weitergabe von fehlerhafter DNA mit der Entstehung von genetischer Instabilität und ungehemmtem Wachstum [Sherr und McCormick 2002; Theodorescu 2003].

Die Apoptose stellt einen Selbstschutz des Organismus dar, um maligne Entartungen, wie sie durch irreparable DNA-Schäden entstehen können, zu verhindern. Vermittelt wird die

Apoptose u.a. durch das Tumorsuppressorgen p53. Dies induziert abhängig vom auslösenden Signal und vom Zelltyp unterschiedliche Effektoren der Apoptose [Fridman und Lowe 2003]. p53 vermag alternativ über eine erhöhte Expression von p21 den CDK4/6-Zyklusin D-Komplex zu inhibieren [el Deiry et al. 1994]. Dies sorgt über die Blockade der Retinoblastom-phosphorylierung für einen Arrest der Zelle in der G1-Phase.

Im Rahmen der malignen Entartung kommt es bei einer Reihe von Tumoren zu Mutationen des p53 Gens [Olivier et al. 2002]. Mehrere Studien konnten die p53 Expression als bedeutsamen prognostischen Parameter im invasiven Harnblasenkarzinom bestätigen [Esrig et al. 1994; Kuczyk et al. 1995; Orntoft und Wolf 1998]. In der multivariaten Analyse zeigten Esrig et al. unter Berücksichtigung der immunhistochemisch nachgewiesenen p53 Expression, des Tumorstadiums, des Differenzierungsgrades und des Lymphknotenstatus eine unabhängige prognostische Relevanz für p53 in Bezug auf die rezidivfreie Zeit und die Überlebenszeit. Allerdings gibt es auch Untersuchungen, aufgrund derer p53 keinen eindeutigen prognostischen Parameter im muskelinvasiven Harnblasenkarzinom darstellt [Schmitz-Dräger et al. 2000].

1.2.4. Wachstumsfaktoren und Wachstumsfaktorrezeptoren

Wachstumsfaktoren sind Proteine, die zumeist an membranständige Rezeptoren auf der Zelloberfläche binden und dadurch sowohl Zellwachstum als auch Zelldifferenzierung beeinflussen. Hierzu zählen z.B. der Epidermal Growth Factor (EGF), Fibroblast Growth Factor (FGF), Platelet Derived Growth Factor (PDGF) und Insulin-like Growth Factor (IGF). Sie und ihre Rezeptoren werden den Protoonkogenen zugeordnet, einer Reihe von Zellgenen, die über die Kontrolle des Zellzyklus das Zellwachstum positiv, d.h. proliferationsfördernd, regulieren. Dadurch aktivierte Signalwege sichern physiologisch u.a. das Überleben normaler Gewebezellen und die Reparatur von Gewebedefekten im Rahmen der Wundheilung. Bei malignen Erkrankungen ist diese Regulation der Signalwege häufig empfindlich gestört: Über verschiedene Mechanismen der Aktivierung ist aus dem Protoonkogen ein Onkogen geworden, welches ungehemmt die Proliferation fördert und so zur Tumorentstehung beiträgt. Veränderungen in der Expression der Wachstumsfaktoren und ihrer Rezeptoren stellen einen wichtigen Schritt bei der malignen Entartung dar und sind nicht selten mit einer Tumorprogression assoziiert [Aaronson 1991; Blume-Jensen und Hunter 2001].

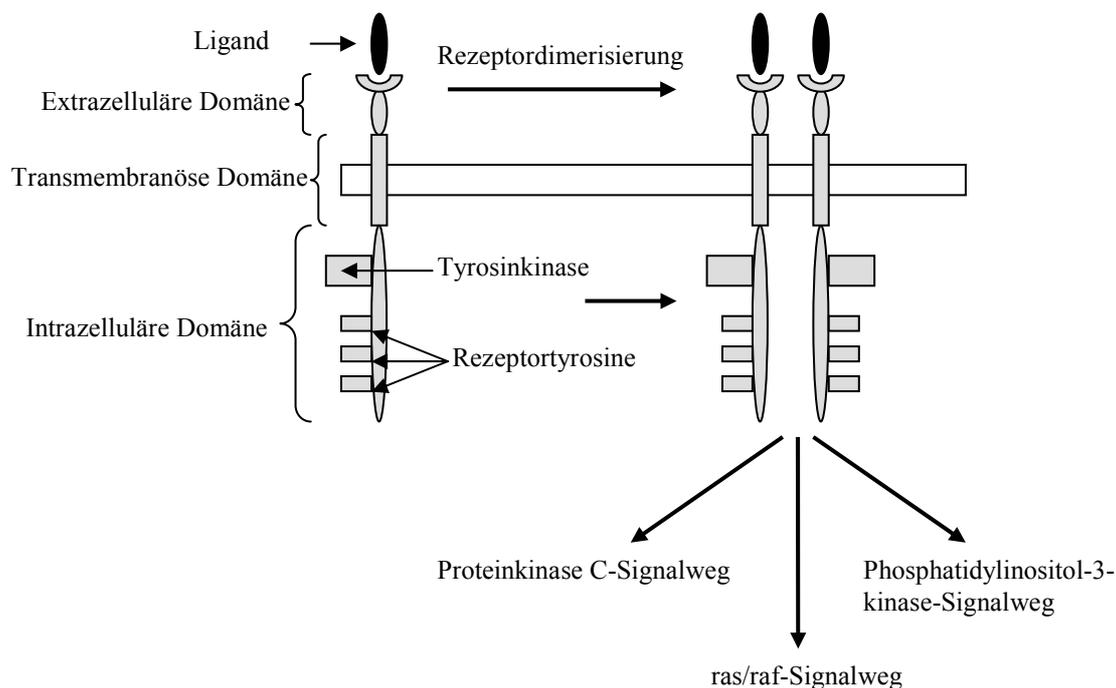
1.2.4.1. Die EGF Rezeptor-Familie

Erstmals beschrieben wurde der EGF Rezeptor 1984 [Ullrich et al. 1984]. Seit dieser Zeit sind vier Subtypen des Rezeptors charakterisiert worden: EGF Rezeptor Typ 1 (=EGFR, =HER1, =ErbB1), EGF Rezeptor Typ 2 (=HER2, =ErbB2), EGF Rezeptor Typ 3 (=HER3, =ErbB3), EGF Rezeptor Typ 4 (=HER4, =ErbB4). Sie gehören zu den Tyrosinkinase-rezeptoren und werden den Onkogenen der c-Erb-Familie zugeordnet. Aktiviert werden sie durch Bindung von einem von sieben bisher identifizierten Liganden mit unterschiedlicher Affinität für die einzelnen Rezeptoren. Heparin-binding Epidermal Growth Factor-like Growth Factor (HB-EGF) bindet vor allem an den EGF Rezeptor Typ1 (im Folgenden als EGFR bezeichnet) [Higashiyama et al. 1991; Hackel et al. 1999].

EGFR

Aufgebaut ist der EGF-Rezeptor aus drei Segmenten: der extrazellulären Liganden-Bindungs-Domäne, einer transmembranösen Verankerungs-Domäne und einer intrazellulären Tyrosinkinase-Domäne (Abb. 3). Die Tyrosinkinase-Domäne lässt sich als eine Einheit katalytischer Tyrosinkinasen und eine Einheit aus Rezeptortyrosinen betrachten. Die Bindung eines Liganden an den EGFR löst eine Rezeptor-Dimerisierung mit einem anderen EGFR-Monomer oder einem weiteren Mitglied der ErbB-Familie aus. Über diese Konformationsänderung kommt es zur Aktivierung der Tyrosinkinasen mit Phosphorylierungsreaktion der Rezeptortyrosine [Gullick 1991]. Die Autophosphorylierung aktiviert über Adapterproteine eine Reihe von intrazellulären Signalkaskaden: So werden der Ras/Raf-Signalweg, die Phosphatidylinositol-3-kinase und die Proteinkinase C aktiviert [Carpenter und Cohen 1990]. Damit wird der Weg für eine erhöhte Expression und Aktivität von Transkriptionsfaktoren gebahnt, wodurch es in der Folge zu einer Steigerung der Proliferation, Angiogenese und einer Inhibition der Apoptose kommt.

Abb. 3: Aufbau und Aktivierung des EGFR mit nachfolgenden intrazellulären Signalkaskaden (nach Colquhoun und Mellon 2002)



Für viele maligne Tumore ist eine Überexpression von EGFR nachgewiesen, dazu gehören Karzinome der Harnblase, des Kolons, des Pankreas, des Ovars und der Mamma [Nicholson et al. 2001]. Im muskelinvasiven Harnblasenkarzinom erwies sich die Expression von EGFR in mehreren Untersuchungen als unabhängiger prognostischer Parameter für die Progression in Bezug auf das T-Stadium und für die Überlebenszeit der Patienten [Neal et al. 1990; Mellon et al. 1995].

HER2 (ErbB2) stellt wie EGFR ein Transmembranglykoprotein dar, das aber selbst keine Wachstumsfaktoren binden kann. Die Heterodimerbildung mit EGFR führt im Vergleich mit einer EGFR-Homodimerbildung zu einer verstärkten Signalantwort. Auch für die HER2 Expression findet sich beim Harnblasenkarzinom eine Korrelation mit dem Tumorstadium und Malignitätsgrad [Moriyama et al. 1991]. Außerdem wurde die HER2 Expression im Harnblasenkarzinom als unabhängiger prognostischer Parameter in Bezug auf die Überlebenszeit beschrieben [Sato et al. 1992].

Inzwischen sind diese Erkenntnisse auch aus therapeutischer Sicht bei malignen Erkrankungen relevant geworden. In der klinischen Erprobung befindet sich eine Reihe von Inhibitoren der ErbB-Membranrezeptor-vermittelten Signaltransduktion. Dazu zählen Antikörper gegen die Ligandenbindungsdomäne von EGFR (z.B. C225/Cetuximab[®]) und HER2 (z.B. Trastuzumab/Herceptin[®]; Pertuzumab/Omnitarg[®]) sowie Inhibitoren der

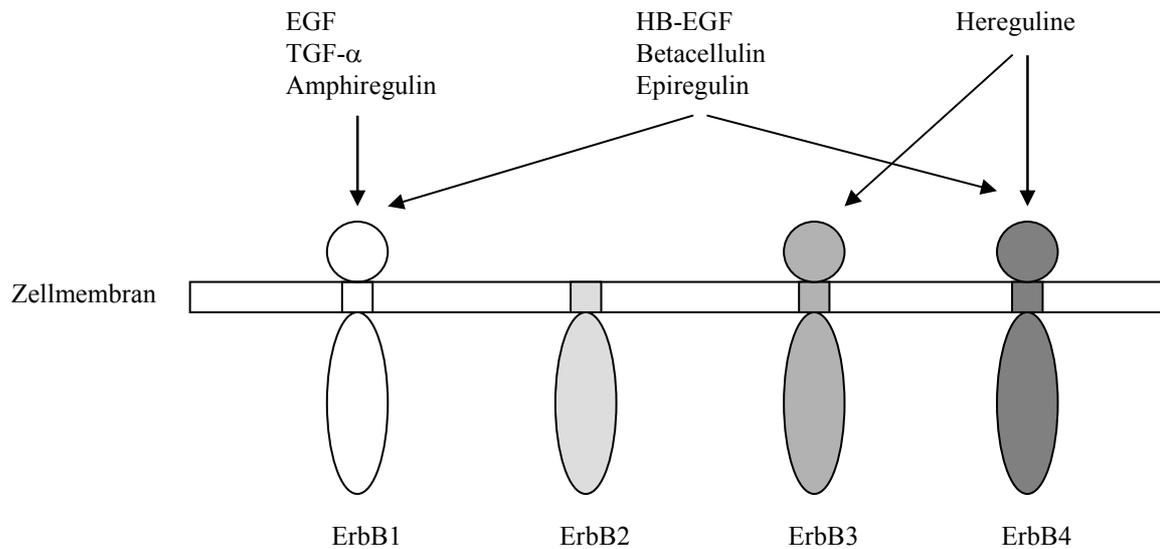
intrazellulären EGFR-Tyrosinkinase Domäne (z.B. OSI-774) [Colquhoun und Mellon 2002]. Herceptin[®] beispielsweise erlangte 1998 die FDA-Zulassung beim Mammakarzinom: Während die Monotherapie mit Herceptin[®] ein Ansprechen des Tumors in lediglich 10-20% der Fälle zeigte, konnten mehrere Studien nachweisen, dass die Kombination einer Polychemotherapie mit Herceptin[®] (i) das Ansprechen des Tumors auf Zytostatika signifikant erhöht und (ii) die gesamt- und rezidivfreie Überlebenszeit der Patientinnen verlängert [Fornier et al. 2000; Slamon et al. 2001; Spigel und Burstein 2003]. Auch der monoklonale gegen EGFR gerichtete Antikörper Cetuximab[®] konnte bei verschiedenen Tumoren die Wirksamkeit einer Chemotherapie erhöhen [Cunningham et al. 2004]: In einer multizentrischen Phase-III-Studie bei metastasierten Irinotecan-refraktären Kolonkarzinomen wurde die Wirksamkeit einer Monotherapie mit Cetuximab[®] gegenüber einer Kombinationstherapie aus Cetuximab[®] + Irinotecan verglichen. Dabei konnten für die Kombinationstherapie sowohl ein statistisch signifikant häufigeres Therapieansprechen (22,9% vs. 10,8%; p=0,0074) als auch eine verlängerte rezidivfreie Überlebenszeit (4,1 Monate vs. 1,5 Monate; p=0,0001) nachgewiesen werden.

1.2.4.2. Liganden der EGF Rezeptor-Familie

Bisher sind eine Reihe von Liganden mit unterschiedlicher Affinität für die einzelnen EGF-Rezeptoren bekannt (Abb. 4): Epidermal Growth Factor (EGF), Transforming Growth Factor- α (TGF- α) und Amphiregulin binden bevorzugt an EGFR. Heparin-binding Epidermal Growth Factor-like Growth Factor (HB-EGF), Betacellulin und Epiregulin aktivieren EGFR und HER4/ErbB4. Die Hereguline (= Neuregulin, = Neu Differentiation Factor = NDF) binden an HER3/ErbB3 und HER4/ErbB4 [Wells 1999].

Von der Struktur her ist allen Liganden eine Aminosäuresequenz gemeinsam: die EGF-like Domäne. Die Liganden werden als glykosylierte transmembranöse Vorläuferproteine synthetisiert. Durch proteolytische Spaltung werden die löslichen Liganden freigesetzt, sodass sie auf auto- bzw. parakrinem Weg die Rezeptoren aktivieren können.

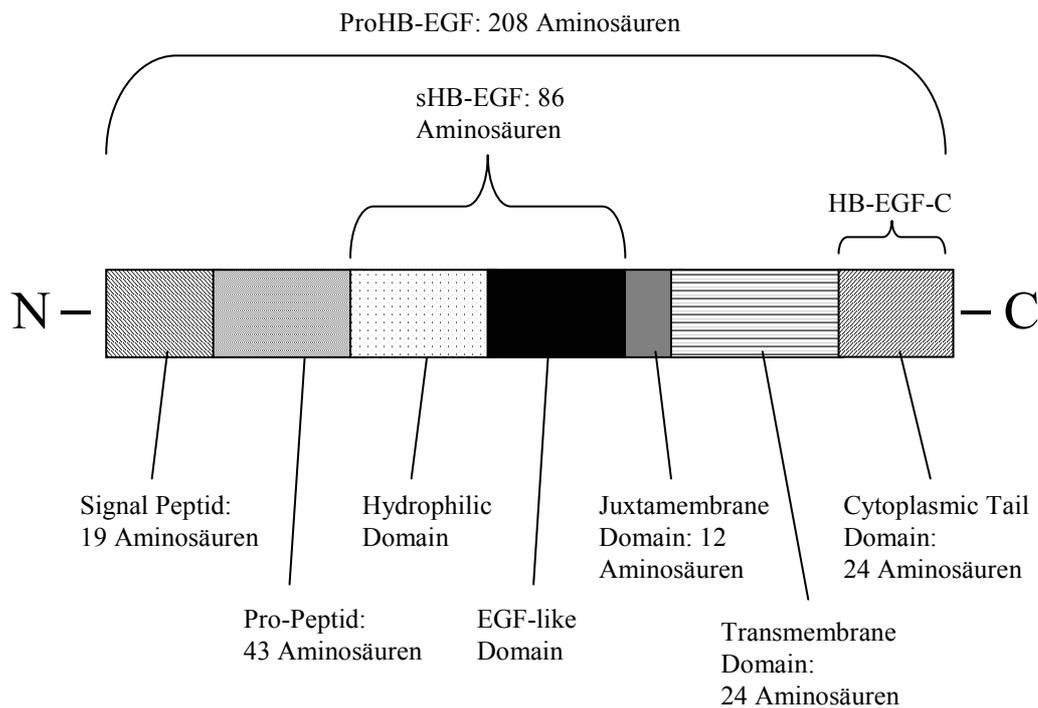
Abb. 4: Die Mitglieder der EGF-Rezeptorenfamilie mit ihren Liganden (nach Colquhoun und Mellon 2002)



HB-EGF

Heparin-binding Epidermal Growth Factor-like Growth Factor (HB-EGF) wurde erstmals 1990 als ein von Makrophagen-Zelllinien sezernierter, Heparin-bindender Wachstumsfaktor beschrieben [Besner et al. 1990]. Das HB-EGF Gen ist auf dem langen Arm von Chromosom 5 in Position 5q23 lokalisiert und kodiert für ein Protein aus 208 Aminosäuren, von denen die EGF-like Domain identisch mit der anderer EGF Wachstumsfaktoren ist. Das Molekül wird primär als membranständiges Molekül (proHB-EGF) gebildet. Es lassen sich sieben Domänen unterscheiden (Abb. 5): Das N-terminale Signal Peptid, das Pro-Peptid, die hydrophile Domäne, die EGF-like Domäne, die juxta-membranöse Domäne, die transmembranöse Domäne und das C-terminale zytoplasmatische Schwanzende [Davis-Fleischer und Besner 1998].

Abb. 5: Struktureller Aufbau des HB-EGF aus den einzelnen Domänen



Durch Metalloproteasen wird proHB-EGF in das lösliche, parakrin sezernierte sHB-EGF und das HB-EGF-C, das aus dem C-terminalen Anteil des proHB-EGF besteht, gespalten [Nanba und Higashiyama 2004].

sHB-EGF bindet an EGFR und löst über dessen Aktivierung die Ras/Raf-MAP-Kinasen-Signalkaskade aus, die die Expression von Cyclin D hochreguliert und damit eine Progression des Zellzyklus in der G1-Phase bewirkt [Prober und Edgar 2001]. Heparin scheint hierbei regulatorisch auf die Interaktion von sHB-EGF mit dem EGF-Rezeptor zu wirken [Cook et al. 1995].

HB-EGF-C transloziert nach der Abspaltung aus proHB-EGF in der späten G1 Phase in den Zellkern und bindet dort an das Promyelocytic Leukaemia Zinc Finger Protein (PLZF), einen nukleären Transkriptionsrepressor, der normalerweise über die Suppression der Expression von Cyclin A den Eintritt der Zelle in die S-Phase blockiert. Die Interaktion von HB-EGF-C und PLZF führt zu einer Translokation von PLZF aus dem Zellkern, wodurch die supprimierende Wirkung des PLZF auf die Expression von Cyclin A aufgehoben wird. Die daraus resultierende vermehrte Expression von Cyclin A löst einen Eintritt der Zelle in die S-Phase aus [Nanba et al. 2003; Toki et al. 2004].

Der Beeinflussung des Zellzyklus durch die beiden Spaltprodukte sHB-EGF und HB-EGF-C und die damit verbundene Kontrolle der Proliferation der Zelle scheint wichtige physiologische Funktionen im Organismus zu erfüllen: So konnte für HB-EGF eine Rolle

bei der Wundheilung in verschiedenen Geweben nachgewiesen werden, u. a. bei mukösen Läsionen im Urothel [Marikovsky et al. 1993; Freeman et al. 1997]. In normalem Urothel stellt HB-EGF einen autokrinen Wachstumsfaktor dar [Freeman et al. 1997]. HB-EGF ist außerdem an der Implantation und Plazentation der Blastozyste im frühen Stadium der Schwangerschaft beteiligt [Yoo et al. 1997].

HB-EGF spielt auch im Hinblick auf maligne Erkrankungen eine Schlüsselrolle, indem seine vermehrte Expression die Proliferation und Neovaskularisation des Tumors stimuliert [Ongusaha et al. 2004]. Nachgewiesen werden konnte eine erhöhte HB-EGF Expression in Pankreaskarzinomen, Leberzellkarzinomen und Magenkarzinomen [Kobrin et al. 1994; Miyoshi et al. 1996; Naef et al. 1996]. In einer immunhistochemischen Untersuchung der Gruppe um M. R. Freeman korrelierte nukleäres HB-EGF in Urothelkarzinomen signifikant mit einer schlechten Prognose in Bezug sowohl auf die rezidivfreie Überlebenszeit, als auch auf die Gesamtüberlebenszeit der Patienten. Dabei lag die 5-Jahres-Überlebensrate bei Patienten mit >20% positiver nukleärer Anfärbung bei 42%, die der Patienten mit <20% positiver nukleärer Anfärbung bei 93% [Adam et al. 2003]. Die Aussagefähigkeit dieser Untersuchung ist durch das inhomogene, lediglich aus 33 Patienten bestehende und sehr unterschiedlich therapierte Patientenkollektiv eingeschränkt. In einer Untersuchung der HB-EGF Expression mittels RT-PCR konnte eine signifikante Korrelation mit dem Tumorstadium (invasive vs. oberflächliche Tumore) nachgewiesen werden [Thogersen et al. 2001].

Bei der Infektionserkrankung Diphtherie ist HB-EGF pathophysiologisch von entscheidender Bedeutung. Als membranständiges Molekül dient proHB-EGF als Diphtherietoxin-Rezeptor, durch den das Toxin des *Corynebacterium diphtheriae* in das Zytoplasma internalisiert werden kann [Mitamura et al. 1997]. Einfluss auf die Bindungsaffinität des proHB-EGF nimmt MRP-1/CD9, ein Mitglied der Transmembran-4 Familie, das durch Komplexbildung mit proHB-EGF zu einer verstärkten Bindung von Diphtherietoxin führt [Iwamoto et al. 1994; Nakamura et al. 2000].

Eine Untersuchung der Arbeitsgruppe um Murayama konnte beim Magenkarzinom vom intestinalen Typ eine Assoziation der CD9 Expression mit der proHB-EGF Expression zeigen [Murayama et al. 2002]. In dieser Untersuchung korrelierten einerseits die proHB-EGF Expression mit dem Tumorstadium und –differenzierungsgrad, andererseits die CD9 Expression invers mit Lymphknotenstatus und Differenzierungsgrad. Die Koexpression beider Faktoren lässt vermuten, dass zwischen CD9 und proHB-EGF eine bedeutsame Interaktion besteht, die die Progression des Tumors beeinflusst. Die CD9 Expression

korreliert beim Harnblasenkarzinom sowohl mit dem Tumorstadium und Differenzierungsgrad als auch mit der rezidivfreien Überlebenswahrscheinlichkeit des Patienten [Mhaweck et al. 2003]. Dies konnte auch in einer bisher unveröffentlichten immunhistochemischen Untersuchung der eigenen Arbeitsgruppe nachgewiesen werden.

1.3. Fragestellung der Arbeit

Die molekularbiologische Grundlagenforschung hat in den letzten Jahren das Verständnis von der Entstehung und Progression maligner Tumore stark vorangetrieben. Daraus gewonnene Erkenntnisse werden auch zunehmend im klinischen Alltag berücksichtigt. Bei der Therapie des muskelinvasiven Harnblasenkarzinoms wird die molekulare Diagnostik in Zukunft eine mögliche Hilfe bei der Entscheidung über die weitere Nachsorge, die Indikationen einer Therapie (z.B. adjuvante Polychemotherapie) und über die Art der Therapie (z. B. Einsatz bestimmter Zytostatika) geben.

Bisherige Untersuchungen lassen vermuten, dass der Wachstumsfaktor HB-EGF und sein Rezeptor EGFR die Progression des Harnblasenkarzinoms beeinflussen. Dabei spielen zwei verschiedene Signalwege eine Rolle: Die Spaltung des membranösen proHB-EGF setzt einerseits das lösliche sHB-EGF und andererseits das C-terminale Fragment HB-EGF-C frei. sHB-EGF aktiviert den EGF-Rezeptor, während HB-EGF-C in den Zellkern transloziert und dort Rezeptor-unabhängig den Zellzyklus beeinflusst.

Die vorliegende retrospektive immunhistochemische Untersuchung soll anhand eines klinisch homogenen Kollektivs von Patienten mit invasivem Harnblasenkarzinom Aufschluss über folgende Fragen geben:

1. Gibt es eine Korrelation zwischen der Expression von HB-EGF und EGFR mit den klinischen und histopathologischen Parametern und den onkologischen Nachbeobachtungsergebnissen des Patienten?
2. Gibt das Muster der HB-EGF- und EGFR Expression Aufschluss über die pathophysiologische Bedeutung der entsprechenden Signalkaskaden?

2. Material

2.1. Reagenzien, Verbrauchsmaterial, Antikörper

<i>Reagenzien/Verbrauchsmaterial</i>	<i>Hersteller</i>
Adhäsionsobjektträger Histobond	Marienfeld, Bad Mergentheim
Antibody Diluent	Dako, Hamburg
Biotinylated Anti-Chicken IgG	Vector Laboratories, Burlingame, USA
Biotinylated Anti-Mouse IgG	Vector Laboratories, Burlingame, USA
Bovine Serum Albumin (BSA)	Roche, Mannheim
Chem Mate Detektionssystem	Dako, Hamburg
DAB-Substrat-Chromogen System	Skytek Laboratories, Logan, Utah, USA
Deckgläser	Engelbrecht, Edermünde
Digest-All 3 (Pepsin Solution)	Zymed, San Francisco, USA
Anti-EGFR Clone: 31G7	Zymed, San Francisco, USA
Eosin	Fluka, Deisenhofen
Ethanol	Merck, Darmstadt
Eindeckmittel Eukitt	Kindler, Freiburg
Anti-HB-EGF Antikörper	freundlicherweise von R. M. Adam, Children`s Hospital Boston and Harvard Medical School, Boston, Massachusetts, USA zur Verfügung gestellt
Hämalaun	Merck, Darmstadt
Hematoxylin	Merck, Darmstadt
Methanol	Merck, Darmstadt
Methylgrün	Fluka, Deisenhofen
Mikrotom-Klingen	Engelbrecht, Edermünde
Normal Horse Serum	Vector Laboratories, Burlingame, USA
Triton-X-100	Fluka, Deisenhofen
Vectastain ABC Kit	Vector Laboratories, Burlingame, USA
Waschpuffer	Dako, Hamburg
Wasserstoffperoxid, 30%	Merck, Darmstadt
Xylol	Merck, Darmstadt

2.2. Lösungen

PBS, pH 7,4:	137,0 mM NaCl
	2,7 mM KCl
	8,1 mM Na ₂ HPO ₄
	1,5 mM KH ₂ PO ₄
PBSA, pH 7,2: PBS	2% Bovines Serum Albumin (BSA) in PBS
Zitratpuffer, pH 6:	0,1 M Zitronensäure 0,1 M Natriumzitat
Azetatpuffer, pH 4	0,5 M Natriumazetat

2.3. Geräte

<i>Geräte</i>	<i>Typ</i>	<i>Hersteller</i>
Färbeautomat	Tecan Genesis RSP	Tecan, Crailsheim
Rotationsmikrotom	HM 400	Microm, Walldorf
Brutschrank	B 5061 EK CO ₂	Heraeus, Hanau
Lichtmikroskop	Dialux 22EB	Leitz, Wetzlar
Photomikroskop	II	Zeiss, Jena

3. Patientenkollektiv und Gewebeproben

Im Zeitraum vom 01.01.1993 bis zum 31.12.2001 unterzogen sich in der Urologischen Klinik der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf 169 Patienten wegen eines Harnblasenkarzinoms einer Zystektomie. Davon wurden 162 Patienten in kurativer Intention operiert, 7 wiesen zum Zeitpunkt der Operation Fernmetastasen auf bzw. zeigten intraoperativ einen nicht im Gesunden resizierbaren Tumor (R2-Resektion). Bei allen mit kurativer Intention operierten Patienten wurde eine radikale Zystektomie mit bilateraler pelviner Lymphadenektomie durchgeführt.

Das Tumorstadium wurde gemäß der TNM-Klassifikation von 1997 nach den Empfehlungen der UICC klassifiziert. Bei den Tumoren, die vor 1997 operiert und dementsprechend ursprünglich nach der TNM-Klassifikation von 1993 eingeteilt wurden, fand eine Reklassifizierung nach der TNM-Klassifikation von 1997 anhand der schriftlichen histopathologischen Befunde statt. Der Differenzierungsgrad wurde nach Bergkvist bestimmt [Bergkvist et al. 1965]. Für die statistische Analyse wurden pTis, pT1 und pT2a,b Tumore (jeweils mit negativen Lymphknoten) als organbegrenzte Tumore definiert während pT3, pT4 und die lymphogen metastasierten Tumore als organüberschreitend zusammengefasst wurden.

Der weitere Krankheitsverlauf wurde durch retrospektive Analyse der Krankenakten der Urologischen Klinik der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf und der Unterlagen der betreuenden niedergelassenen Urologen oder Hausärzte erfasst; zum Teil wurde mit den Patienten oder deren Angehörigen Kontakt aufgenommen. Auch wurden in auswärtigen Krankenhäusern oder anderen Abteilungen schriftliche Unterlagen über weitere Behandlungen der Patienten angefordert. Die daraus gewonnenen Daten der Nachbeobachtung gingen in eine Datenbank ein.

Eine in der Bildgebung mittels CT oder MRT nachgewiesene zweidimensional messbare Läsion oder eine in der Knochenszintigraphie vorhandene metastasenverdächtige Mehranreicherung wurde als Tumorrezidiv gewertet. Ein Rezidiv im Bereich des kleinen Beckens wurde als Lokalrezidiv beurteilt. Metastasen in anderen Organen oder Lymphknotenmetastasen oberhalb der Bifurkation der Arteria iliaca communis wurden analog der TNM-Klassifikation als Fernmetastasen definiert.

Für die vorliegende Arbeit wurden nur Patienten berücksichtigt, die sich in kurativer Intention einer Zystektomie unterzogen haben und außer einem Urothelkarzinom (+/- plattenepithelial differenzierte Anteile) bzw. einem Plattenepithelkarzinom keine andere Histologie aufwiesen. In einigen Fällen war nach der histologischen Begutachtung kein

parffineingebettetes Blasenmorgewebe mehr verfügbar. Soweit vorhanden wurde dann auf Tumormaterial der der Zystektomie unmittelbar vorausgegangenen transurethralen Blasenmorrresektion zurückgegriffen. Das Tumormaterial und die klinischen Daten von 121 konsekutiven Patienten erfüllten die vorgegebenen Kriterien und bilden die Grundlage dieser Arbeit.

Bei den 121 Patienten handelte es sich um 86 Männer und 35 Frauen mit einem mittleren Alter von 68,5 Jahren (43 bis 89 Jahre). Der mediane Nachbeobachtungszeitraum der Patienten betrug 20 Monate. Der mediane Nachbeobachtungszeitraum der zum Zeitpunkt der letzten Datenerhebung noch lebenden Patienten betrug 51 Monate.

Histologisch wiesen 114 Patienten (94%) ein Urothelkarzinom (+/- plattenepithelialer Differenzierung) und 7 (6%) ein Plattenepithelkarzinom auf. 25 Tumore (21%) waren als mittelgradig (G2), 92 Tumore (76%) als schlecht differenziert (G3) und 4 Tumore (3%) als entdifferenziert (G4) klassifiziert worden. Als Tumorstadium fanden sich 1 pTis (1%), 6 pT1 (5%), 41 pT2 Tumore (34%), 55 pT3 Tumore (45%) und 18 pT4 Tumore (15%) (Tab. 1). Die Lymphknoten waren bei 89 Patienten (73%) tumorfrei (pN0); solitäre Lymphknotenmetastasen (pN1) wurden bei 8 (7%) und multiple Lymphknotenmetastasen (pN2) bei 24 Patienten (20%) nachgewiesen. Unter Betrachtung der lokalen Tumorausbreitung und der Lymphknoteninfiltration wiesen 45 Tumore (37%) ein organbegrenztetes Wachstum auf, während 76 Tumore (63%) organüberschreitend wuchsen. Während 109 Patienten (90%) keine Infiltration des chirurgischen Resektionsrandes (R0) aufwiesen, stellte sich bei 12 Patienten (10%) eine mikroskopisch nachweisbare Tumorerinfiltration des chirurgischen Resektionsrandes (R1) dar.

Bei 54 (45%) der 121 Patienten trat im Verlauf der Nachbeobachtungszeit ein Tumorreizidiv auf. Dabei handelte es sich bei 22 Patienten (41%) primär um ein Lokalrezidiv und bei 32 Patienten (59%) um eine primäre Fernmetastasierung. 50 Patienten (41%) verstarben im Verlauf des Nachbeobachtungszeitraums an ihrem Harnblasenkarzinom. Die verbleibenden 71 Patienten (59%) leben noch oder verstarben nicht tumorbedingt an einer anderen Ursache. 6 Patienten (5%) verstarben perioperativ (während des stationären Aufenthalts oder innerhalb von 30 Tagen postoperativ). Von den 121 Patienten erhielten 2 Patienten (1,7%) eine neoadjuvante und 17 Patienten (14%) eine adjuvante Chemotherapie.

Tab. 1: Tumorstadium, Differenzierungsgrad, Lymphknotenstatus und Fernmetastasen von 121 Patienten nach Zystektomie in kurativer Intention

Tumorstadium		Differenzierungsgrad		Lymphknotenstatus		Fernmetastasen	
pTa, pTis, pT1	7	G1	0	pN0	89	M0	121
pT2	41	G2	25	pN1	8	M+	0
pT3	55	G3	92	pN2	24		
pT4	18	G4	4				
Gesamt	121	Gesamt	121	Gesamt	121	Gesamt	121

4. Methoden

4.1. Gewebeaufarbeitung

Das bei den Zystektomien und transurethralen Resektionen in der Urologischen Klinik der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf entnommene Harnblasengewebe wurde in 4% gepufferter Formalinlösung fixiert und anschließend im Institut für Pathologie in Paraffin eingebettet.

Für die immunhistochemischen Expressionsuntersuchungen wurden von den Paraffinblöcken je 4 µm dicke Gewebeschnitte angefertigt und auf Objektträger aufgezogen.

Um die Intensität der Färbung objektiv beurteilen zu können, wurde auf jeden Objektträger zusätzlich ein 4 µm dicker Querschnitt eines Harnleiters mit normaler Mukosa, der bei Nephrektomien asserviert und ebenfalls in Paraffin eingebettet worden war, aufgezogen und mitgefärbt. Die Objektträger wurden dann zur Vermeidung von Luftblasen 10 Minuten im Brutschrank bei 100°C inkubiert und im Folgenden für 12 Stunden zur Verbesserung der Adhäsion des Schnittes am Objektträger im Brutschrank bei 60°C belassen.

4.2. Hematoxilin/Eosin-Färbung

Zur Identifikation der Tumoranteile wurde von allen Paraffinblöcken ein Hematoxilin/Eosin-Schnitt (HE-Schnitt) angefertigt. Die Schnitte wurden zur Entparaffinierung für 12 Minuten in Xylol inkubiert, anschließend in einer absteigenden Alkoholreihe (100%, 96%, 70%, 60%) rehydriert. Darauf erfolgten eine zweiminütige Hematoxilin-färbung und ein Spülvorgang unter Leitungswasser für 5 Minuten. Die Gegenfärbung wurde durch eine 2 Minuten dauernde Inkubation mit Eosin erreicht; danach wurden die Schnitte mit Leitungswasser gespült. Zur Dehydratation wurden die Schnitte je 2 Minuten in einer aufsteigenden Alkoholreihe (60%, 70%, 96%, 100%) inkubiert, dann für 5 Minuten in Xylol überführt und mit Eukitt eingedeckt.

4.3. Immunhistochemie

4.3.1. HB-EGF

Der zur immunhistochemischen Färbung verwendete Antikörper wurde freundlicherweise von R. M. Adam, Children`s Hospital Boston and Harvard Medical School, Boston, Massachusetts, USA zur Verfügung gestellt. Er ist gegen das Epitop GYDVNEEKVKLGMTSH des proHB-EGF gerichtet; dieses Epitop ist Bestandteil der C-terminalen Domäne des proHB-EGF. HB-EGF-C, das als Spaltprodukt aus proHB-EGF entsteht, beinhaltet dieses Epitop auch und wird somit ebenfalls von dem Antikörper gebunden. Die Arbeitsgruppe um M. R. Freeman und R. M. Adam ließ den Antikörper von der Firma QCB Custom Antibody Service herstellen. Dazu wurden Hühner mit dem spezifischen Epitop immunisiert. Die daraufhin gebildeten Antikörper konnten aus dem Eidotter der Hühner separiert werden. In weiteren Schritten wurde der Antikörper aufgereinigt. Die Fähigkeit des Antikörpers, das Zielprotein zu erkennen, wurde von der o.g. Arbeitsgruppe durch Immunpräzipitationsuntersuchungen und Immunblotanalysen bestätigt [Adam et al. 2003].

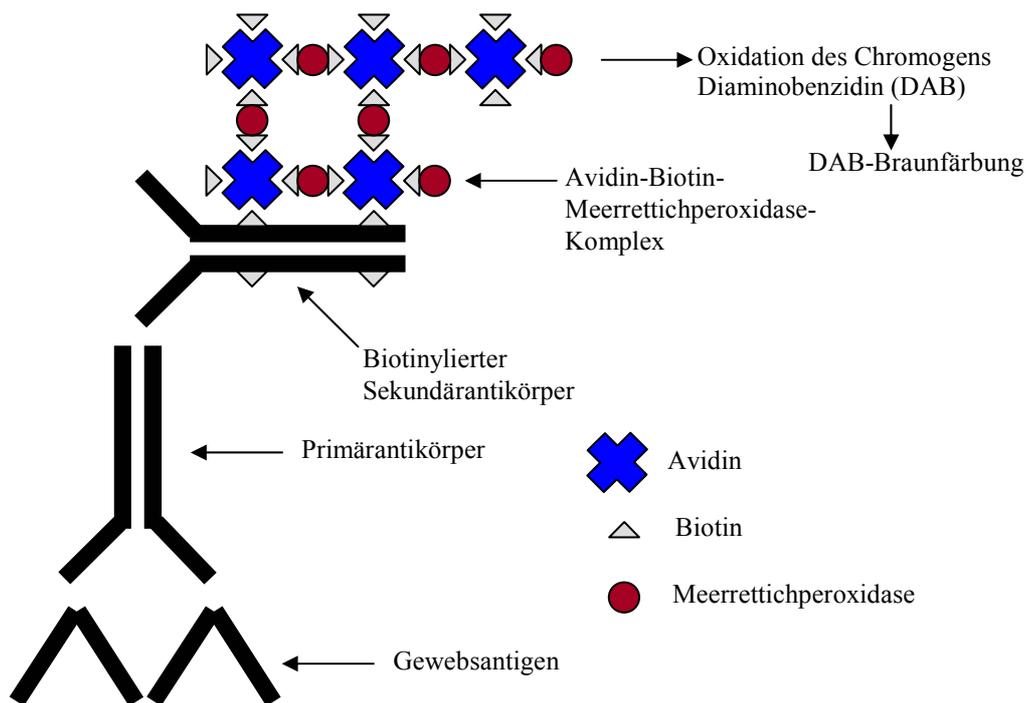
Für die immunhistochemische Detektion des HB-EGF wurde eine standardisierte Avidin-Biotin-Komplexmethode (ABC) verwendet (Abb. 6).

Die 4 µm dicken Schnitte wurden 12 Minuten in Xylol entparaffiniert und anschließend in einer absteigenden Alkoholreihe (100%, 96%, 70%, 60%) rehydriert. Nach kurzem Spülen unter Leitungswasser wurden die Schnitte zur Blockierung der endogenen Peroxidasen für 15 Minuten in eine 1% Wasserstoffperoxid/Methanol Lösung gestellt. Nach erneutem Spülen unter Leitungswasser wurden die Objektträger für 4 Minuten in eine 0,03% Triton-X100/Aqua dest.-Lösung überführt. Anschließend wurden die Schnitte mit dem HB-EGF-Antikörper in einer Verdünnung von 1:100 in PBSA für 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Spülen unter Leitungswasser wurden die Schnitte in eine 0,03% Triton-X100/Aqua dest.-Lösung überführt. Anschließend wurden die Schnitte mit dem biotinylierten Zweitantikörper (anti-Hühnchen) in einer Verdünnung von 1:200 in PBSA für 1 Stunde inkubiert. Der Zweitantikörper wurde unter Leitungswasser abgespült, die Schnitte kurz in die 0,03% Triton-X100/Aqua dest.-Lösung überführt und dann für 1 Stunde mit einer Lösung aus Avidin-Biotin-Meerrettichperoxidase-Komplexen (Vectastain ABC Kit) in einer Verdünnung von 1:100 in PBSA inkubiert. Anschließend wurden die Objektträger erneut mit fließendem Wasser gespült und in die 0,03% Triton-X100/Aqua

dest.-Lösung gestellt. Darauf folgte die Anfärbung mit dem Diaminobenzidin-Substrat-Chromogen System (DAB-System) für 6 Minuten, bei der das Diaminobenzidin durch die Meerrettichperoxidase oxidiert wird und sich dadurch braun färbt. Die Schnitte wurden unter Leitungswasser gespült und vier Sekunden mit Hämalaun gegengefärbt. Zur Dehydratation wurden die Präparate je 2 Minuten in einer aufsteigenden Alkoholreihe (60%, 70%, 96%, 100%) inkubiert, anschließend für 5 Minuten in Xylol überführt und mit Eukitt eingedeckt.

Als Positivkontrolle diente der Nachweis angefärbter Urothelzellen und der Muskulatur des Harnleiters. Zur Negativkontrolle wurde jeweils ein Schnitt der Färbereihe mit PBSA anstelle des Erstantikörpers inkubiert.

Abb. 6: Avidin-Biotin-Enzymkomplexmethode (ABC-Methode): Vorgeformte Avidin-Biotin-Meerrettichperoxidase-Enzymkomplexe reagieren mit biotinylierten Sekundärantikörpern. Die Peroxidase-Aktivität wandelt Diaminobenzidin (DAB) durch Oxidation in eine unlösliche braun gefärbte Verbindung um (nach Dako Handbuch II immunchemischer Färbemethoden).



4.3.2. EGFR

Für die immunhistochemische Anfärbung wurde der monoklonale Erstantikörper Anti-EGFR (Clone: 31G7) der Firma Zymed, der den EGF Rezeptor Typ 1 (=EGFR, =HER1, =ErbB1) bindet, verwendet. Zur Detektion wurde eine standardisierte Avidin-Biotin-Komplexmethode (ABC) benutzt (Abb. 6).

Die Gewebeschnitte wurden durch eine 10 minütige Inkubation in Xylol entparaffiniert, anschließend in einer absteigenden Alkoholreihe (99%, 96%, 70%) rehydriert und für 10 Minuten in Aqua dest. überführt. Zur Demaskierung der Antigene fand eine proteolytische 25 minütige Pepsinandaung (Digest-All 3) statt, der ein Waschvorgang mit Aqua dest. folgte. Die endogenen Peroxidasen wurden durch eine Inkubation der Schnitte mit einer 0,3% Wasserstoffperoxidlösung in Aqua dest. für 15 Minuten blockiert, anschließend wurden die Objektträger in Waschpuffer gespült. Die weiteren Schritte wurden unter standardisierten Bedingungen in einem Färbeautomaten (Tecan Genesis RSP) durchgeführt. Der Primärantikörper, mit Antibody Diluent auf 1:20 verdünnt, inkubierte für 30 Minuten auf den Schnitten, danach folgte ein Spülvorgang mit Waschpuffer. Anschließend wurde das Chem Mate Detektionssystem eingesetzt, das aus einem biotinylierten Sekundärantikörper, HRP konjugiertem Streptavidin und einer DAB-Lösung besteht. Der biotinylierte Sekundärantikörper und das Streptavidin wurden für 30 Minuten auf den Präparaten belassen, die DAB-Lösung verblieb für 5 Minuten auf den Schnitten. Die Objektträger wurden in Aqua dest. überführt und für 5 Minuten in 0,5 M Acetatpuffer (pH 4) inkubiert. Die Gegenfärbung erfolgte in einer 2% Methylgrünlösung in 0,5 M Acetatpuffer (pH 4). Im Folgenden wurden die Gewebeschnitte manuell für 3 Minuten in Butanol dehydriert, in Xylol eingestellt und anschließend mit Eukitt eingedeckt. Als Positivkontrolle diente der Nachweis von angefärbten basalen Urothelzellen des Harnleiters; zur Negativkontrolle wurde bei jedem Färbedurchgang ein Schnitt mit PBSA anstelle des Erstantikörpers inkubiert.

4.4. Semiquantitative Evaluation

Die Evaluation der immunhistochemischen Färbungen erfolgte semiquantitativ durch zwei unabhängige Untersucher (Prof. Dr. H. Bojar, Institut für Onkologische Chemie HHU Düsseldorf; C. Kramer). Bei Nichtübereinstimmung der Ergebnisse wurden die Präparate erneut begutachtet und ein Konsens in der Evaluation geschaffen.

HB-EGF

Die Beurteilung der HB-EGF Färbungen erfolgte für das Zytoplasma und den Zellkern getrennt (Tab. 2). Dabei wurden für das Zytoplasma der Prozentsatz (0%, <10%, 10 – 50%, 51 – 80%, >80%) positiver Tumorzellen und die Intensität (negativ, schwach, mäßig, stark) evaluiert. Die gewählten Prozent- und Intensitätsabstufungen entsprechen den internationalen Evaluationskriterien der Beurteilung der Östrogenrezeptorexpression beim Mammakarzinom [Beck et al. 1994]. Im Gegensatz zur Östrogenrezeptorevaluation wurde in dieser Arbeit jedoch kein „Score“ aus der Multiplikation von Prozentsatz positiver Zellen und Intensität gebildet, sondern die Einzelfaktoren getrennt betrachtet. Zusätzlich wurde zur objektiven Beurteilung der zytoplasmatischen Anfärbeintensität die Intensität der Tumorzellen mit der gleich bleibenden Intensität basaler Mukosazellen eines Harnleiterquerschnitts, der sich jeweils auf demselben Objektträger befand, verglichen und als negativ, schwächer, gleich oder stärker klassifiziert.

Bei der Beurteilung der Kernfärbung wurden ebenfalls sowohl der Prozentsatz (0%, <10%, 10 – 20%, 21 – 50%, 51 – 80%, >80%) positiver Zellen als auch die Intensität (negativ, schwach, mäßig, stark) der angefärbten Zellkerne berücksichtigt. Zusätzlich zu den prozentualen Abstufungen, wie sie bei der Östrogenrezeptorevaluation angewendet werden, wurde in dieser Arbeit eine weitere Abstufung bei 20% (10 - 20%; 21 - 50%) mit in die Auswertung aufgenommen, da Adam et al. 20% HB-EGF-positiver Nuklei als Grenzwert („Cut-Off-Wert“) bei ihrer Evaluation definiert haben [Adam et al. 2003].

Tab. 2: Initiale HB-EGF Auswertungskriterien: Getrennte Evaluation des Nukleus und Zytoplasma. Für die abschließende Beurteilung wurde nur die prozentuale nukleäre und zytoplasmatische HB-EGF Expression berücksichtigt.

HB-EGF Evaluation									
Zytoplasma						Nukleus			
Prozent pos. Zellen		Intensität		Vergleich mit Ureter		Prozent pos. Zellen		Intensität	
0	0%	0	Negativ	0	Negativ	0	0%	0	Negativ
1	<10%	1	Schwach	1	Schwächer	1	<10%	1	Schwach
2	10-50%	2	Mäßig	2	Gleich	2	10-20%	2	Mäßig
3	51-80%	3	Stark	3	Stärker	3	21-50%	3	Stark
4	>80%					4	51-80%		
						5	>80%		

Bei der (retrospektiven) statistischen Auswertung zeigte sich, dass die Färbeintensität sowohl im Zytoplasma als auch im Zellkern und der Intensitätsvergleich mit dem Ureter (Zytoplasma) keine Korrelation mit den histopathologischen Parametern und der rezidivfreien bzw. tumorspezifischen Überlebenswahrscheinlichkeit der Patienten aufwies. Daher wurde im Folgenden nur die prozentuale nukleäre und zytoplasmatische HB-EGF Expression dargestellt und für die weiteren statistischen Analysen berücksichtigt. Für die abschließende Beurteilung der zytoplasmatischen HB-EGF Expression wurde eine Färbung von $\leq 80\%$ der Tumorzellen als schwache und $>80\%$ der Tumorzellen als starke zytoplasmatische HB-EGF Expression klassifiziert. Eine nukleäre Färbung von $\geq 20\%$ der Tumorzellen wurde als starke, eine von $<20\%$ der Tumorzellen als schwache nukleäre HB-EGF Expression festgelegt.

EGFR

Die Evaluation der EGFR Expression erfolgte analog der standardisierten HER2-Beurteilung in 4 Kategorien [Ellis et al. 2004]: Im Falle einer Färbung von <10% der Tumorzellen wurde der Schnitt als negativ gewertet. Eine schwache membranöse Anfärbung wurde als 1+, eine mäßige Anfärbung als 2+ und eine starke Anfärbung als 3+ gewertet. Um auch hier wieder einen objektiven Intensitätsvergleich zu ermöglichen, wurde die Intensität der Tumorzellen mit der Intensität basaler Mukosazellen eines Harnleiterquerschnitts, der auf jedem Objektträger vorhanden war, verglichen und als negativ, schwächer, gleich oder stärker gefärbt beurteilt (Tab. 3).

Tab. 3: EGFR Auswertungskriterien

EGFR Evaluation			
Färbeintensität		Vergleich mit Ureter	
0	Keine Membrananfärbung	0	Keine Membrananfärbung
1+	Schwache Membrananfärbung	1	Schwächer als Ureter
2+	Mäßige Membrananfärbung	2	Gleich
3+	Starke Membrananfärbung	3	Stärker als Ureter

Da die Auswertung der Färbeintensität und des Intensitätsvergleichs mit dem Ureter identische Ergebnisse erbrachten wurde im Folgenden nur die Färbeintensität dargestellt. Für die abschließende Beurteilung wurden keine Membrananfärbung als negativ bzw. eine schwache, mäßige oder starke EGFR Expression als positive Färbereaktion klassifiziert.

4.5. Statistische Auswertung

Sämtliche statistische Analysen erfolgten mit SPSS für Windows (12.0). Für die Überprüfung auf Normalverteilung der erhobenen Daten wurde die Verteilungsanalyse nach Kolmogorov und Smirnov angewandt. Die Auswertung wurde unter Verwendung der Standardmethoden Mann-Whitney U-Test, T-Test und Pearson's χ^2 -Test durchgeführt. Darüber hinaus angewendete Tests sind im Ergebnisteil gesondert ausgewiesen. Als statistisch signifikant wurde ein p-Wert $< 0,05$ gewertet.

Als rezidivfreies Intervall wurde der Zeitraum zwischen der in kurativer Intention durchgeführten Zystektomie und dem Nachweis eines Rezidives definiert. Die Patienten, die bis zum Zeitpunkt der letzten Stuserhebung rezidivfrei waren oder die ohne Tumorrezidiv verstarben, wurden für die statistische Analyse zensiert.

Die Ermittlung der Überlebenszeit wurde analog der Berechnung der rezidivfreien Zeit durchgeführt. Für die Analyse des tumorspezifischen Überlebens wurden die zum Zeitpunkt der letzten Stuserhebung noch lebenden Patienten und die unabhängig von der Tumorerkrankung verstorbenen Patienten, zensiert. Für die Untersuchungen des Gesamtüberlebens (Überlebenszeit unabhängig von der Todesursache) wurden die zum Zeitpunkt der letzten Stuserhebung noch lebenden Patienten zensiert.

Die Darstellung des Gesamtüberlebens, tumorspezifischen und rezidivfreien Überlebens der Patienten erfolgte durch Kaplan-Meier Schätzung. Der Log-Rank Test wurde zum statistischen Vergleich verschiedener Patientengruppen verwendet.

5. Ergebnisse

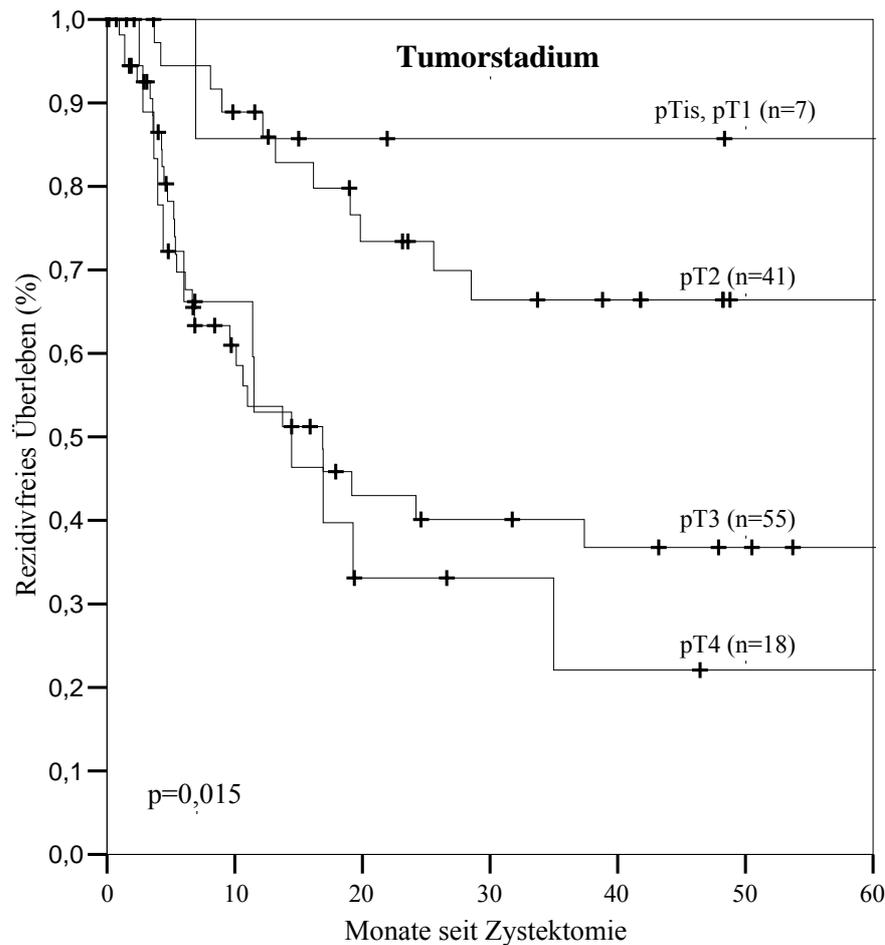
5.1. Prognostische Aussagekraft etablierter histopathologischer Parameter

Für alle 121 Patienten wurden die Werte für die jeweilige Wahrscheinlichkeit eines rezidivfreien bzw. tumorspezifischen Überlebens sowie für das Gesamtüberleben durch eine Kaplan-Meier Schätzung berechnet. Danach erlitten nach 1 Jahr 32%, nach 3 Jahren 51% und nach 5 Jahren 52% der Patienten ein Tumorrezidiv. Tumorbedingt verstarben im ersten Jahr 24%, innerhalb von 3 Jahren 48% und in 5 Jahren 54% der Patienten. Insgesamt konnte eine Gesamtüberlebensrate nach 1 Jahr von 66%, nach 3 Jahren von 41% und nach 5 Jahren von 33% ermittelt werden.

Die rezidivfreie bzw. tumorspezifische Überlebenswahrscheinlichkeit und die Gesamtüberlebensrate wiesen eine signifikante Abhängigkeit von den histopathologischen Parametern auf (Abb. 7): Danach verschlechterte sich die Prognose mit zunehmender lokaler Tumorausbreitung und dem Ausmaß der lymphogenen Metastasierung. Nach 5 Jahren waren von den Patienten mit pTis, pT1 und pT2a,b Tumoren 69% rezidivfrei gegenüber 33% mit pT3 und pT4 Tumoren ($p < 0,0001$) und lediglich 8% der Patienten mit lymphogener Metastasierung ($p < 0,0012$). Die Wahrscheinlichkeit, innerhalb von 5 Jahren tumorbedingt an einem pTis, pT1 und pT2a,b Tumor zu versterben betrug 30%, an einem pT3 und pT4 Tumor 72% ($p < 0,0001$) und an einem lymphogen metastasierten Tumor 100% ($p < 0,0002$).

Außer Tumorstadium und Lymphknotenstaus korrelierten in der univariaten Analyse auch der Differenzierungsgrad sowie der chirurgische Absetzungsrand signifikant mit der rezidivfreien bzw. tumorspezifischen Überlebenswahrscheinlichkeit und dem Gesamtüberleben. Dagegen wiesen Alter und Geschlecht der Patienten keine signifikante Korrelation mit der Prognose auf.

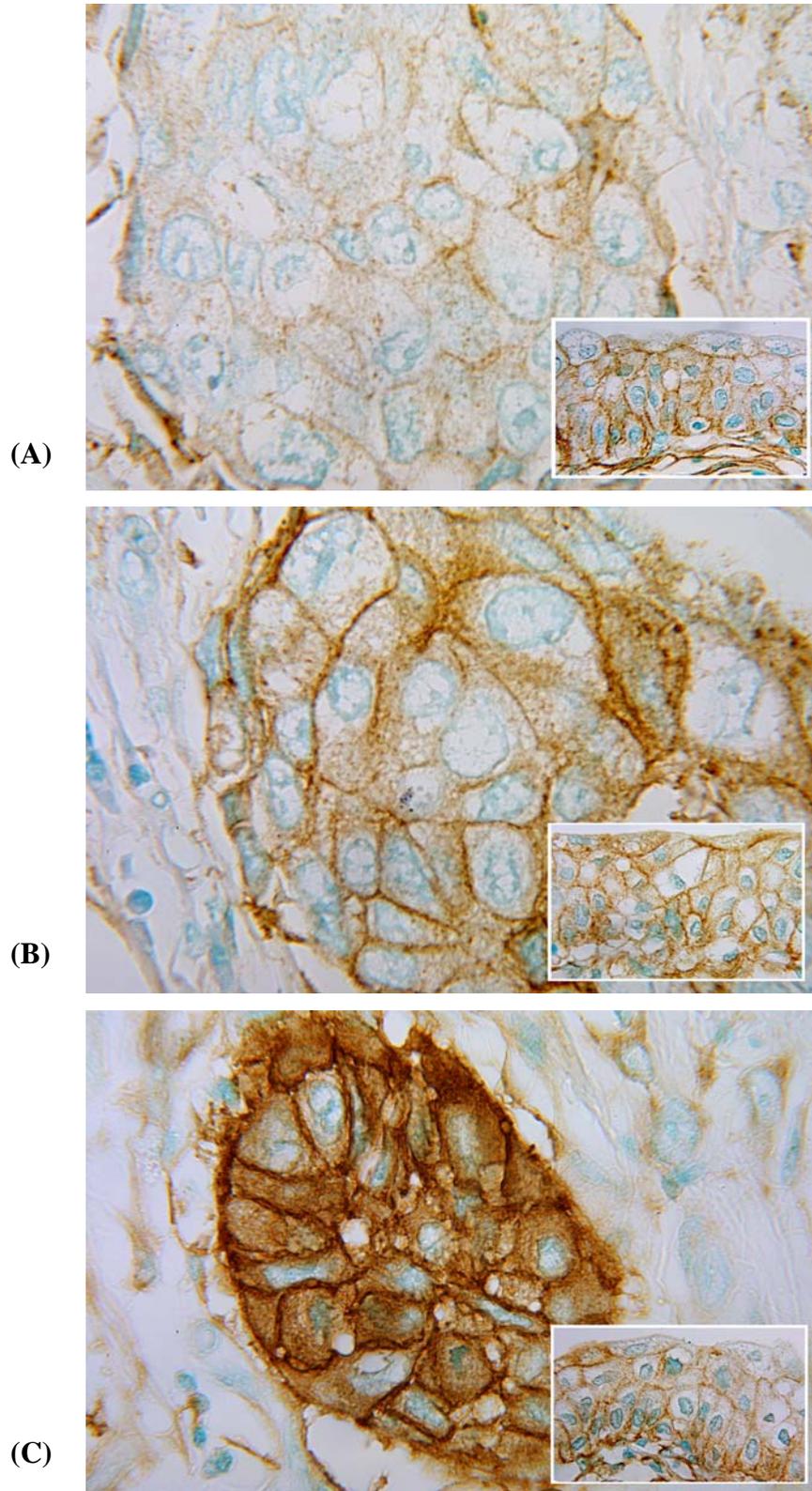
Abb. 7: Kaplan-Meier-Schätzung der rezidivfreien Überlebenszeit nach Zystektomie in Abhängigkeit vom T-Stadium.



5.2. Expressionsanalyse von EGFR

Die immunhistochemische Detektion von EGFR zeigte für die Tumorzellen eine vorwiegend membranöse Anfärbung (Abb. 8). Auch die basalen Harnleitermukosazellen, die als interne Kontrolle auf jedem Schnitt vorhanden waren, wiesen eine durchweg gleichmäßige membranöse Färbung auf. 29 Tumore zeigten keine Färbung für EGFR, 26 Tumore wiesen eine schwache, 21 Tumore eine mittelgradige und 45 Tumore eine starke EGFR Expression auf. Als positiv in der EGFR Färbereaktion wurden alle Tumore mit schwacher, mäßiger oder starker EGFR Expression (n=92) bewertet.

Abb. 8: Immunhistochemischer Nachweis einer schwachen (A), mäßigen (B) und starken (C) EGFR Expression bei urothelialen Harnblasenkarzinomen in 600x Vergrößerung. Für die semiquantitative Auswertung enthielt jeder Objektträger einen normalen Harnleiterquerschnitt (Insert), der den Vergleich mit normalem Urothel erlaubte.



5.2.1. Korrelation mit klinischen und histopathologischen Parametern

Eine signifikante Korrelation der EGFR Expression bestand in dieser Untersuchung mit dem Tumorstadium ($p=0,009$) und Differenzierungsgrad ($p=0,046$). Es konnte keine Korrelation zwischen der EGFR Expression und Alter, Geschlecht oder Lymphknotenstatus der Patienten gefunden werden (Tab. 4).

Tab. 4: Korrelation der EGFR Expression mit Patienten- und Tumorcharakteristika

Parameter	EGFR Expression			
	Anzahl Patienten	Stark	Negativ/ Schwach/ Mäßig	χ^2 -Test
Alter (Jahre)				
<60	19	5 (26)	14 (74)	
60-70	44	17 (39)	27 (61)	
>70	58	23 (40)	35 (60)	n.s.
Geschlecht				
Männlich	86	27 (31)	59 (69)	
Weiblich	35	18 (51)	17 (49)	n.s.
Stadium				
pTis, pT1	7	0 (0)	7 (100)	
pT2	41	10 (24)	31 (76)	
pT3	55	28 (51)	27 (49)	
pT4	18	7 (39)	11 (61)	P=0.009*
Lymphknotenstatus				
pN0	89	35 (39)	54 (61)	
pN1	8	3 (38)	5 (62)	
pN2	24	7 (29)	17 (71)	n.s.*
Differenzierungsgrad				
G2	25	5 (20)	20 (80)	
G3/G4	96	40 (42)	56 (58)	P=0.046

* Pearson's χ^2 -Test für organbegrenzte (\leq pT2) vs. organüberschreitende (\geq pT3) bzw. Lymphknoten-negative (pN0) vs. lymphogen metastasierte (pN1-2) Tumore.

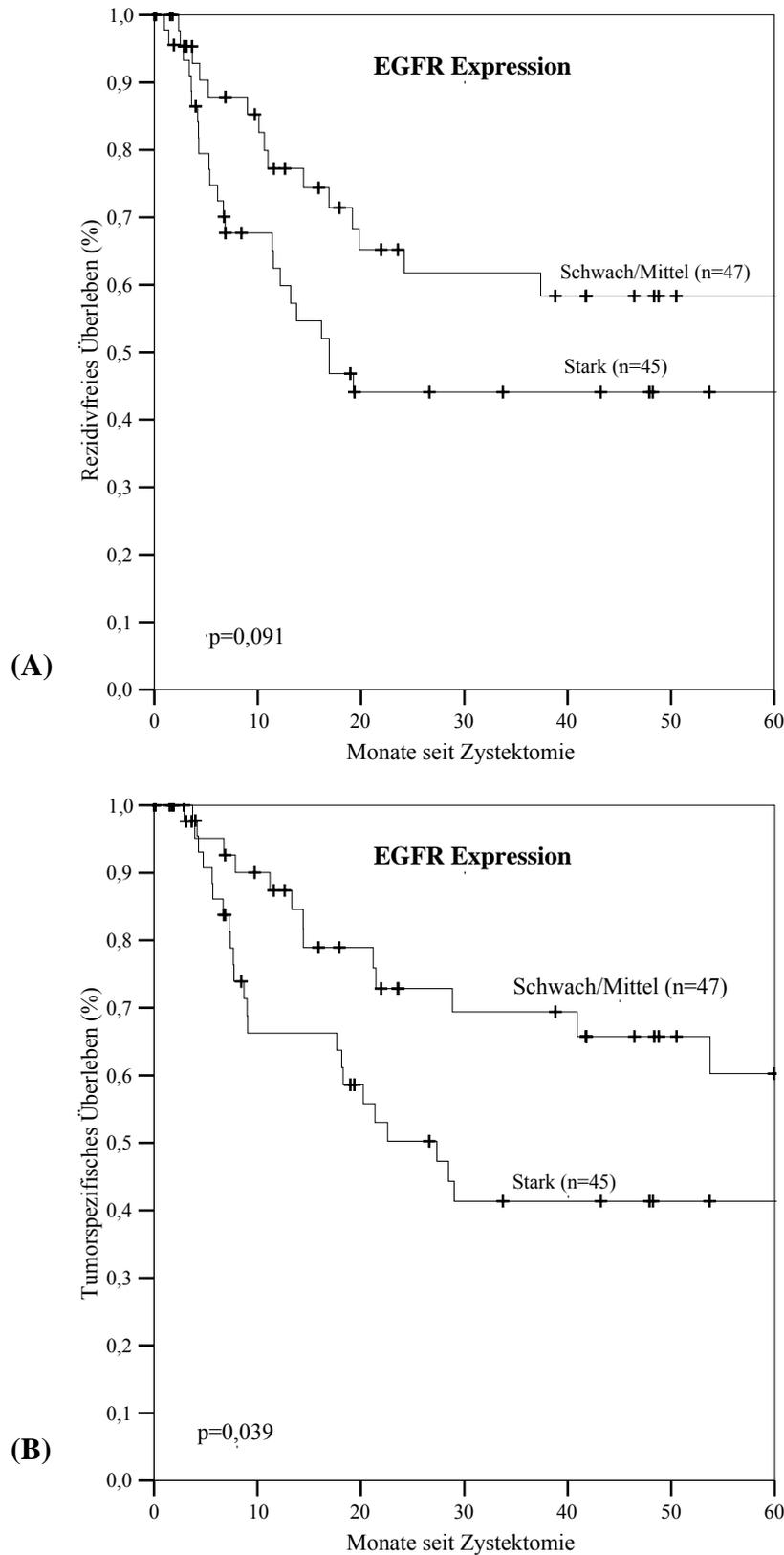
5.2.2. Korrelation mit dem klinischen Verlauf

Bei der Betrachtung der rezidivfreien bzw. tumorspezifischen Überlebensraten in der Kaplan-Meier Analyse konnte festgestellt werden, dass die Patienten mit negativer EGFR Expression im Tumor, gegenüber denen mit schwacher, mäßiger oder starker Expression, die niedrigsten Überlebenswahrscheinlichkeiten aufwiesen; diese Differenzen erreichten jedoch kein Signifikanzniveau (Ergebnisse nicht abgebildet).

Für die weitere kombinierte Betrachtung von Ligand (HB-EGF) und Rezeptor (EGFR) wurden nur die Patienten betrachtet, bei denen im Tumor eine EGFR Expression nachgewiesen werden konnte (n=92). Dann ergab sich für die EGFR Expression ein statistischer Trend für die Wahrscheinlichkeit des rezidivfreien Überlebens über 5 Jahre (Abb. 9A): Patienten mit einer schwachen oder mittelgradigen EGFR Expression im Tumor wiesen eine rezidivfreie Überlebenswahrscheinlichkeit von 58% auf, Patienten mit einer starken EGFR Expression dagegen lediglich von 44% (Log Rank, p=0,091).

Lässt man die Tumore mit negativer EGFR Expression (n=29) unberücksichtigt und betrachtet alle Tumore mit positiver EGFR-Färbereaktion (n=92), zeigte sich eine statistisch signifikante Korrelation der EGFR Expression mit dem tumorspezifischen Überleben der Patienten (Abb. 9B): Patienten, die eine schwache oder mittlere EGFR Expression (n=47) im Tumor aufwiesen, zeigten eine tumorspezifische Überlebenswahrscheinlichkeit nach 5 Jahren von 60%, Patienten mit Tumoren mit starker EGFR Expression (n=45) dagegen nur von 41% (Log Rank, p=0,039).

Abb. 9: Kaplan-Meier-Schätzung der rezidivfreien (A) und tumorspezifischen Überlebenszeit (B) in Abhängigkeit von der immunhistochemisch nachgewiesenen EGFR Expression. Betrachtet wurden alle Tumore mit positiver EGFR Färbereaktion (n=92)



5.3. Expressionsanalyse von HB-EGF

Die immunhistochemische Detektion von HB-EGF zeigte für normales Urothel eine vorwiegend zytoplasmatische Anfärbung (Abb. 11). Im Gegensatz dazu wurde in dieser Arbeit - wie auch von Adam et al. - im Tumorgewebe neben einer zytoplasmatischen HB-EGF Expression (Abb. 10) auch eine nukleäre HB-EGF Expression (Abb. 13, 14) nachgewiesen. Daher wurde die HB-EGF Expression im Tumorgewebe für das Zytoplasma und den Zellkern zunächst getrennt betrachtet.

5.3.1. Zytoplasmatische Färbung

Bei 6 Tumoren waren 10-50% der Tumorzellen, bei 63 Tumoren 51-80% der Tumorzellen und bei 52 Tumoren >80% der Tumorzellen zytoplasmatisch angefärbt. Dichotomisiert man in 2 Gruppen ($\leq 80\%$ versus $>80\%$ positiver Tumorzellen), wiesen 69 Tumore eine in $\leq 80\%$ der Tumorzellen vorkommende zytoplasmatische HB-EGF Expression auf und wurden als schwach in der zytoplasmatischen HB-EGF Expression definiert. Dagegen zeigten 52 Tumore in $>80\%$ der Tumorzellen eine HB-EGF Expression im Zytoplasma; diese Expression wurde als starke zytoplasmatische HB-EGF Expression klassifiziert.

Abb. 10: Zytoplasmatische HB-EGF Expression bei urothelialen Harnblasenkarzinomen, 400x bzw. 600x Vergrößerung.

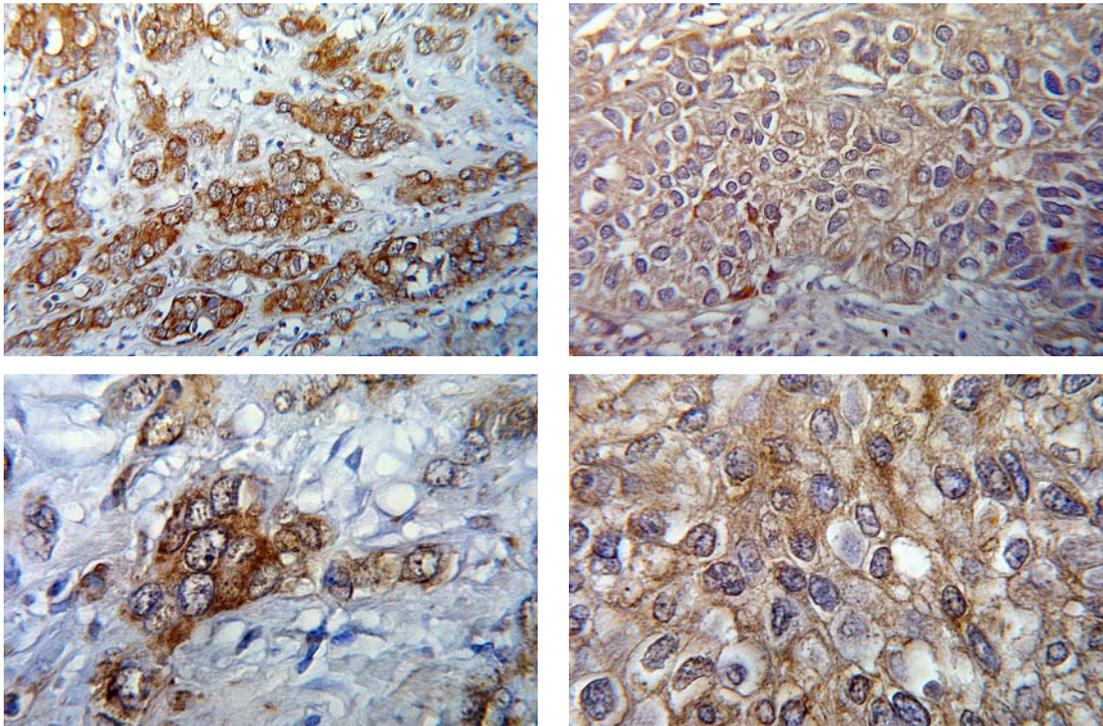
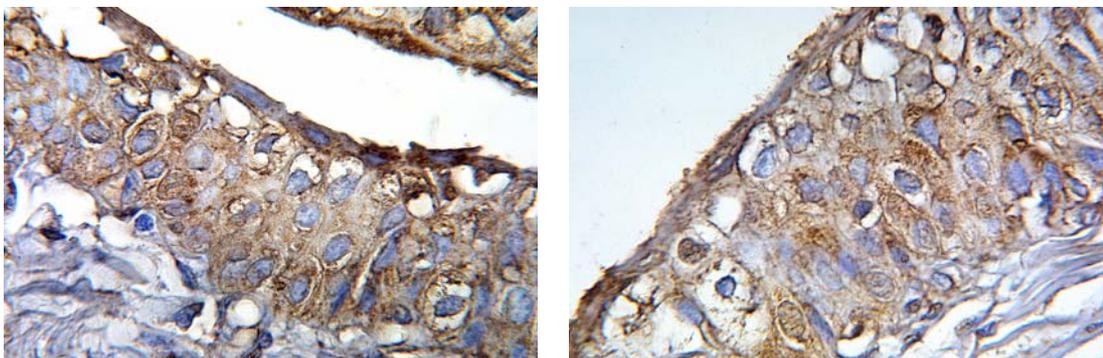


Abb.11: Zytoplasmatische HB-EGF Expression in normalem Urothel, 600x Vergrößerung.



5.3.1.1. Korrelation mit klinischen und histopathologischen Parametern

Es konnte keine Korrelation zwischen der zytoplasmatischen HB-EGF Expression und Geschlecht, Differenzierungsgrad oder Lymphknotenstatus festgestellt werden. Als statistisch signifikant erwies sich allerdings die Korrelation der prozentualen zytoplasmatischen HB-EGF Expression mit dem Alter der Patienten ($p=0,048$) und dem Tumorstadium ($p=0,023$) (Tab. 5). Dabei nahm mit zunehmendem Alter und Tumorstadium die zytoplasmatische HB-EGF Expression ab.

Tab. 5: Korrelation der zytoplasmatischen HB-EGF Expression mit klinischen und histopathologischen Parametern.

Parameter	Zytoplasmatische HB-EGF Expression			
	Anzahl Patienten	≤80% der Tumorzellen	>80% der Tumorzellen	χ ² -Test
Alter (Jahre)				
<60	19	6 (32)	13 (68)	P=0.048.
60-70	44	28 (64)	16 (36)	
>70	58	35 (60)	23 (40)	
Geschlecht				
Männlich	86	47 (55)	39 (45)	n.s.
Weiblich	35	22 (63)	13 (37)	
Stadium				
pTis, pT1	7	4 (57)	3 (43)	P=0.023*
pT2	41	16 (39)	25 (61)	
pT3	55	35 (64)	20 (36)	
pT4	18	14 (78)	4 (22)	
Lymphknotenstatus				
pN0	89	48 (54)	41 (46)	n.s.*
pN1	8	6 (75)	2 (25)	
pN2	24	15 (63)	9 (37)	
Differenzierungsgrad				
G2	25	12 (48)	13 (52)	n.s.
G3/G4	96	57 (59)	39 (41)	

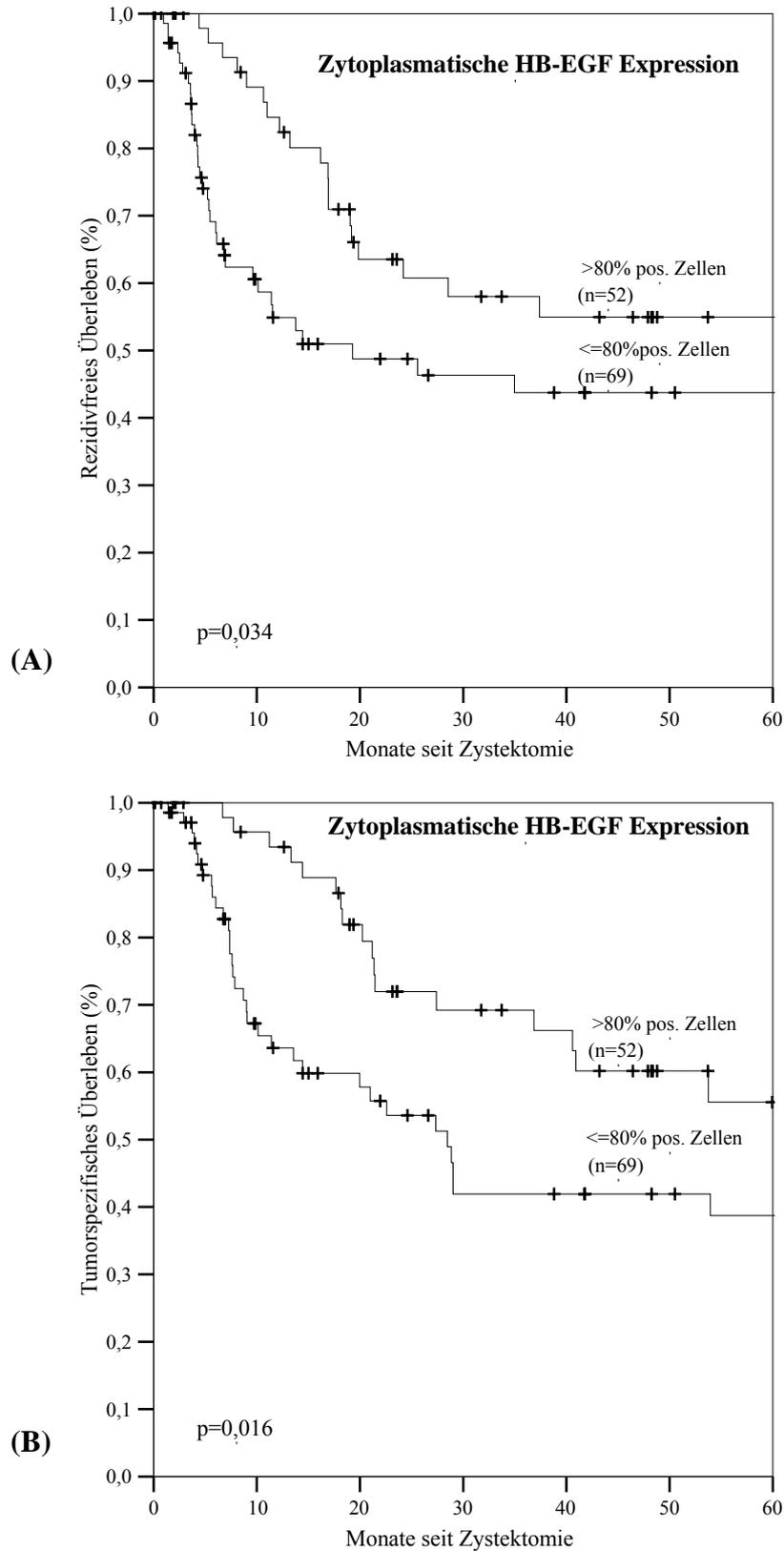
* Pearson's χ^2 -Test für organbegrenzte (\leq pT2) vs. organüberschreitende (\geq pT3) bzw. Lymphknoten-negative (pN0) vs. lymphogen metastasierte (pN1-2) Tumore.

5.3.1.2. Korrelation mit dem klinischen Verlauf

In der Kaplan-Meier Schätzung konnte eine statistisch signifikante Korrelation für die rezidivfreie Überlebenswahrscheinlichkeit der Patienten und der zytoplasmatischen HB-EGF Expression festgestellt werden ($p=0,034$): Patienten mit Tumoren mit starker zytoplasmatischer HB-EGF Expression ($>80\%$ der Zellen) wiesen eine rezidivfreie 5 Jahresüberlebensrate von 55% gegenüber 44% bei Patienten mit Tumoren mit schwacher zytoplasmatischer HB-EGF Expression ($\leq 80\%$) auf (Abb. 12A).

Statistisches Signifikanzniveau erreichte in der Kaplan-Meier Analyse auch die Korrelation der zytoplasmatischen HB-EGF Expression mit der tumorspezifischen Überlebenszeit ($p=0,016$): So zeigten Patienten mit starker zytoplasmatischer HB-EGF Expression eine 5 Jahresüberlebensrate von 56%. Dagegen wiesen die Patienten mit Tumoren mit schwacher zytoplasmatischer HB-EGF Expression nur eine tumorspezifische Überlebensrate über 5 Jahre von 39% auf (Abb. 12B).

Abb. 12: Kaplan-Meier-Schätzung der rezidivfreien (A) und tumorspezifischen Überlebenszeit (B) von 121 in kurativer Intention zystektomierten Patienten in Abhängigkeit von der immunhistochemisch nachgewiesenen zytoplasmatischen HB-EGF Expression



5.3.2. Nukleäre Färbung

Bei 43 Tumoren war keine nukleäre HB-EGF Expression, bei 27 Tumoren in <10% der Tumorzellen, bei 9 Tumoren in 10-20%, bei 11 Tumoren in 21-50%, bei 23 Tumoren in 51-80% und bei 8 Tumoren in >80% der Tumorzellen eine nukleäre HB-EGF Expression nachweisbar (Abb. 13, 14). Wie in der Arbeit von Adam et al. wurde eine Färbung von $\geq 20\%$ der Zellkerne im Tumor als starke und eine in <20% als schwache nukleäre HB-EGF Expression klassifiziert. Bei dieser Dichotomisierung wiesen 79 Tumore in <20% und 42 Tumore in $\geq 20\%$ der Zellen eine nukleäre HB-EGF Expression auf.

Abb. 13: Immunhistochemischer Nachweis einer nukleären HB-EGF Expression in urothelialen Harnblasenkarzinomen bei 250x Vergrößerung.

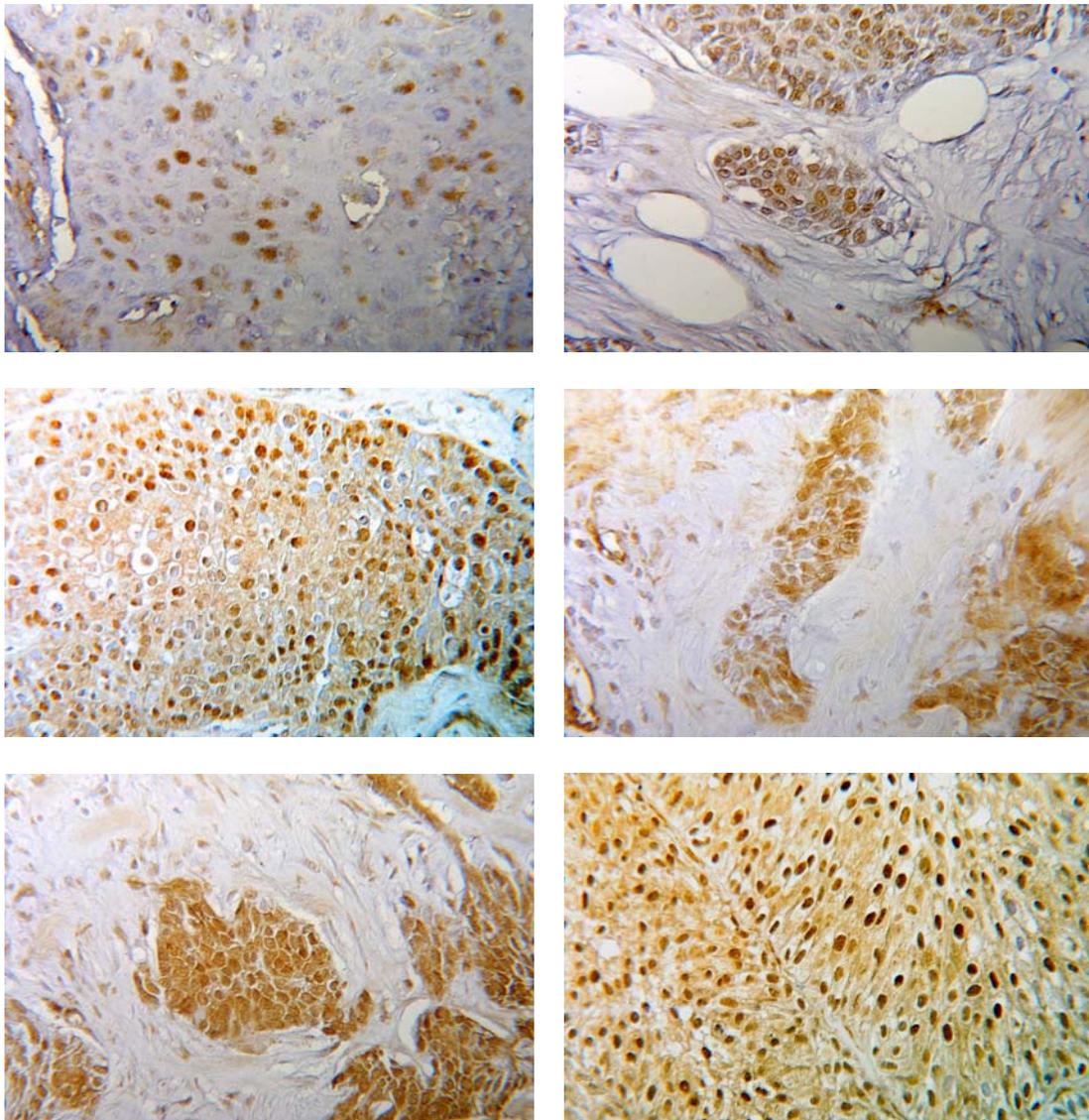
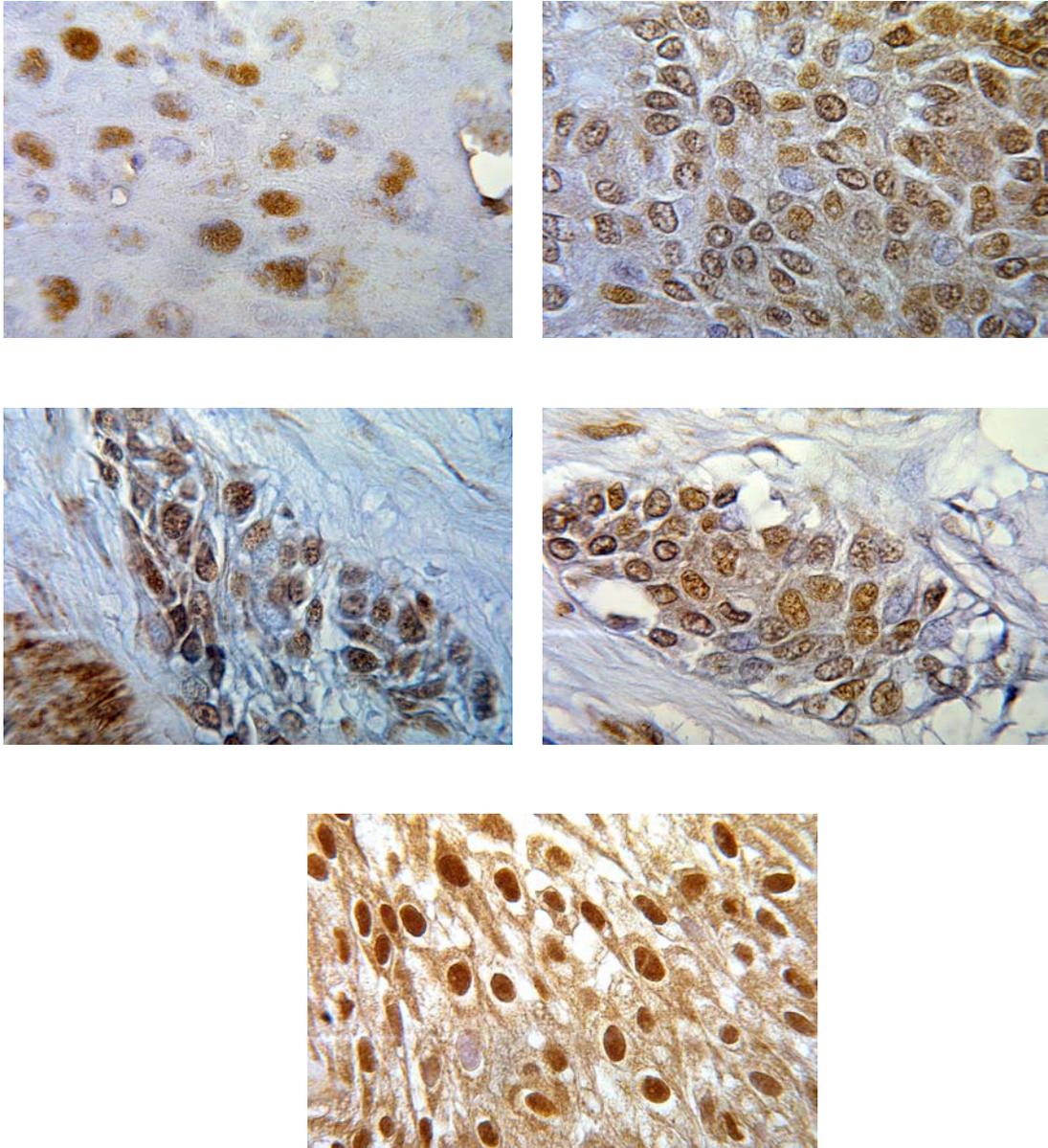


Abb. 14: Immunhistochemischer Nachweis einer nukleären HB-EGF Expression in urothelialen Harnblasenkarzinomen bei 400x Vergrößerung. Auffällig ist die zytoplasmatische Aufhellung bei gleichzeitig nukleärer Anfärbung (vgl. Kapitel 6.4.2.).



5.3.2.1. Korrelation mit klinischen und histopathologischen Parametern

Es konnte keine Korrelation zwischen der nukleären HB-EGF Expression und Alter, Geschlecht, Tumorstadium, Lymphknotenstatus oder Differenzierungsgrad festgestellt werden (Tab. 6).

Tab. 6: Korrelation der nukleären HB-EGF Expression mit klinischen und histopathologischen Parametern.

Parameter	Nukleäre HB-EGF Expression			
	Anzahl Patienten	<20% der Tumorzellen	≥20% der Tumorzellen	χ^2 -Test
Alter (Jahre)				
<60	19	15 (79)	4 (21)	
60-70	44	28 (64)	16 (36)	
>70	58	36 (62)	22 (38)	n.s.
Geschlecht				
Männlich	86	58 (67)	28 (33)	
Weiblich	35	21 (60)	14 (40)	n.s.
Stadium				
pTis, pT1	7	6 (86)	1 (14)	
pT2	41	28 (68)	13 (32)	
pT3	55	36 (65)	19 (35)	
pT4	18	9 (50)	9 (50)	n.s.*
Lymphknotenstatus				
pN0	89	57 (64)	32 (36)	
pN1	8	6 (75)	2 (25)	
pN2	24	16 (67)	8 (33)	n.s.*
Differenzierungsgrad				
G2	25	15 (60)	10 (40)	
G3/G4	96	64 (67)	32 (33)	n.s.

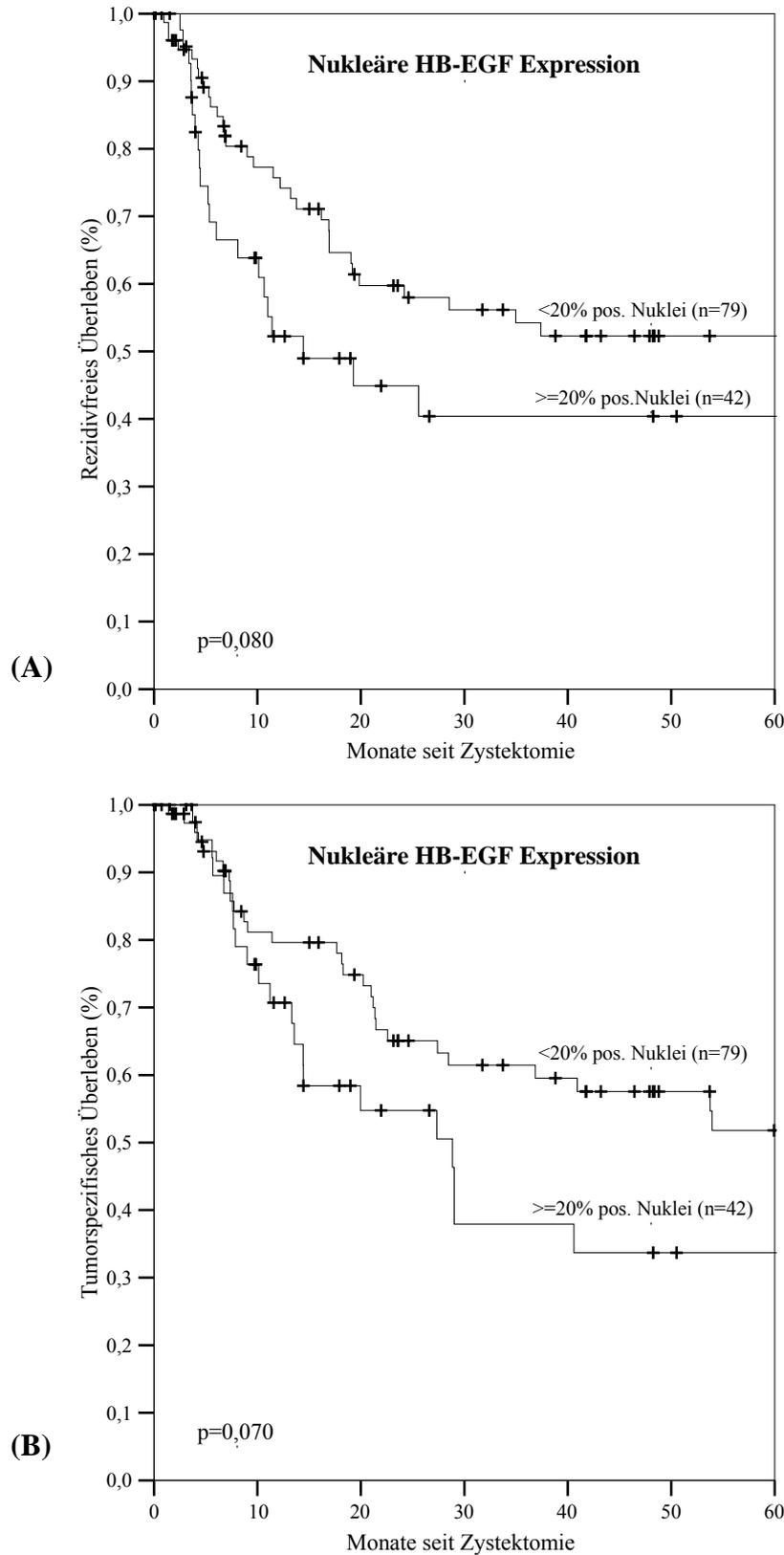
* Pearson's χ^2 -Test für organbegrenzte (\leq pT2) vs. organüberschreitende (\geq pT3) bzw. Lymphknoten-negative (pN0) vs. lymphogen metastasierte (pN1-2) Tumore.

5.3.2.2. Korrelation mit dem klinischen Verlauf

Die Kaplan-Meier Schätzung zeigte für die Patienten mit Tumoren mit einer schwachen nukleären HB-EGF Expression (<20% der Zellen) eine rezidivfreie Überlebenswahrscheinlichkeit über 5 Jahre von 52%. Demgegenüber wiesen Patienten mit einer starken nukleären HB-EGF Expression im Tumor ($\geq 20\%$ der Zellen) eine rezidivfreie 5 Jahresüberlebensrate von 40% auf (Abb. 15A). Diese Differenz erreichte einen statistischen Trend ($p=0,080$).

Ein statistischer Trend konnte ebenfalls für die tumorspezifische 5-Jahresüberlebenswahrscheinlichkeit und die nukleäre HB-EGF Expression nachgewiesen werden ($p=0,070$): Patienten mit Tumoren mit schwacher HB-EGF Expression im Zellkern zeigten eine tumorspezifische Überlebensrate über 5 Jahre von 52%, während Patienten mit starker nukleärer HB-EGF Expression im Tumor eine Überlebensrate von lediglich 34% aufwiesen (Abb. 15B).

Abb. 15: Kaplan-Meier-Schätzung der rezidivfreien (A) und tumorspezifischen Überlebenszeit (B) von 121 in kurativer Intention zystektomierten Patienten in Abhängigkeit von der immunhistochemisch nachgewiesenen nukleären HB-EGF Expression



5.3.3. Verknüpfung zytoplasmatischer und nukleärer HB-EGF Expression

Fasst man die prozentuale zytoplasmatische und nukleäre HB-EGF Expression der Tumore der 121 Patienten zusammen, konnten 3 Patientengruppen unterschieden werden: Die erste Gruppe bildeten 42 Patienten, die in den Tumorzellen eine starke zytoplasmatische ($>80\%$ der Zellen) und eine schwache nukleäre HB-EGF Expression ($<20\%$ der Zellen) aufwiesen; diese Gruppe wird im Folgenden als „zytoplasmatisch dominierend“ bezeichnet. Die zweite Gruppe stellten 32 Patienten dar, deren Tumore eine zytoplasmatisch schwache ($\leq 80\%$) und nukleär starke ($\geq 20\%$) HB-EGF Expression aufwiesen („nukleär dominierend“). In der dritten Gruppe waren die übrigen 47 Patienten zusammengefasst, deren Tumore gleichzeitig zytoplasmatisch ($>80\%$) und nukleär ($>20\%$) stark oder zytoplasmatisch ($<80\%$) und nukleär ($<20\%$) schwach HB-EGF exprimierten („Gemischte Gruppe“)

5.3.3.1. Korrelation mit klinischen und histopathologischen Parametern

Es konnte keine Korrelation zwischen der zusammengefassten zytoplasmatischen und nukleären HB-EGF Expression mit Alter, Geschlecht, Tumorstadium, Lymphknotenstatus oder Differenzierungsgrad beobachtet werden (Tab. 7).

Tab. 7: Korrelation der zusammengefassten nukleären und zytoplasmatischen HB-EGF Expression mit Patienten- und Tumorcharakteristika

Parameter	Zusammengefasste nukleäre und zytoplasmatische HB-EGF Expression				
	Anzahl Patienten	Gemischte Gruppe	Zytopl. dominierend	Nukleär dominierend	χ^2 - Test
Alter (Jahre)					
<60	19	4 (21)	12 (63)	3 (16)	
60-70	44	18 (40)	13 (30)	13 (30)	
>70	58	25 (43)	17 (29)	16 (28)	n.s.
Geschlecht					
Männlich	86	31 (36)	33 (38)	22 (26)	
Weiblich	35	16 (46)	9 (26)	10 (28)	n.s.
Stadium					
pTis, pT1	7	3 (43)	3 (43)	1 (14)	
pT2	41	13 (32)	20 (49)	8 (19)	
pT3	55	24 (44)	16 (29)	15 (27)	
pT4	18	7 (39)	3 (17)	8 (44)	n.s.*
Lymphknotenstatus					
pN0	89	34 (38)	32 (36)	23 (26)	
pN1	8	4 (50)	2 (25)	2 (25)	
pN2	24	9 (38)	8 (33)	7 (29)	n.s.*
Differenzierungsgrad					
G2	25	8 (32)	10 (40)	7 (28)	
G3/G4	96	39 (41)	32 (33)	25 (26)	n.s.

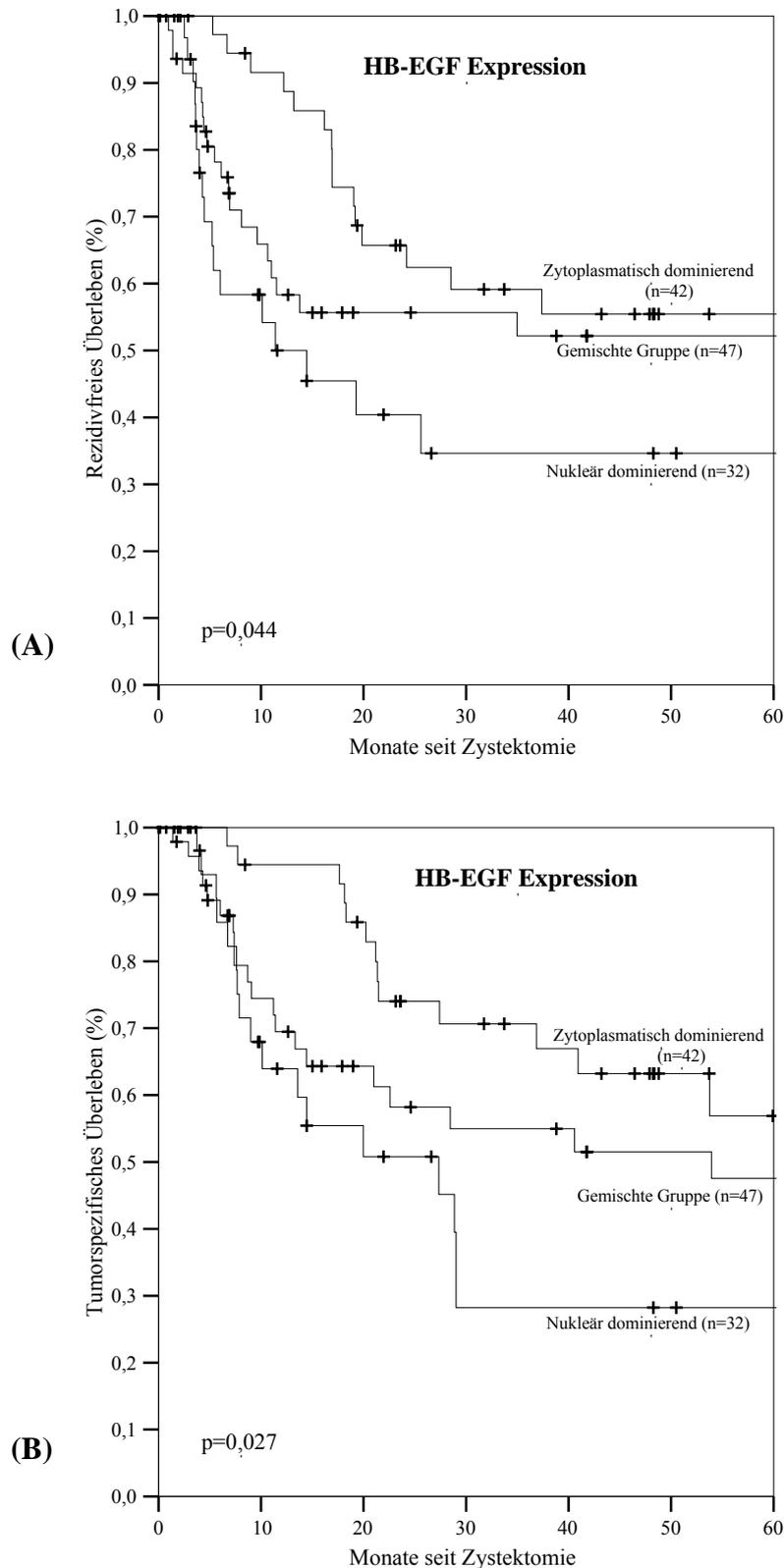
* Pearson's χ^2 -Test für organbegrenzte (\leq pT2) vs. organüberschreitende (\geq pT3) bzw. Lymphknoten-negative (pN0) vs. lymphogen metastasierte (pN1-2) Tumore.

5.3.3.2. Korrelation mit dem klinischen Verlauf

In der Kaplan-Meier Analyse konnte eine statistisch signifikante Korrelation der zusammengefassten zytoplasmatischen und nukleären HB-EGF Expression mit der rezidivfreien Überlebenswahrscheinlichkeit der Patienten über 5 Jahre ermittelt werden ($p=0,044$): Patienten mit zytoplasmatisch dominierender HB-EGF Expression im Tumor zeigten eine rezidivfreie 5 Jahresüberlebenswahrscheinlichkeit von 55%. Dagegen wiesen Patienten mit Tumoren mit vorwiegend nukleärer HB-EGF Expression eine rezidivfreie 5 Jahresüberlebenswahrscheinlichkeit von lediglich 35% auf (Abb. 16A).

Auch für die zusammengefasste zytoplasmatische und nukleäre HB-EGF Expression und die tumorspezifische Überlebenswahrscheinlichkeit konnte eine statistisch signifikante Korrelation nachgewiesen werden ($p=0,027$): Hier wiesen die Patienten mit zytoplasmatisch dominierender HB-EGF Expression im Tumor eine tumorspezifische 5 Jahresüberlebenswahrscheinlichkeit von 57% auf. Demgegenüber zeigten die Patienten mit einem Tumor mit vorwiegend nukleärer HB-EGF Expression eine tumorspezifische 5 Jahresüberlebenswahrscheinlichkeit von lediglich 28% (Abb. 16B).

Abb. 16: Kaplan-Meier-Schätzung der rezidivfreien (A) und tumorspezifischen Überlebenszeit (B) von 121 in kurativer Intention zystektomierten Patienten in Abhängigkeit der nukleären und zytoplasmatischen HB-EGF Expressionen.



5.4. Korrelation von EGFR und HB-EGF Expression

Es zeigte sich keine Korrelation zwischen der HB-EGF und EGFR Expression. Dabei wurde sowohl die Korrelation der zytoplasmatischen als auch der nukleären HB-EGF Expression mit der EGFR Färbeintensität untersucht.

5.4.1. Korrelation mit klinischen und histopathologischen Parametern

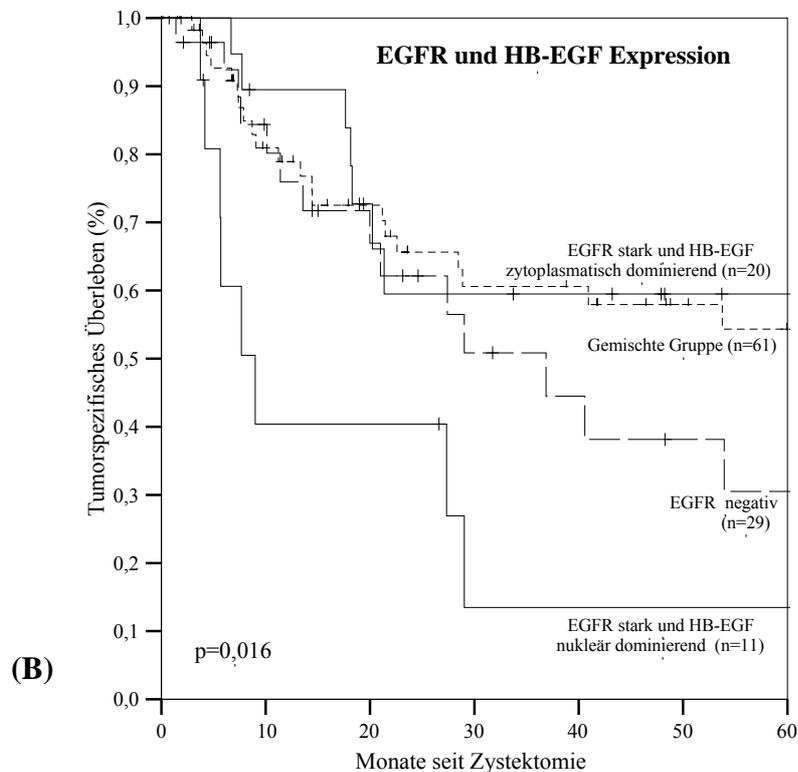
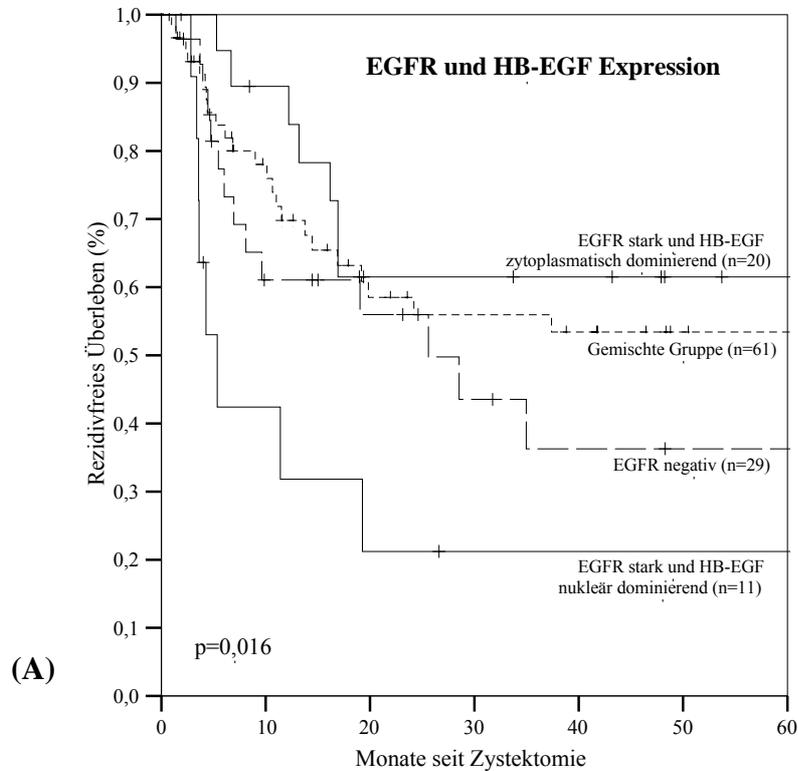
Es konnte keine Korrelation zwischen der HB-EGF und EGFR Expression in Abhängigkeit von Alter, Geschlecht, Tumorstadium, Lymphknotenstatus oder Differenzierungsgrad beobachtet werden.

5.4.2. Korrelation mit dem klinischen Verlauf

Innerhalb der Patientengruppe mit Tumoren mit starker EGFR Expression konnten zwei Untergruppen mit signifikant unterschiedlicher Prognose identifiziert werden (Abb. 17A, B): Die Patienten, deren Tumore eine starke zytoplasmatische (>80% der Zellen) bei gleichzeitig schwacher nukleärer HB-EGF Expression (<20% der Zellen) aufwiesen („zytoplasmatisch dominierend“), hatten in der Kaplan-Meier Analyse eine rezidivfreie 5-Jahresüberlebenswahrscheinlichkeit von 62% und eine tumorspezifische 5-Jahresüberlebenswahrscheinlichkeit von 59%. Dagegen zeigten die Patienten, deren Tumore eine schwache zytoplasmatische (\leq 80% der Zellen) und eine starke nukleäre HB-EGF Expression (\geq 20% der Zellen) zeigten („nukleär dominierend“), eine rezidivfreie 5 Jahresüberlebenswahrscheinlichkeit von nur 21% und eine tumorspezifische 5 Jahresüberlebenswahrscheinlichkeit von lediglich 13% auf. Die Unterschiede dieser beiden Untergruppen in der rezidivfreien und tumorspezifischen Überlebenswahrscheinlichkeit erreichten statistisches Signifikanzniveau ($p=0,016$ bzw. $p=0,016$).

Eine eher ungünstige Prognose wiesen die Patienten mit negativer EGFR Expression im Tumor auf, während die in der gemischten Gruppe zusammengefassten Patienten mit schwacher und mäßiger EGFR Expression eine deutlich bessere Prognose aufzeigten.

Abb. 17: Kaplan-Meier-Schätzung der rezidivfreien (A) und tumorspezifischen Überlebenszeit (B) von 121 in kurativer Intention zystektomierten Patienten in Abhängigkeit von der EGFR Expression und der zusammengefassten nukleären/zytoplasmatischen HB-EGF Expression



6. Diskussion

Klinische und histopathologische Parameter stellen gegenwärtig die wichtigste Entscheidungsgrundlage für die Indikation und Art der Therapie beim invasiven Harnblasenkarzinom dar. Ihre Aussagefähigkeit in Bezug auf den weiteren klinischen Verlauf der Erkrankung ist jedoch eingeschränkt. Beispielsweise vermögen sie nur unzureichend Auskunft darüber zu geben, bei welchen invasiven Harnblasenkarzinomen sich nach Zystektomie eine systemische Progression der Erkrankung im Sinne des Auftretens eines Lokalrezidivs oder einer Fernmetastasierung entwickelt.

Eine adjuvante Polychemotherapie kann die rezidivfreie Überlebenszeit verlängern, stellt jedoch für den Patienten eine erhebliche Belastung dar [Skinner et al. 1991; Freiha et al. 1996; Stöckle et al. 1996]. Für die Identifizierung der Patienten, die in hohem Maße einem Rezidivrisiko ausgesetzt sind und somit von einer adjuvanten Polychemotherapie profitieren könnten, sind zusätzliche prognostische Parameter notwendig.

Die zunehmende Kenntnis von molekularen Veränderungen in Tumoren, die prognostische „Marker“ darstellen, wird in den kommenden Jahren voraussichtlich die Vorhersage des klinischen Verlaufs und damit die Therapie der Patienten verbessern können. Dabei wird von der Annahme ausgegangen, dass genetische Veränderungen in den Tumorzellen die biologischen Eigenschaften des Tumors und damit auch den klinischen Verlauf der Erkrankung ganz wesentlich mitbestimmen. Desweiteren eröffnet die u.a. durch monoklonale Antikörper vermittelte gezielte Inhibition einzelner Proteine, die Bestandteile von verstärkt aktivierten Signalkaskaden in malignen Zellen sind, zusätzliche Therapieoptionen bei malignen Erkrankungen.

6.1. Molekulare „Marker“ als prognostische Faktoren

In der letzten Zeit wurden zahlreiche molekulare „Marker“ im Harnblasenkarzinom auf ihre prognostische Relevanz hin analysiert. Damit ein molekularer Marker als prognostischer Faktor geeignet ist, muss er zahlreiche Voraussetzungen erfüllen. Er muss in der univariaten Analyse eng mit dem klinischen Verlauf der Erkrankung korrelieren. Darüber hinaus sollte der Marker zusätzliche Informationen zu den etablierten „klassischen“ klinischen und histopathologischen Prognosefaktoren liefern. Dafür muss er in der multivariaten Analyse unabhängig von den übrigen prognostischen Parametern sein. Darüber hinaus müsste ein Marker für den Einsatz im klinischen Alltag mit geringem technischen Aufwand analysierbar, preiswert und reproduzierbar sein [Kausch und Böhle 2002].

Für die Untersuchung von Markern auf ihren prognostischen Wert hin werden v.a. retrospektive Analysen, häufig unter Verwendung immunhistochemischer Techniken, eingesetzt. Damit können Expressionsveränderungen auf Proteinebene nachgewiesen werden.

Bei diesem Nachweisverfahren werden Grenzwerte, so genannte „Cut-Off-Werte“ definiert, bei denen eine signifikante Korrelation mit dem beobachteten Endpunkt, beispielsweise der rezidivfreien Überlebenszeit nachzuweisen ist. Um die dadurch gewonnene prognostische Relevanz und die definierten Cut-Off-Werte zu validieren, ist im Anschluss eine Bestätigung an einem unabhängigen Patientenkollektiv bzw. durch eine prospektive Studie notwendig.

Obwohl große Fortschritte bei der Untersuchung von neuen potentiellen Prognosefaktoren gemacht wurden, konnte bisher für keinen der beim invasiven Harnblasenkarzinom untersuchten molekularen Marker eine Überlegenheit gegenüber den „klassischen“ klinischen und histopathologischen Prognosefaktoren gesichert werden. Aufgrund von vielversprechenden Ergebnissen in retrospektiven Analysen werden momentan größere prospektive Studien zur Bestätigung der prognostischen Relevanz von MIB-1, p53 und EGFR durchgeführt [Liukkonen et al. 1999]. Beispielsweise führten die Ergebnisse einer retrospektiven Untersuchung von 243 zystektomierten Patienten, bei der die p53 Expression für die Gruppe der organbegrenzten Tumore einen unabhängigen prognostischen Parameter für die Tumorprogression und das Überleben darstellte [Esrig et al. 1994], zur Initiierung einer prospektiven Folgestudie. In dieser Multicenterstudie werden Patienten mit organbegrenztem Blasen-tumor und p53-Überexpression, aufgrund

des erwarteten hohen Progressionsrisikos, entweder in einen Behandlungsarm mit adjuvanter Chemotherapie oder einen Beobachtungsarm randomisiert. In der Urologie stellt diese Untersuchung die erste „molekular getriebene“ Studie dar.

6.2. Zusammensetzung des Patientenkollektivs

Zur Untersuchung von molekularen „Markern“ auf ihre allgemeingültige prognostische Bedeutung hin, ist als Untersuchungsgrundlage ein klinisch homogenes repräsentatives Patientenkollektiv notwendig. Von den untersuchten Patienten muss, neben den klinischen und histopathologischen Daten, auch der weitere onkologische Verlauf erfasst sein, um eine Korrelation mit der Prognose, also dem klinischen Verlauf, zu erlauben.

Von der hier retrospektiv untersuchten Serie konsekutiver Patienten waren - zusätzlich zu den histopathologischen Parametern - Daten über den klinischen Verlauf nach Zystektomie über einen Nachbeobachtungszeitraum von 51 Monaten für die noch lebenden Patienten verfügbar. Da mehr als 90% der Tumorrezidive innerhalb eines Zeitraumes von 3 Jahren nach Zystektomie auftreten, ist durch den hier vorhandenen Nachbeobachtungszeitraum eine zuverlässige Einschätzung des Krankheitsverlaufs möglich [Madersbacher et al. 2003].

5 Jahre nach Zystektomie leben zwischen 33 und 60% der Patienten anderer untersuchten Kollektive noch [Dalbagni et al. 2001]. Die überwiegende Mehrzahl der Todesfälle ist dabei tumorbedingt.

Eine signifikante Korrelation zwischen den klassischen Prognosefaktoren wie Tumorstadium, Lymphknotenstatus, Differenzierungsgrad und Resektionsrand mit der rezidivfreien bzw. tumorspezifischen Überlebenszeit wurde auch in der vorliegenden Arbeit festgestellt. Daher kann das eigene Patientenkollektiv als repräsentativ betrachtet werden. Die Wahrscheinlichkeit, innerhalb von 5 Jahren tumorbedingt an einem pTis, pT1 bzw. pT2a,b Tumor zu versterben betrug in diesem Patientenkollektiv 30% und erhöhte sich bei pT3 bzw. pT4 Tumor auf 72%. Die Wahrscheinlichkeit innerhalb von 5 Jahren tumorbedingt an einem lymphogen metastasierten Tumor zu versterben, betrug sogar 100%.

Nach der Kaplan-Meier Schätzung waren nach 5 Jahren noch 48% der untersuchten Patienten rezidivfrei, während 54% der Patienten tumorbedingt verstorben waren. Die ermittelte 5 Jahres Gesamtüberlebensrate betrug 33%.

Vergleicht man das hiesige Patientenkollektiv mit anderen Kollektiven von Patienten, die wegen eines Harnblasenkarzinoms zystektomiert worden sind, so ist der Anteil lokal

fortgeschrittener Tumore innerhalb des hier untersuchten Patientenkollektives hoch. Lediglich 40% der Tumore sind auf die Harnblase begrenzt. Demgegenüber betrug der Anteil in der derzeit umfangreichsten Studie, in der die Daten von 1054 zystektomierten Patienten ausgewertet wurden, 56% [Stein et al. 2001]. Der Anteil oberflächlicher T1 Tumore lag mit 18% wesentlich höher als der in der eigenen Untersuchung vorhandene Anteil von 6%. Aufgrund der übereinstimmend nachgewiesenen Korrelation zwischen Tumorstadium und Prognose erklärt sich dadurch das schlechte Langzeitbehandlungsergebnis im eigenen Patientenkollektiv. Dies zeigt, dass in anderen Kliniken die Indikation zur Zystektomie beim Harnblasenkarzinom möglicherweise früher (also nicht selten schon beim T1 Tumor) gestellt wird.

6.3. Expression von EGFR und Prognose

Als membranständiger Rezeptor für Wachstumsfaktoren vermittelt EGFR die Signaltransduktion über die Zellmembran hinweg zu intrazellulären Signalkaskaden. Eine pathologisch erhöhte Expression von EGFR, wie sie vermehrt in malignen Zellen vorkommt, führt zu verstärkter nukleärer Transkription von Proteinen verschiedener Signalkaskaden [Colquhoun und Mellon 2002]. In der Folge wird der koordinierte Ablauf des Zellwachstums gestört und die Zellproliferation stimuliert.

Für viele epitheliale Tumore ist eine Überexpression von EGFR nachgewiesen, darunter für Karzinome der Harnblase, des Magens, des Kolons, des Pankreas, des Ovars und der Mamma [Nicholson et al. 2001]. Eine Überexpression im Harnblasenkarzinom wurde in mehreren Studien beschrieben [Neal et al. 1985; Chow et al. 1997]. Mehrfach konnte dabei eine Korrelation der EGFR Expression mit den histopathologischen und klinischen Parametern sowie der Überlebenszeit der Patienten nachgewiesen werden [Neal et al. 1990; Nguyen et al. 1994; Mellon et al. 1995; Chow et al. 1997; Nicholson et al. 2001].

Die eigenen Ergebnisse der immunhistochemischen Expressionsuntersuchung beim invasiven Harnblasenkarzinom zeigen eine signifikante Korrelation der EGFR Expression mit Tumorstadium ($p=0,009$) und Differenzierungsgrad ($n=0,046$). Bei der Korrelation mit dem klinischen Verlauf weisen interessanterweise die Patienten mit negativer EGFR Expression im Vergleich zu den Patienten mit schwacher, mäßiger oder starker EGFR Expression im Tumor die niedrigsten Überlebenswahrscheinlichkeiten auf; jedoch erreichen diese Ergebnisse kein Signifikanzniveau. Lässt man die Patienten mit Tumoren mit negativer EGFR Expression unberücksichtigt, zeigt sich eine statistisch signifikante Korrelation der EGFR Expression mit dem tumorspezifischen Überleben: Von den Patienten, deren Tumor eine schwache oder mäßige EGFR Expression im Tumor zeigte, verstarben tumorbedingt 40% nach 5 Jahren, während es bei den Patienten mit starker EGFR Expression im Tumor 59% waren ($p=0,039$).

Die Arbeitsgruppe um Neal konnte in einer prospektiven Studie zeigen, dass die in den Harnblasenkarzinomen immunhistochemisch nachgewiesene EGFR Expression ebenso mit dem Tumorstadium und dem tumorspezifischen Überleben korrelierte [Neal et al. 1990]. Die nähere Betrachtung dieser Studie zeigt allerdings, dass sich das untersuchte Patientenkollektiv der insgesamt 101 Patienten aus 52 Patienten mit oberflächlichen Ta/T1 Tumoren und 49 mit muskelinvasiven Tumoren zusammensetzte, deren Therapie ebenso inhomogen war und transurethrale Resektionen ($n=16$), Chemotherapien ($n=15$), Radiatio

(n=12) und Zystektomien (n=6) beinhaltete. Betrachtet man isoliert die Patienten mit muskelinvasiven Tumoren, konnte keine signifikante Korrelation der EGFR Expression mit dem tumorspezifischen Überleben mehr festgestellt werden. Als EGFR positiv wurden in der Arbeit von Neal et al. alle Tumore definiert, deren Anfärbeintensität identisch mit der von mitangefärbtem Plazentagewebe war. Eine schwächere bzw. keine Anfärbung des Tumors wurde als EGFR negativ klassifiziert.

In der vorliegenden Untersuchung diente die parallele Färbung basaler Mukosazellen eines normalen Harnleiters auf jedem Objektträger der standardisierten Bestimmung der Färbeintensität (Abb. 8). In den publizierten Untersuchungen liegen zwar unterschiedliche Angaben über die Anfärbeintensität von normalem Mukosagewebe vor (die Angaben erstrecken sich von schwach bis stark [Messing et al. 1987]), doch führten Mellon/Neal et al. die Intensitätsunterschiede in der Anfärbung normaler Urothelmukosa auf rein methodische Differenzen im Detektionssystem zurück [Mellon et al. 1995]. Die in dieser Studie automatisiert durchgeführte immunhistochemische Färbung zeigte in den basalen Mukosazellen eine durchweg homogene moderate Anfärbeintensität der Zellmembran. Somit erlaubte der Intensitätsvergleich mit den Tumorzellen in dieser Arbeit eine weitgehend objektive Beurteilung der Anfärbung.

Eine weitere prospektive immunhistochemische Studie der Arbeitsgruppe um Mellon/Neal konnte 1995 die EGFR Expression im Harnblasenkarzinom als unabhängigen prognostischen Faktor für die Überlebenszeit in der multivariaten Analyse bestätigen [Mellon et al. 1995]. Analysiert wurden in dieser Studie Tumore von insgesamt 212 Patienten, wobei auch hier neben muskelinvasiven (n=99) oberflächliche Ta/T1 Tumore (n=113) berücksichtigt wurden. Die insgesamt 212 Patienten setzten sich aus zwei Patientenkollektiven zusammen, von denen die eine Gruppe (n=101) von Neal 1990 schon publiziert worden war [Neal et al. 1990]. Die Therapie der Patienten mit muskelinvasiven Tumoren (n=99) beinhaltete neben der alleinigen transurethralen Resektion (n=28) auch Chemotherapie (n=28), Bestrahlung (n=30) und Zystektomie (n=14). Bei der Evaluation der immunhistochemischen Anfärbung wurden andere Grenzwerte („Cut-Off-Werte“) als bei der Studie von Neal et al. 1990 festgelegt: Alle subjektiv in der Färbeintensität (negativ, sehr schwach, schwach, mäßig und stark) als mäßig oder stark gewerteten Tumore wurden als EGFR positiv klassifiziert; die übrigen als EGFR negativ. Bei der alleinigen Betrachtung der Patienten mit muskelinvasiven Tumoren (n=99), konnte lediglich ein statistischer Trend ($p=0,06$) für die Korrelation der EGFR Expression mit der Gesamtüberlebenszeit festgestellt werden.

Eine weitere retrospektive immunhistochemische Untersuchung muskelinvasiver Harnblasenkarzinome (n=85) von Nguyen et al. zeigte für die EGFR Expression eine signifikante Korrelation mit dem Tumorstadium und der Überlebenszeit [Nguyen et al. 1994]. In der multivariaten Analyse stellte sich die EGFR Expression jedoch als nicht unabhängig vom Tumorstadium heraus.

Ein Blick auf die verschiedenen untersuchten Patientenkollektive zeigt, dass dort z.T. Patienten mit oberflächlichen und muskelinvasiven Tumoren zusammen betrachtet wurden. Oberflächliche Tumore zeichnen sich jedoch durch ein anderes klinisches Verhalten als invasive Tumore aus; ein relativ geringes Progressionsrisiko bei hoher Rezidivneigung bedingt eine deutlich bessere Prognose als infiltratives Wachstum. Ebenso unterscheiden sich die Therapieformen in den unterschiedlichen Studien, so dass z.T. kein klinisch homogenes Patientenkollektiv untersucht wurde.

Weitere Ursachen für die Unterschiede in der gefundenen prognostischen Bedeutung sind sicherlich methodisch bedingt: Differenzen im immunhistochemischen Nachweissystem, beispielsweise bei der Verwendung verschiedener Antikörper oder Reagenzien oder unterschiedliche Konzentrationen und Inkubationszeiten, führen zu unterschiedlichen Färbeergebnissen. Auch wurden bei der Evaluation der Immunhistochemie in den verschiedenen Untersuchungen (teilweise von der gleichen Arbeitsgruppe) unterschiedliche Grenzwerte für die Expressionen festgelegt.

6.4. Prognostische Bedeutung von HB-EGF

In vivo und *in vitro* Untersuchungen konnten zeigen, dass HB-EGF das Wachstum und die Differenzierung vieler Zellen stimuliert, u.a. auch Urothelzellen, Fibroblasten und Muskelzellen [Dluz et al. 1993; Blotnick et al. 1994]. HB-EGF erfüllt dadurch physiologische Funktionen, beispielsweise bei der Skelettmuskelentwicklung, Herzmuskeldifferenzierung und der Wundheilung. Es wird jedoch auch vermutet, dass ein pathologisch verändertes HB-EGF Expressionsprofil in malignen Zellen eine verstärkte Proliferation bedingt [Raab und Klagsbrun 1997]. Dabei scheinen das Ausmaß der HB-EGF Expression, sowie die Kontrolle über die Spaltung des membranösen proHB-EGF eine Schlüsselrolle einzunehmen. Bei neoplastischer Transformation einer Zelle wird u.a. eine erhöhte Expression und eine durch Störungen im Regulationssystem erhöhte Rate der proteolytischen Spaltung von proHB-EGF vermutet [Wallasch et al. 2002]. Die Kontrolle über die Spaltung wird über ein komplex reguliertes System vermittelt, in das mehrere intrazelluläre Signalwege involviert sind und das nur ansatzweise aufgeklärt ist [Prenzel et al. 1999; Umata 2004].

6.4.1. Expression von HB-EGF

Untersuchungen der Expression zeigen eine Überexpression des Wachstumsfaktors HB-EGF in verschiedenen Tumoren, u.a. des Pankreas, der Leber, des Kolons, der Harnblase, der Mamma, des Ösophagus, des Ovars und des Magens im Vergleich zum jeweiligen „Normalgewebe“ [Murayama et al. 1995; Sato et al. 1996; Raab und Klagsbrun 1997; Ito et al. 2001a; Ito et al. 2001b; Fishman et al. 2002; Miyamoto et al. 2004]. Dabei zeigte die HB-EGF Expression zumeist eine inverse Korrelation mit den klinisch-pathologischen Parametern bzw. dem klinischen Verlauf der Erkrankung.

Bisher wurde die prognostische Bedeutung der HB-EGF Expression im Harnblasenkarzinom in zwei Studien untersucht [Thogersen et al. 2001; Adam et al. 2003]. Die eigene Untersuchung stellt die bisher umfangreichste Studie zur prognostischen Bedeutung von HB-EGF dar. Außerdem wurde in der vorliegenden Arbeit erstmals ein konsekutives, klinisch homogenes Kollektiv von Patienten mit invasivem Harnblasenkarzinom analysiert.

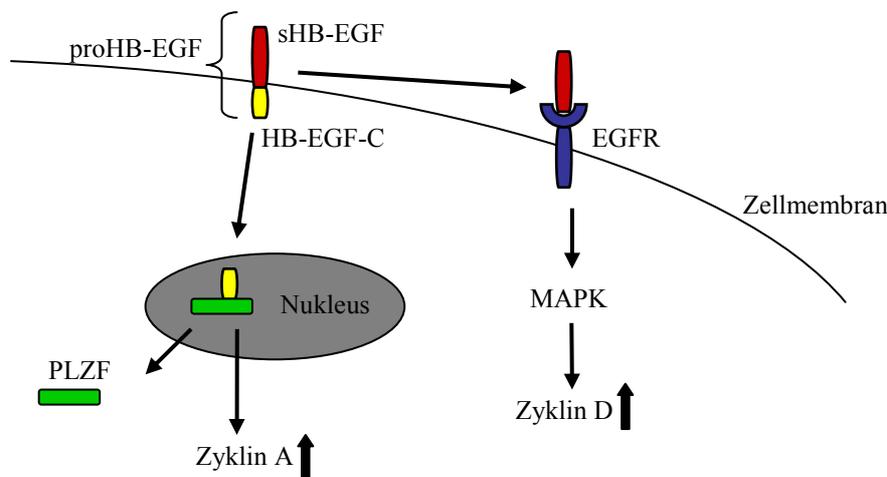
Die dänische Forschungsgruppe um Orntoff untersuchte mittels RT-PCR die mRNA-Konzentration von HB-EGF in 19 Ta-Tumoren, 16 T1 Tumoren und 38 muskelinvasiven (T2-T4) Tumoren [Thogersen et al. 2001]. Dabei konnte in den muskelinvasiven Tumoren,

verglichen mit den oberflächlichen Ta-Tumoren, eine signifikant erhöhte mRNA Expression von HB-EGF festgestellt werden ($p=0,001$). Die Kaplan-Meier-Schätzung zeigte eine signifikant erniedrigte Überlebenswahrscheinlichkeit für die Patienten mit hoher HB-EGF mRNA Konzentration im Tumor, verglichen mit den Patienten mit mäßiger und geringer HB-EGF Expression ($p=0,02$).

Adam et al. [2003] untersuchten mittels Immunhistochemie die HB-EGF Expression auf ihren prognostischen Wert in Tumoren von 33 Patienten, von denen 21 oberflächliche (Ta/T1) und 12 muskelinvasive (T2-T4) Tumore waren. Dabei wurde erstmals eine nukleäre Expression von HB-EGF beobachtet. Nanba et al. [2003] konnten später nachweisen, dass das im Zellkern gefundene HB-EGF das C-terminale Spaltprodukt aus proHB-EGF darstellt und nannten es HB-EGF-C. Neben HB-EGF-C entsteht aus proHB-EGF als zweites Spaltprodukt sHB-EGF, das parakrin sezerniert wird (Abb. 18) [Nanba et al. 2003].

Die Bindung des parakrin sezernierten sHB-EGF an EGFR führt zu dessen Aktivierung; in der Folge kommt es über den intrazellulären Ras/Raf-MAP-Kinasen-Signalweg zur erhöhten Transkription von Cyclin D und daraus resultiert eine Progression des Zellzyklus in der G1-Phase [Hackel et al. 1999; Prober und Edgar 2001]. HB-EGF-C transloziert intrazellulär nach Abspaltung, vermutlich via Golgi-Apparat und Endoplasmatisches Retikulum, in den Zellkern, um dort an das Promyelocytic Leukaemia Zinc Finger Protein (PLZF) zu binden [Toki et al 2004]. Die Interaktion von HB-EGF-C und PLZF führt zu einer Translokation von PLZF aus dem Zellkern, wodurch die supprimierende Wirkung des PLZF auf die Expression von Cyclin A aufgehoben und der Eintritt der Zelle in die S-Phase vermittelt wird [Nanba et al. 2003] (Abb. 18).

Abb. 18: Aus der proteolytischen Spaltung von proHB-EGF resultieren sHB-EGF und HB-EGF-C, die ihrerseits über zwei verschiedene Signalwege Einfluss auf die Zellzyklusregulation und damit auf die Proliferation der Zelle nehmen.



Aufgrund der Tatsache, dass HB-EGF in seinen drei Isoformen (proHB-EGF, sHB-EGF und HB-EGF-C) vorliegen kann, ist der Vergleich verschiedener Expressionsuntersuchungen schwierig. Dies gilt besonders dann, wenn nicht gesondert dargestellt ist, welche Isoform untersucht wurde.

Der von Adam et al. eingesetzte polyklonale Antikörper ist gegen das Epitop GYDVENEEKVKLGMTSH des proHB-EGF gerichtet; dieses Epitop ist Bestandteil der C-terminalen Domäne des proHB-EGF. HB-EGF-C, das als C-terminales Spaltprodukt aus proHB-EGF entsteht, beinhaltet dieses Epitop auch und wird somit ebenfalls von dem Antikörper gebunden. Eine zytoplasmatische Anfärbung der Zelle spricht demnach für eine proHB-EGF Expression, während die nukleäre Anfärbung eindeutig eine HB-EGF-C Expression anzeigt.

Das nukleäre HB-EGF-C zeigte in der initialen Untersuchung von Adam et al. eine inverse Korrelation mit der Prognose: Die Kaplan-Meier-Schätzung wies für die Patienten mit einer HB-EGF-C Expression in >20% der Tumorzellkerne eine 5-Jahres-Gesamtüberlebensrate von 48% versus 95% für die Patienten mit einer HB-EGF-C Expression in <20% der Tumorzellkerne auf ($p=0,0005$). Auch die rezidivfreie 5-Jahres-Überlebenswahrscheinlichkeit zeigte mit 42% für die Patienten mit >20% positiven Zellkernen im Tumor einen signifikant erniedrigten Wert verglichen mit 93% für die Patienten mit <20% positiven Zellkernen im Tumor ($p=0,002$). Die multivariate Analyse konnte neben dem Tumorstadium die nukleäre HB-EGF-C Expression als unabhängigen Prognosefaktor für tumorbedingtes Versterben bestätigen ($p=0,01$). Auch korrelierte die

nukleäre HB-EGF-C Expression signifikant mit dem Differenzierungsgrad ($p=0,001$) und Tumorstadium ($p=0,001$).

Aufgrund der niedrigen Anzahl von Patienten ($n=33$) und der nicht dargestellten, aber offensichtlich nicht einheitlichen Therapie bei überwiegend oberflächlichen und wenigen invasiven Tumoren, ist die allgemeine Aussagefähigkeit dieser Studie jedoch begrenzt, auch wenn sehr hohe Signifikanzen berichtet werden. Bei der vorliegenden immunhistochemischen Arbeit konnte derselbe HB-EGF-Antikörper wie in der o.g. Studie verwendet werden, da er freundlicherweise von R.M. Adam zur Verfügung gestellt wurde. Dabei wurde auch hier neben der zytoplasmatischen eine nukleäre HB-EGF Expression beobachtet (Abb. 10, 13, 14).

Die Kaplan-Meier-Schätzung in dieser Untersuchung zeigte entsprechend einen statistischen Trend für die Korrelation der nukleären HB-EGF-C Expression mit der tumorspezifischen Überlebenswahrscheinlichkeit ($p=0,07$) und der rezidivfreien Überlebenswahrscheinlichkeit ($p=0,08$). Eine starke nukleäre HB-EGF-C Expression war mit einer rezidivfreien bzw. tumorspezifischen 5-Jahres-Überlebenswahrscheinlichkeit von 40% bzw. 34% vergesellschaftet. Im Gegensatz dazu fand sich bei einer schwachen HB-EGF-C Expression ($<20\%$) eine rezidivfreie bzw. tumorspezifische 5-Jahres-Überlebenswahrscheinlichkeit von jeweils 52%. Die bei Adam et al. wesentlich höheren Überlebenswahrscheinlichkeiten von 95% bzw. 93% bei $<20\%$ iger HB-EGF-C Expression sind wohl dadurch zu begründen, dass der Anteil oberflächlicher Tumore (Ta/T1) dort 64% betrug. Im Gegensatz dazu liegt der Anteil oberflächlicher T1/Tis Tumore in der vorliegenden Arbeit bei 6%.

6.4.2. Bedeutung der proteolytischen Spaltung von proHB-EGF

Sowohl bei Adam et al., als auch in dieser Untersuchung konnte beobachtet werden, dass eine Kernanfärbung zumeist mit einer gleichzeitig verminderten zytoplasmatischen Anfärbung einhergeht (Abb. 14). Diese Beobachtung lässt vermuten, dass eine vermehrte Spaltung von proHB-EGF zu einer Verminderung von proHB-EGF bei gleichzeitig erhöhter Bildung von nukleärem HB-EGF-C und möglicherweise auch parakrin sezerniertem sHB-EGF führt. In einer anderen Studie konnte gezeigt werden, dass die proHB-EGF-Spaltung in schnell proliferierenden Zellen, darunter auch in Tumorzellen, gehäuft und ohne Stimulus stattfindet [Toki et al. 2004]. Weitere Untersuchungen erhärten die Vermutung, dass die proteolytische Spaltungsaktivität in malignen Zellen erhöht ist und dementsprechend HB-EGF-C und sHB-EGF vermehrt gebildet werden [Miyamoto et al.

2004]. Eine vermehrte Spaltung von proHB-EGF mit konsekutiv erhöhter Bildung von sHB-EGF und somit erhöhter EGFR Aktivierung verstärkt die Migrationsfähigkeit von Prostatakarzinomzellen *in vivo* [Madarame et al. 2003]. Wallasch et al. [2002] wiesen nach, dass das Bakterium *Helicobacter pylori* durch vermehrte Spaltung von proHB-EGF mit erhöhter Freisetzung von sHB-EGF EGFR in Magenepithelzellen aktiviert und dadurch die neoplastische Transformation der Zellen gefördert wird. *In vivo* Untersuchungen im Tierversuchsmodell mit HB-EGF zeigen, dass die unkontrolliert erhöhte Freisetzung von sHB-EGF aus proHB-EGF bei Mäusen zu starker Hyperplasie der Haut und anderer Organe führt und die Tiere zumeist daran versterben [Yamazaki et al. 2003].

Die biologischen Effekte einer erhöhten Expression von sHB-EGF auf Tumorzellen wurden *in vivo* von Ongusaha et al. [2004] näher untersucht: In Nacktmäusen führte die artifiziell erhöhte Expression von sHB-EGF im Tumor zu signifikant erhöhtem Zellwachstum und verstärkter Neovaskularisation und damit zur Bildung eines „aggressiveren“ Tumorphänotyps.

Im Gegensatz zu sHB-EGF bzw. HB-EGF-C scheint proHB-EGF keinen Proliferationsreiz für die Tumorzellen darzustellen, sondern eher „bremsend“ auf das Tumorzellwachstum zu wirken. Untersuchungen konnten nachweisen, dass eine erhöhte Expression von ungespaltenem proHB-EGF im Zellkulturmodell wachstumsinhibierend und sogar apoptoseinduzierend wirken. Selbst bei Zugabe hoher Mengen von parakrinem sHB-EGF zu den proHB-EGF exprimierenden Zellen dominierte der wachstumsinhibierende und apoptotische Effekt von proHB-EGF [Iwamoto et al. 1999]. Auch die von Ongusaha et al. gemachten Beobachtungen im Tiermodell zeigten, dass eine erhöhte Expression von proHB-EGF weder zu verstärktem Wachstum noch zu erhöhter Neovaskularisation des Tumors führten [Ongusaha et al. 2004].

Diese funktionellen Untersuchungen zu proHB-EGF und seinen Spaltprodukten passen zu den in dieser Arbeit gemachten Beobachtungen einer besseren Prognose von Patienten mit starker proHB-EGF Expression im Tumor (rezidivfreie und tumorspezifische 5-Jahresüberlebensrate von 55% bzw. 56%). Eine schwache proHB-EGF Expression im Tumor ging mit einer verringerten rezidivfreien und tumorspezifischen 5-Jahresüberlebensrate von 44% bzw. 39% einher.

Eine gleichzeitige starke proHB-EGF Konzentration bei schwacher HB-EGF-C Expression im Tumor bedeutete für die Patienten eine verbesserte Prognose (n=42; rezidivfreie und tumorspezifische 5 Jahresüberlebenswahrscheinlichkeit von 55 bzw. 57%). Umgekehrt zeigten die Patienten mit gleichzeitig schwacher proHB-EGF und starker HB-EGF-C

Expression im Tumor (n=32) eine signifikant verringerte rezidivfreie und tumorspezifische Überlebenswahrscheinlichkeit von lediglich 35% bzw. 28%.

6.4.3. Regulation der proteolytischen Spaltung von proHB-EGF

Durch den Ras/Raf-MAP-Kinasen-Signalweg können Metalloproteasen aktiviert werden, die für die Spaltung von proHB-EGF verantwortlich sind [Umata et al. 2001]. Aus der Spaltung von proHB-EGF resultiert u.a. sHB-EGF, das via EGFR wiederum zur Aktivierung der Ras/Raf Signalkaskade führt. Daher liegt die Vermutung nahe, dass sich die Spaltungsaktivität mittels eines positiven „Feedback-Mechanismus“ selbst verstärken kann. Verantwortlich für die eigentliche proteolytische Spaltung von proHB-EGF sind Mitglieder der „A Disintegrin And Metalloprotease“ (ADAM) - Familie [Blobel 2000; Kheradmand und Werb 2002]. Prenzel et al. [1999] konnten zeigen, dass die Spaltung durch die ADAM-Mitglieder Bestandteil einer Transaktivierungskaskade ist: Liganden wie Lysophosphatsäure (Lysophosphatidic-Acid = LPA) führen durch Bindung an G-Protein-Rezeptoren (G-Protein-Coupled-Receptors = GPCRs) zur vermehrten Aktivierung von ADAMs und damit zur Spaltung von proHB-EGF mit Freisetzung von sHB-EGF, das seinerseits zur Aktivierung von EGFR führt. Da beispielsweise die LPA-Konzentration in Serum und Aszitesflüssigkeit von Patientinnen mit Ovarialkarzinom zumeist überdurchschnittlich erhöht sind [Xu et al. 1998], führt dies vermutlich zu vermehrter proHB-EGF Spaltung. Daher kommt der von Prenzel et al. [1999] identifizierten Signalkaskade bei der Entwicklung maligner Tumore wahrscheinlich eine bedeutende Rolle zu.

6.4.4. Korrelation von HB-EGF und EGFR und Prognose

Zur weiteren Untersuchung der prognostischen Bedeutung von HB-EGF-C und proHB-EGF wurden in dieser Arbeit die Ergebnisse der EGFR Expressionsanalyse mitbetrachtet. Dabei konnten innerhalb der Patientengruppe mit Tumoren mit starker EGFR Expression zwei Untergruppen mit signifikant unterschiedlicher rezidivfreier und tumorspezifischer Überlebenswahrscheinlichkeit identifiziert werden: Die Patienten, die neben der starken EGFR Expression eine starke zytoplasmatische proHB-EGF und schwache HB-EGF-C Expression im Tumor aufwiesen, zeigten eine vergleichsweise gute rezidivfreie und tumorspezifische Überlebenswahrscheinlichkeit von 62% bzw. 59%. Dagegen wiesen die Patienten mit Tumoren mit starker nukleärer HB-EGF-C und schwacher proHB-EGF Expression eine wesentlich verringerte rezidivfreie und tumorspezifische Überlebenswahrscheinlichkeit von lediglich 21% bzw. 13% auf.

Eine mögliche Erklärung dieses signifikanten Prognoseunterschiedes ist in der tumorbiologischen Bedeutung der zytoplasmatischen proHB-EGF und nukleären HB-EGF-C Expression zu suchen: Dabei kann man von der Hypothese ausgehen, dass von proHB-EGF ein Signal ausgeht, das in höherem Maße über parakrine Faktoren und somit rezeptorabhängig vermittelt wird, während nukleäres HB-EGF-C ein autonomes Wachstum vermittelt. Eine verstärkte Autonomie in der Proliferation geht demnach mit aggressiverem Tumorwachstum einher, was sich in einer schlechteren Prognose für den Patienten zeigt.

Auch bei anderen Wachstumsfaktoren konnte neben einer immunhistochemisch nachgewiesenen zytoplasmatisch lokalisierten eine nukleär lokalisierte Isoform gefunden werden [Nylander et al. 1998; Delrieu 2000]. Das Vorhandensein einer nukleären Form von FGF-2 beispielsweise war in verschiedenen Zellen mit einem aggressiver wachsenden Phänotyp assoziiert [Iberg et al. 1989; Vagner et al. 1996; Joy et al. 1997]. In Harnblasenkarzinomzellen, die eine nukleäre Expression von FGF-2 zeigten, war die Zellproliferation und das metastatische Potential der Zellen, verglichen mit Harnblasenkarzinomzellen mit zytoplasmatischer FGF-2 Expression, erhöht [Okada-Ban et al. 1999].

Bao et al. konnten für die Neureguline, die ebenfalls zur EGF-Familie gehören, zeigen, dass auch hier eine proteolytische Spaltung eines membranständigen Vorläufermoleküls zu einer nukleären Translokation des C-terminalen Spaltprodukts Nrg-1-ICD führt [Bao et al. 2003]. Nrg-1-ICD bildet im Kern mit einem dem Promyelocytic Leukaemia Zinc Finger Protein (PLZF) strukturell ähnlichen Protein einen Komplex, wodurch die Expression einiger apoptoseinduzierender Transkriptionsfaktoren vermindert wird.

Studien beim Harnblasenkarzinom und bei anderen Tumoren zeigen, dass die Regulation der HB-EGF-vermittelten Signalkaskaden äußerst komplex ist. Das Vorliegen von HB-EGF in den einzelnen Isoformen (proHB-EGF, sHB-EGF, HB-EGF-C) mit zum Teil antagonistischen Funktionen und deren unterschiedliche zelluläre Kompartimentverteilung (membranös, extrazellulär, nukleär) tragen maßgeblich zur Komplexität bei. Die vorliegende Arbeit hat die prognostische Bedeutung einzelner HB-EGF-Isoformen beim Harnblasenkarzinom untersucht. Dabei scheint vor allem der nukleären HB-EGF Expression - möglicherweise als Ausdruck eines deregulierten Wachstums - eine besondere Bedeutung zuzukommen.

7. Ausblick

Die Ergebnisse dieser und anderer Arbeiten legen die Vermutung nahe, dass die HB-EGF-vermittelten Signalkaskaden bedeutungsvoll für das Tumorzellwachstum und damit auch für die Prognose sind. Daraus ergeben sich zwei klinische Implikationen:

Für die Identifizierung der Patienten, die in hohem Maße einem Rezidivrisiko ausgesetzt sind und somit von einer adjuvanten Polychemotherapie profitieren könnten, sind zusätzliche prognostische Parameter notwendig. In der vorliegenden Arbeit konnte eine prognostisch ungünstige Bedeutung der HB-EGF Kernfärbung an einem klinisch homogenen Patientenkollektiv bestätigt werden. Insbesondere unter Mitbetrachtung der EGFR Färbeergebnisse sind die Patienten, die eine nukleäre HB-EGF Expression im Tumor zeigen, besonders durch einen Tumorprogress gefährdet und würden möglicherweise von einer zusätzlichen Therapie profitieren.

Neben dieser diagnostischen Bedeutung eröffnet die Tatsache, dass eine Aminosäureteilsequenz von proHB-EGF den Rezeptor für das Diphtherietoxin darstellt, möglicherweise auch neue Möglichkeiten in der Therapie von Tumorerkrankungen. Schon lange ist bekannt, dass das Diphtherietoxin antiproliferative und wachstumshemmende Effekte auf Zellen besitzt, die *in vivo* sowohl in Tierversuchen, als auch in Studien bei der humanen Tumorthherapie bestätigt wurden [Buzzi und Maistrello 1973; Buzzi 1982]. Mit CRM197 (Cross Reacting Material 197) existiert ein Diphtherietoxinanalogen mit einer Punktmutation in der katalytischen Domäne. Dieses entwickelt dadurch trotz Bindung an proHB-EGF keine toxische Wirkung [Uchida und Pappenheimer 1974]. Mitamura et al. konnten zeigen, dass CRM197 die wachstumsstimulierenden Effekte von sHB-EGF auf Zellen vermutlich durch Blockade der Spaltung von proHB-EGF hemmen kann [Mitamura et al. 1995]. Prenzel et al. [1999] wiesen in einem Zellkulturmodell nach, dass CRM197 die Spaltung von proHB-EGF blockiert und damit die Freisetzung von sHB-EGF und die Aktivierung von EGFR zu inhibieren vermag. In tierexperimentellen Studien konnte CRM197 durch Bindung an proHB-EGF die Tumorentwicklung in Mäusen nach Injektion von Ovarialkarzinomzellen komplett inhibieren [Miyamoto et al. 2004]. In der klinischen Anwendung führte die subkutane Injektion von CRM197 über 6 Tage bei zwei von insgesamt 25 Patienten mit verschiedenen fortgeschrittenen, therapierefraktären Tumorerkrankungen zu einer Vollremission, bei einem Patient zu einer Teilremission und bei drei Patienten zu einer Stabilisierung der Erkrankung [Buzzi et al. 2004]. Da die Zellen verschiedener Tumore zum Teil vermehrt proHB-EGF exprimieren und damit eine hohe Anzahl von Diphtherietoxinrezeptoren an ihrer Oberfläche besitzen, sind die Tumorzellen

möglicherweise in höherem Maße als normale Körperzellen sensibel für eine Therapie mit Anti-HB-EGF-Molekülen wie CRM197. In Deutschland ist die Diphtherieschutzimpfung gegen das Diphtherietoxin Bestandteil der Grundimmunisierung im Kindesalter. Unklar ist daher, inwiefern die antitumoröse Wirkung einer Therapie mit Anti-HB-EGF-Molekülen wie CRM197 nicht auch Folge einer Immunantwort sein kann und ob die vorherige Schutzimpfung die Wirkung einer Anti-HB-EGF Therapie beeinflusst.

Die bisherigen Untersuchungen bestätigen die klinische Bedeutung der Expression von HB-EGF und seiner verschiedenen Isoformen und zeigen, dass die Spaltung von proHB-EGF mit der Generierung der Spaltprodukte HB-EGF-C und sHB-EGF wahrscheinlich ein wichtiger Schritt bei Tumorwachstum und Progression ist. Damit stellt die Inhibition einer erhöhten HB-EGF Expression bzw. die Blockade der proteolytischen Spaltung von proHB-EGF möglicherweise eine interessante therapeutische Option dar, deren Bedeutung in klinischen Studien detailliert untersucht werden muss.

8. Zusammenfassung

Eine adjuvante Chemotherapie kann die rezidivfreie Überlebenszeit von Patienten mit invasivem Harnblasenkarzinom verlängern, stellt jedoch für den Patienten eine erhebliche Belastung dar. Insofern ist es von entscheidender Bedeutung, die Patienten mit hohem Progressionsrisiko zu identifizieren. Heparin-binding Epidermal Growth Factor-like Growth Factor (HB-EGF) stellt in normalem Urothel einen der bedeutendsten Wachstumsfaktoren dar. HB-EGF kann über zwei Signalwege das Zellwachstum stimulieren (Abb. 18, s. Seite 63). Initial wird HB-EGF als membranständiges Vorläufermolekül gebildet, aus dem durch proteolytische Spaltung eine Isoform freigesetzt wird, die den EGF Rezeptor aktiviert. Dagegen transloziert eine weitere Isoform direkt in den Zellkern. In der vorliegenden Arbeit wurde die Expression von HB-EGF und EGFR auf ihre prognostische Relevanz hin beim invasiven Harnblasenkarzinom untersucht. Darüber hinaus sollte die Analyse dieser Faktoren auch weitere Hinweise über die funktionelle Bedeutung der beiden Signalwege des HB-EGF liefern.

In dieser Arbeit wurde die Expression des EGF Rezeptors und von HB-EGF immunhistochemisch in 121 invasiven Harnblasenkarzinomen von Patienten, die alle in kurativer Intention zystektomiert worden waren, untersucht. Der verwendete HB-EGF Antikörper ist gegen die zytoplasmatische Domäne des membranösen HB-EGF gerichtet. Diese Domäne ist nach proteolytischer Spaltung auch Teil der nukleären Isoform. Deshalb wurden sowohl die zytoplasmatische Domäne der membranösen Form als auch die nukleäre Form nachgewiesen; immunhistochemisch zu erkennen an einer zytoplasmatischen bzw. nukleären HB-EGF Färbung (Abb. 10, 13, 14, s. Seite 36, bzw. 42 und 43).

Es konnte eine signifikante Korrelation zwischen der zytoplasmatischen HB-EGF Expression und dem tumorspezifischem Überleben festgestellt werden. Im Gegensatz dazu war die nukleäre HB-EGF Expression mit einer schlechten Prognose assoziiert. Da eine Isoform von HB-EGF den EGF Rezeptor aktiviert, wurde die EGFR Expression ebenfalls immunhistochemisch untersucht. In der Gruppe der Patienten mit starker EGFR Expression im Tumor zeigten die Patienten mit gleichzeitig zytoplasmatischer HB-EGF Färbung eine vergleichsweise gute Prognose. Dies könnte als ein liganden-abhängig reguliertes Wachstum interpretiert werden. Die Patienten, die neben der starken EGFR Expression eine nukleäre HB-EGF Expression zeigten, wiesen dagegen eine extrem schlechte Prognose auf, was möglicherweise auf ein rezeptorunabhängig reguliertes Wachstum zurückzuführen ist.

In dieser retrospektiven Studie an einem umfangreichen, klinisch homogenen Patientenkollektiv mit einem mittleren Follow-Up für die noch lebenden Patienten von 51 Monaten konnte eine prognostisch ungünstige Bedeutung der HB-EGF Kernfärbung nachgewiesen werden. Insbesondere unter Mitbetrachtung der EGFR Färbeergebnisse sind die Patienten, die eine nukleäre HB-EGF Expression im Tumor zeigen, besonders durch einen Tumorprogress gefährdet und würden möglicherweise von einer adjuvanten Therapiemaßnahme profitieren.

9. Literaturverzeichnis

Aaronson S A (1991) Growth factors and cancer. *Science* 254, 1146-1153

Adam R M, Danciu T, McLellan D L, Borer J G, Lin J, Zurakowski D, Weinstein M H, Rajjayabun P H, Mellon J K and Freeman M R (2003) A nuclear form of the heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor precursor is a feature of aggressive transitional cell carcinoma. *Cancer Res.* 63, 484-490

Bao J, Wolpowitz D, Role L W and Talmage D A (2003) Back signaling by the Nrg-1 intracellular domain. *J. Cell Biol.* 161, 1133-1141

Beck T, Weikel W, Brumm C, Wilkens C, Pollow K and Knapstein P G (1994) Immunohistochemical detection of hormone receptors in breast carcinomas (ER-ICA, PgR-ICA): prognostic usefulness and comparison with the biochemical radioactive-ligand-binding assay (DCC). *Gynecol. Oncol.* 53, 220-227

Bergkvist A, Ljungqvist A and Moberger G (1965) Classification of bladder tumours based on the cellular pattern. Preliminary report of a clinical-pathological study of 300 cases with a minimum follow-up of eight years. *Acta Chir Scand.* 130, 371-378

Besner G, Higashiyama S and Klagsbrun M (1990) Isolation and characterization of a macrophage-derived heparin-binding growth factor. *Cell Regul.* 1, 811-819

Blobel C P (2000) Remarkable roles of proteolysis on and beyond the cell surface. *Curr. Opin. Cell Biol.* 12, 606-612

Blotnick S, Peoples G E, Freeman M R, Eberlein T J and Klagsbrun M (1994) T lymphocytes synthesize and export heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor and basic fibroblast growth factor, mitogens for vascular cells and fibroblasts: differential production and release by CD4⁺ and CD8⁺ T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 91, 2890-2894

Blume-Jensen P and Hunter T (2001) Oncogenic kinase signalling. *Nature* 411, 355-365

- Buzzi S (1982) Diphtheria toxin treatment of human advanced cancer. *Cancer Res.* 42, 2054-2058
- Buzzi S and Maistrello I (1973) Inhibition of growth of Erlich tumors in Swiss mice by diphtheria toxin. *Cancer Res.* 33, 2349-2353
- Buzzi S, Rubboli D, Buzzi G, Buzzi A M, Morisi C and Pironi F (2004) CRM197 (nontoxic diphtheria toxin): effects on advanced cancer patients. *Cancer Immunol. Immunother.* 53, 1041-1048
- Carpenter G and Cohen S (1990) Epidermal growth factor. *J. Biol. Chem.* 265, 7709-7712
- Chow N H, Liu H S, Lee E I, Chang C J, Chan S H, Cheng H L, Tzai T S and Lin J S (1997) Significance of urinary epidermal growth factor and its receptor expression in human bladder cancer. *Anticancer Res.* 17, 1293-1296
- Colquhoun A J and Mellon J K (2002) Epidermal growth factor receptor and bladder cancer. *Postgrad. Med. J.* 78, 584-589
- Cook P W, Damm D, Garrick B L, Wood K M, Karkaria C E, Higashiyama S, Klagsbrun M and Abraham J A (1995) Carboxyl-terminal truncation of leucine76 converts heparin-binding EGF-like growth factor from a heparin-enhancible to a heparin-suppressible growth factor. *J. Cell Physiol* 163, 407-417
- Cunningham D, Humblet Y, Siena S, Khayat D, Bleiberg H, Santoro A, Bets D, Mueser M, Harstrick A, Verslype C, Chau I and Van Cutsem E (2004) Cetuximab monotherapy and cetuximab plus irinotecan in irinotecan-refractory metastatic colorectal cancer. *N. Engl. J. Med.* 351, 337-345
- Dalbagni G, Genega E, Hashibe M, Zhang Z F, Russo P, Herr H and Reuter V (2001) Cystectomy for bladder cancer: a contemporary series. *J. Urol.* 165, 1111-1116
- Davis-Fleischer K M and Besner G E (1998) Structure and function of heparin-binding EGF-like growth factor (HB-EGF). *Front Biosci.* 3, d288-d299

Delrieu I (2000) The high molecular weight isoforms of basic fibroblast growth factor (FGF-2): an insight into an intracrine mechanism. *FEBS Lett.* 468, 6-10

Dluz S M, Higashiyama S, Damm D, Abraham J A and Klagsbrun M (1993) Heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor expression in cultured fetal human vascular smooth muscle cells. Induction of mRNA levels and secretion of active mitogen. *J. Biol. Chem.* 268, 18330-18334

el Deiry W S, Harper J W, O'Connor P M, Velculescu V E, Canman C E, Jackman J, Pietenpol J A, Burrell M, Hill D E, Wang Y and . (1994) WAF1/CIP1 is induced in p53-mediated G1 arrest and apoptosis. *Cancer Res.* 54, 1169-1174

Ellis I O, Bartlett J, Dowsett M, Humphreys S, Jasani B, Miller K, Pinder S E, Rhodes A and Walker R (2004) Best Practice No 176: Updated recommendations for HER2 testing in the UK. *J. Clin. Pathol.* 57, 233-237

Esrig D, Elmajian D, Groshen S, Freeman J A, Stein J P, Chen S C, Nichols P W, Skinner D G, Jones P A and Cote R J (1994) Accumulation of nuclear p53 and tumor progression in bladder cancer. *N. Engl. J. Med.* 331, 1259-1264

Fishman S, Brill S, Papa M, Halpern Z and Zvibel I (2002) Heparin-derived disaccharides modulate proliferation and Erb-B2-mediated signal transduction in colon cancer cell lines. *Int. J. Cancer* 99, 179-184

Fornier M, Esteva F J and Seidman A D (2000) Trastuzumab in combination with chemotherapy for the treatment of metastatic breast cancer. *Semin. Oncol.* 27, 38-45

Freeman M R, Yoo J J, Raab G, Soker S, Adam R M, Schneck F X, Renshaw A A, Klagsbrun M and Atala A (1997) Heparin-binding EGF-like growth factor is an autocrine growth factor for human urothelial cells and is synthesized by epithelial and smooth muscle cells in the human bladder. *J. Clin. Invest* 99, 1028-1036

Freiha F, Reese J and Torti F M (1996) A randomized trial of radical cystectomy versus radical cystectomy plus cisplatin, vinblastine and methotrexate chemotherapy for muscle invasive bladder cancer. *J. Urol.* 155, 495-499

Fridman J S and Lowe S W (2003) Control of apoptosis by p53. *Oncogene* 22, 9030-9040

Ganchevska P G and Sarafian V S (2004) Cell cycle--molecular mechanisms and therapeutic perspectives in oncology. *Folia Med. (Plovdiv.)* 46, 9-14

Gullick W J (1991) Prevalence of aberrant expression of the epidermal growth factor receptor in human cancers. *Br. Med. Bull.* 47, 87-98

Hackel P O, Zwick E, Prenzel N and Ullrich A (1999) Epidermal growth factor receptors: critical mediators of multiple receptor pathways. *Curr. Opin. Cell Biol.* 11, 184-189

Hall C M and Dinney C P (1996) Radical cystectomy for stage T3b bladder cancer. *Semin. Urol. Oncol.* 14, 73-80

Higashiyama S, Abraham J A, Miller J, Fiddes J C and Klagsbrun M (1991) A heparin-binding growth factor secreted by macrophage-like cells that is related to EGF. *Science* 251, 936-939

Iberg N, Rogelj S, Fanning P and Klagsbrun M (1989) Purification of 18- and 22-kDa forms of basic fibroblast growth factor from rat cells transformed by the ras oncogene. *J. Biol. Chem.* 264, 19951-19955

Ito Y, Takeda T, Higashiyama S, Noguchi S and Matsuura N (2001a) Expression of heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor in breast carcinoma. *Breast Cancer Res. Treat.* 67, 81-85

Ito Y, Takeda T, Higashiyama S, Sakon M, Wakasa K I, Tsujimoto M, Monden M and Matsuura N (2001b) Expression of heparin binding epidermal growth factor-like growth factor in hepatocellular carcinoma: an immunohistochemical study. *Oncol. Rep.* 8, 903-907

Iwamoto R, Handa K and Mekada E (1999) Contact-dependent growth inhibition and apoptosis of epidermal growth factor (EGF) receptor-expressing cells by the membrane-anchored form of heparin-binding EGF-like growth factor. *J. Biol. Chem.* 274, 25906-25912

Iwamoto R, Higashiyama S, Mitamura T, Taniguchi N, Klagsbrun M and Mekada E (1994) Heparin-binding EGF-like growth factor, which acts as the diphtheria toxin receptor, forms a complex with membrane protein DRAP27/CD9, which up-regulates functional receptors and diphtheria toxin sensitivity. *EMBO J.* 13, 2322-2330

Jemal A, Tiwari R C, Murray T, Ghafour A, Samuels A, Ward E, Feuer E J and Thun M J (2004) Cancer statistics, 2004. *CA Cancer J. Clin.* 54, 8-29

Joy A, Moffett J, Neary K, Mordechai E, Stachowiak E K, Coons S, Rankin-Shapiro J, Florkiewicz R Z and Stachowiak M K (1997) Nuclear accumulation of FGF-2 is associated with proliferation of human astrocytes and glioma cells. *Oncogene* 14, 171-183

Kausch I and Böhle A (2002) Molecular aspects of bladder cancer III. Prognostic markers of bladder cancer. *Eur. Urol.* 41, 15-29

Kheradmand F and Werb Z (2002) Shedding light on sheddases: role in growth and development. *Bioessays* 24, 8-12

Knowles M A (1999) The genetics of transitional cell carcinoma: progress and potential clinical application. *BJU. Int.* 84, 412-427

Kobrin M S, Funatomi H, Friess H, Buchler M W, Stathis P and Korc M (1994) Induction and expression of heparin-binding EGF-like growth factor in human pancreatic cancer. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 202, 1705-1709

Kogevinas M, 't M A, Cordier S, Ranft U, Gonzalez C A, Vineis P, Chang-Claude J, Lynge E, Wahrendorf J, Tzonou A, Jockel K H, Serra C, Porru S, Hours M, Greiser E and Boffetta P (2003) Occupation and bladder cancer among men in Western Europe. *Cancer Causes Control* 14, 907-914

Kroft S H and Oyasu R (1994) Urinary bladder cancer: mechanisms of development and progression. *Lab Invest* 71, 158-174

Kuczyk M A, Bokemeyer C, Serth J, Hervatin C, Oelke M, Hofner K, Tan H K and Jonas U (1995) p53 overexpression as a prognostic factor for advanced stage bladder cancer. *Eur. J. Cancer* 31A, 2243-2247

Kurth K H, Bouffieux C, Sylvester R, van der Meijden A P, Oosterlinck W and Brausi M (2000) Treatment of superficial bladder tumors: achievements and needs. The EORTC Genitourinary Group. *Eur. Urol.* 37 Suppl 3, 1-9

Liukkonen T, Rajala P, Raitanen M, Rintala E, Kaasinen E and Lipponen P (1999) Prognostic value of MIB-1 score, p53, EGFr, mitotic index and papillary status in primary superficial (Stage pTa/T1) bladder cancer: a prospective comparative study. The Finnbladder Group. *Eur. Urol.* 36, 393-400

Madarame J, Higashiyama S, Kiyota H, Madachi A, Toki F, Shimomura T, Tani N, Oishi Y and Matsuura N (2003) Transactivation of epidermal growth factor receptor after heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor shedding in the migration of prostate cancer cells promoted by bombesin. *Prostate* 57, 187-195

Madersbacher S, Hochreiter W, Burkhard F, Thalmann G N, Danuser H, Markwalder R and Studer U E (2003) Radical cystectomy for bladder cancer today--a homogeneous series without neoadjuvant therapy. *J. Clin. Oncol.* 21, 690-696

Marikovsky M, Breuing K, Liu P Y, Eriksson E, Higashiyama S, Farber P, Abraham J and Klagsbrun M (1993) Appearance of heparin-binding EGF-like growth factor in wound fluid as a response to injury. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 90, 3889-3893

Matsuoka S, Edwards M C, Bai C, Parker S, Zhang P, Baldini A, Harper J W and Elledge S J (1995) p57KIP2, a structurally distinct member of the p21CIP1 Cdk inhibitor family, is a candidate tumor suppressor gene. *Genes Dev.* 9, 650-662

Mellon K, Wright C, Kelly P, Horne C H and Neal D E (1995) Long-term outcome related to epidermal growth factor receptor status in bladder cancer. *J. Urol.* 153, 919-925

Messing E M, Hanson P, Ulrich P and Erturk E (1987) Epidermal growth factor--interactions with normal and malignant urothelium: in vivo and in situ studies. *J. Urol.* 138, 1329-1335

- Mhaweck P, Herrmann F, Coassin M, Guillou L and Iselin C E (2003) Motility-related protein 1 (MRP-1/CD9) expression in urothelial bladder carcinoma and its relation to tumor recurrence and progression. *Cancer* 98, 1649-1657
- Mitamura T, Higashiyama S, Taniguchi N, Klagsbrun M and Mekada E (1995) Diphtheria toxin binds to the epidermal growth factor (EGF)-like domain of human heparin-binding EGF-like growth factor/diphtheria toxin receptor and inhibits specifically its mitogenic activity. *J. Biol. Chem.* 270, 1015-1019
- Mitamura T, Umata T, Nakano F, Shishido Y, Toyoda T, Itai A, Kimura H and Mekada E (1997) Structure-function analysis of the diphtheria toxin receptor toxin binding site by site-directed mutagenesis. *J. Biol. Chem.* 272, 27084-27090
- Miyamoto S, Hirata M, Yamazaki A, Kageyama T, Hasuwa H, Mizushima H, Tanaka Y, Yagi H, Sonoda K, Kai M, Kanoh H, Nakano H and Mekada E (2004) Heparin-binding EGF-like growth factor is a promising target for ovarian cancer therapy. *Cancer Res.* 64, 5720-5727
- Miyoshi E, Higashiyama S, Nakagawa T, Suzuki K, Horimoto M, Hayashi N, Fusamoto H, Kamada T and Taniguchi N (1996) High expression of heparin-binding EGF-like growth factor in rat hepatocarcinogenesis. *Int. J. Cancer* 68, 215-218
- Moriyama M, Akiyama T, Yamamoto T, Kawamoto T, Kato T, Sato K, Watanuki T, Hikage T, Katsuta N and Mori S (1991) Expression of c-erbB-2 gene product in urinary bladder cancer. *J. Urol.* 145, 423-427
- Murayama Y, Miyagawa J, Higashiyama S, Kondo S, Yabu M, Isozaki K, Kayanoki Y, Kanayama S, Shinomura Y, Taniguchi N and . (1995) Localization of heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor in human gastric mucosa. *Gastroenterology* 109, 1051-1059
- Murayama Y, Miyagawa J, Shinomura Y, Kanayama S, Isozaki K, Yamamori K, Mizuno H, Ishiguro S, Kiyohara T, Miyazaki Y, Taniguchi N, Higashiyama S and Matsuzawa Y (2002) Significance of the association between heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor and CD9 in human gastric cancer. *Int. J. Cancer* 98, 505-513

- Naef M, Yokoyama M, Friess H, Buchler M W and Korc M (1996) Co-expression of heparin-binding EGF-like growth factor and related peptides in human gastric carcinoma. *Int. J. Cancer* 66, 315-321
- Nakamura K, Mitamura T, Takahashi T, Kobayashi T and Mekada E (2000) Importance of the major extracellular domain of CD9 and the epidermal growth factor (EGF)-like domain of heparin-binding EGF-like growth factor for up-regulation of binding and activity. *J. Biol. Chem.* 275, 18284-18290
- Nanba D and Higashiyama S (2004) Dual intracellular signaling by proteolytic cleavage of membrane-anchored heparin-binding EGF-like growth factor. *Cytokine Growth Factor Rev.* 15, 13-19
- Nanba D, Mammoto A, Hashimoto K and Higashiyama S (2003) Proteolytic release of the carboxy-terminal fragment of proHB-EGF causes nuclear export of PLZF. *J. Cell Biol.* 163, 489-502
- Neal D E, Marsh C, Bennett M K, Abel P D, Hall R R, Sainsbury J R and Harris A L (1985) Epidermal-growth-factor receptors in human bladder cancer: comparison of invasive and superficial tumours. *Lancet* 1, 366-368
- Neal D E, Sharples L, Smith K, Fennelly J, Hall R R and Harris A L (1990) The epidermal growth factor receptor and the prognosis of bladder cancer. *Cancer* 65, 1619-1625
- Nguyen P L, Swanson P E, Jaszcz W, Aeppli D M, Zhang G, Singleton T P, Ward S, Dykoski D, Harvey J and Niehans G A (1994) Expression of epidermal growth factor receptor in invasive transitional cell carcinoma of the urinary bladder. A multivariate survival analysis. *Am. J. Clin. Pathol.* 101, 166-176
- Nicholson R I, Gee J M and Harper M E (2001) EGFR and cancer prognosis. *Eur. J. Cancer* 37 Suppl 4, S9-15
- Nylander N, Smith L T, Underwood R A and Piepkorn M (1998) Topography of amphiregulin expression in cultured human keratinocytes: colocalization with the epidermal growth factor receptor and CD44. *In Vitro Cell Dev. Biol. Anim* 34, 182-188

Okada-Ban M, Moens G, Thiery J P and Jouanneau J (1999) Nuclear 24 kD fibroblast growth factor (FGF)-2 confers metastatic properties on rat bladder carcinoma cells.

Oncogene 18, 6719-6724

Olivier M, Eeles R, Hollstein M, Khan M A, Harris C C and Hainaut P (2002) The IARC TP53 database: new online mutation analysis and recommendations to users. Hum. Mutat. 19, 607-614

Ongusaha P P, Kwak J C, Zwible A J, Macip S, Higashiyama S, Taniguchi N, Fang L and Lee S W (2004) HB-EGF is a potent inducer of tumor growth and angiogenesis. Cancer Res. 64, 5283-5290

Orntoft T F and Wolf H (1998) Molecular alterations in bladder cancer. Urol. Res. 26, 223-233

Prenzel N, Zwick E, Daub H, Leserer M, Abraham R, Wallasch C and Ullrich A (1999) EGF receptor transactivation by G-protein-coupled receptors requires metalloproteinase cleavage of proHB-EGF. Nature 402, 884-888

Prober D A and Edgar B A (2001) Growth regulation by oncogenes--new insights from model organisms. Curr. Opin. Genet. Dev. 11, 19-26

Raab G and Klagsbrun M (1997) Heparin-binding EGF-like growth factor. Biochim. Biophys. Acta 1333, F179-F199

Rabbani F and Cordon-Cardo C (2000) Mutation of cell cycle regulators and their impact on superficial bladder cancer. Urol. Clin. North Am. 27, 83-102, ix

Raghavan D and Huben R (1995) Management of bladder cancer. Curr. Probl. Cancer 19, 1-64

Rübben H. (2001) Uroonkologie. Springer Verlag, Heidelberg,

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

- Sato M, Narita T, Kawakami-Kimura N, Higashiyama S, Taniguchi N, Akiyama S, Hashimoto T, Manabe T and Kannagi R (1996) Increased expression of integrins by heparin-binding EGF like growth factor in human esophageal cancer cells. *Cancer Lett.* 102, 183-191
- Schmitz-Dräger B J, Goebell P J, Ebert T and Fradet Y (2000) p53 immunohistochemistry as a prognostic marker in bladder cancer. Playground for urology scientists? *Eur. Urol.* 38, 691-699
- Sherr C J and McCormick F (2002) The RB and p53 pathways in cancer. *Cancer Cell* 2, 103-112
- Shirodkar S, Ewen M, DeCaprio J A, Morgan J, Livingston D M and Chittenden T (1992) The transcription factor E2F interacts with the retinoblastoma product and a p107-cyclin A complex in a cell cycle-regulated manner. *Cell* 68, 157-166
- Skinner D G, Daniels J R, Russell C A, Lieskovsky G, Boyd S D, Nichols P, Kern W, Sakamoto J, Krailo M and Groshen S (1991) The role of adjuvant chemotherapy following cystectomy for invasive bladder cancer: a prospective comparative trial. *J. Urol.* 145, 459-464
- Slamon D J, Leyland-Jones B, Shak S, Fuchs H, Paton V, Bajamonde A, Fleming T, Eiermann W, Wolter J, Pegram M, Baselga J and Norton L (2001) Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2. *N. Engl. J. Med.* 344, 783-792
- Spigel D R and Burstein H J (2003) Trastuzumab regimens for HER2-overexpressing metastatic breast cancer. *Clin. Breast Cancer* 4, 329-337
- Stein J P, Lieskovsky G, Cote R, Groshen S, Feng A C, Boyd S, Skinner E, Bochner B, Thangathurai D, Mikhail M, Raghavan D and Skinner D G (2001) Radical cystectomy in the treatment of invasive bladder cancer: long-term results in 1,054 patients. *J. Clin. Oncol.* 19, 666-675

Stöckle M, Wellek S, Meyenburg W, Voges G E, Fischer U, Gertenbach U, Thuroff J W, Huber C and Hohenfellner R (1996) Radical cystectomy with or without adjuvant polychemotherapy for non-organ-confined transitional cell carcinoma of the urinary bladder: prognostic impact of lymph node involvement. *Urology* 48, 868-875

Theodorescu D (2003) Molecular pathogenesis of urothelial bladder cancer. *Histol. Histopathol.* 18, 259-274

Thogersen V B, Sorensen B S, Poulsen S S, Orntoft T F, Wolf H and Nexø E (2001) A subclass of HER1 ligands are prognostic markers for survival in bladder cancer patients. *Cancer Res.* 61, 6227-6233

Toki F, Nanba D, Matsuura N and Higashiyama S (2004) Ectodomain shedding of membrane-anchored heparin-binding EGF like growth factor and subcellular localization of the C-terminal fragment in the cell cycle. *J. Cell Physiol*

Uchida T and Pappenheimer A M, Jr. (1974) Diphtheria toxin and mutant proteins. *Jpn. J. Med. Sci. Biol.* 27, 93-95

Ullrich A, Coussens L, Hayflick J S, Dull T J, Gray A, Tam A W, Lee J, Yarden Y, Libermann T A, Schlessinger J and . (1984) Human epidermal growth factor receptor cDNA sequence and aberrant expression of the amplified gene in A431 epidermoid carcinoma cells. *Nature* 309, 418-425

Umata T (2004) [Mechanism for activation of heparin-binding EGF-like growth factor induced by stimuli]. *J. UOEH.* 26, 85-97

Umata T, Hirata M, Takahashi T, Ryu F, Shida S, Takahashi Y, Tsuneoka M, Miura Y, Masuda M, Horiguchi Y and Mekada E (2001) A dual signaling cascade that regulates the ectodomain shedding of heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor. *J. Biol. Chem.* 276, 30475-30482

Union International Contre le Cancer (2003) *TNM Classification of Malignant Tumors.* Springer Verlag, New York

Vagner S, Touriol C, Galy B, Audigier S, Gensac M C, Amalric F, Bayard F, Prats H and Prats A C (1996) Translation of CUG- but not AUG-initiated forms of human fibroblast growth factor 2 is activated in transformed and stressed cells. *J. Cell Biol.* 135, 1391-1402

Wallasch C, Crabtree J E, Bevec D, Robinson P A, Wagner H and Ullrich A (2002) Helicobacter pylori-stimulated EGF receptor transactivation requires metalloprotease cleavage of HB-EGF. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 295, 695-701

Wells A (1999) EGF receptor. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 31, 637-643

Xu Y, Shen Z, Wiper D W, Wu M, Morton R E, Elson P, Kennedy A W, Belinson J, Markman M and Casey G (1998) Lysophosphatidic acid as a potential biomarker for ovarian and other gynecologic cancers. *JAMA* 280, 719-723

Yamazaki S, Iwamoto R, Saeki K, Asakura M, Takashima S, Yamazaki A, Kimura R, Mizushima H, Moribe H, Higashiyama S, Endoh M, Kaneda Y, Takagi S, Itami S, Takeda N, Yamada G and Mekada E (2003) Mice with defects in HB-EGF ectodomain shedding show severe developmental abnormalities. *J. Cell Biol.* 163, 469-475

Yoo H J, Barlow D H and Mardon H J (1997) Temporal and spatial regulation of expression of heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor in the human endometrium: a possible role in blastocyst implantation. *Dev. Genet.* 21, 102-108

10. Veröffentlichungen

10.1. Publierte Abstracts

Kramer C, Klasmeyer K, Bojar H, Schulz WA, Ackermann R and Grimm MO (2005) HB-EGF and EGFR/ErbB1 signaling in bladder cancer. *Urologe* 44 (Suppl. 1), S30

Kramer C, Klasmeyer K, Bojar H, Schulz WA, Ackermann R and Grimm MO (2006) HB-EGF and EGFR/ErbB1 signaling in bladder cancer. *Journal of Urology* 175 (Suppl. 4): 203 (Abstract 631)

10.2. Posterbeiträge

57. Jahreskongress der Deutschen Gesellschaft für Urologie 2005:

Kramer C, Klasmeyer K, Bojar H, Schulz WA, Ackermann R and Grimm MO; HB-EGF and EGFR/ErbB1 signaling in bladder cancer. (P exp 6.1)

17. Symposium Experimentelle Urologie 2006:

Kramer C, Klasmeyer K, Bojar H, Schulz WA, Ackermann R and Grimm MO; HB-EGF and EGFR/ErbB1 signaling in bladder cancer. (V54)

10.3. Publikationen in Zeitschriften

Kramer C, Klasmeyer K, Bojar H, Schulz WA, Ackermann R and Grimm MO (2006) HB-EGF isoforms and EGFR/ErbB1 expression in bladder cancer and their relationship to clinical outcome (Zur Veröffentlichung eingereicht).

11. Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn PD Dr. M.-O. Grimm für die Überlassung des interessanten Promotionsthemas und seine Unterstützung bei dieser wissenschaftlichen Arbeit, die mein Interesse für die experimentelle Forschung geweckt hat.

Herrn Prof. Dr. R. Ackermann danke ich für seine Diskussionsbereitschaft und die Möglichkeit der Nutzung des wissenschaftlichen Forschungslabors der Urologischen Klinik.

Bedanken möchte ich mich auch bei Herrn Prof. Dr. W. A. Schulz für praktische Hilfestellungen und wertvolle Diskussionen.

Herrn Prof. Dr. H. Bojar möchte ich für die Unterstützung bei den immunhistochemischen Färbungen und deren Auswertung danken.

Bei Frau Dr. R. M. Adam vom Children`s Hospital Boston and Harvard Medical School Boston möchte ich mich für die Bereitstellung des HB-EGF-Antikörpers bedanken.

Auch gedankt sei an dieser Stelle allen Mitarbeitern des wissenschaftlichen Forschungslabors, besonders Herrn Dr. M. V. Cronauer, Frau Dr. A. R. Linnemann-Flörl, Frau Dr. M. Hoffmann, Frau Dipl.-Chem. S. Krause, K. Klasmeyer, Frau C. Hader und Frau A. Prior für ihre Hilfe und kollegiale Unterstützung während dieser Arbeit.

Ganz besonders möchte ich Frau Dr. A. Walter für ihren vielfältigen „Support“ und ihre Unterstützung zu allen Zeiten der Arbeit danken.

Ebenfalls besonders möchte ich mich bei meinen Eltern und meinem Bruder für die redaktionelle Überarbeitung und ihre vielseitige Unterstützung bedanken.

12. Lebenslauf

Name: Christopher Kramer
Geburtsdatum: 10.07.1978
Geburtsort: Tübingen
Nationalität: deutsch

Schulbildung

08/1985–07/1989 Vogt-Hess Grundschule, Herrenberg
08/1989–07/1998 Andreae Gymnasium, Herrenberg
07/1998 Erlangung der Allgemeinen Hochschulreife

Zivildienst

08/1998–09/1999 Rettungssanitäter im Rettungsdienst beim Deutschen Roten Kreuz in Böblingen/Sindelfingen

Studium

10/1999-08/2001 Vorklinischer Abschnitt des Humanmedizinstudiums an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
08/2001 Ärztliche Vorprüfung
10/2001-08/2002 1. Klinischer Abschnitt
08/2002 1. Staatsexamen
10/2002-08/2004 2. Klinischer Abschnitt
12/2002 Beginn der experimentellen Dissertation bei PD Dr. M.-O. Grimm im urologischen Forschungslabor; Titel: Prognostische und funktionelle Aspekte der Expression des Wachstumsfaktors HB-EGF und seines Rezeptors EGFR im invasiven Harnblasenkarzinom
08/2004 2. Staatsexamen
09/2004-03/2005 Abschluss des experimentellen Teils der Dissertation
04/2005-03/2006 Praktisches Jahr an der Universitätsklinik Düsseldorf, Wahlfach: Anästhesiologie
05/2006 3. Staatsexamen
05/2006 Erteilung der Approbation als Arzt

Arbeitsstellen

07/2006-09/2006 Wissenschaftlicher Mitarbeiter im Urologischen Forschungslabor der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
seit 10/2006 Weiterbildungsassistent zum Facharzt für Anästhesiologie am Klinikum rechts der Isar der Technischen Universität München

Prognostische und funktionelle Aspekte der Expression des Wachstumsfaktors HB-EGF und seines Rezeptors EGFR im invasiven Harnblasenkarzinom

Christopher Kramer

Eine adjuvante Chemotherapie kann die rezidivfreie Überlebenszeit von Patienten mit invasivem Harnblasenkarzinom verlängern, stellt jedoch für den Patienten eine erhebliche Belastung dar. Insofern ist es von entscheidender Bedeutung, die Patienten mit hohem Progressionsrisiko zu identifizieren. Heparin-binding Epidermal Growth Factor-like Growth Factor (HB-EGF) stellt in normalem Urothel einen der bedeutendsten Wachstumsfaktoren dar. HB-EGF kann über zwei Signalwege das Zellwachstum stimulieren. Initial wird HB-EGF als membranständiges Vorläufermolekül gebildet, aus dem durch proteolytische Spaltung eine Isoform freigesetzt wird, die den Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) aktiviert. Dagegen transloziert eine weitere Isoform direkt in den Zellkern. In der vorliegenden Arbeit wurde die prognostische Relevanz der HB-EGF- und EGFR-Expression im invasiven Harnblasenkarzinom untersucht. Darüber hinaus sollte die Analyse dieser Faktoren auch weitere Hinweise über die funktionelle Bedeutung der beiden Signalwege des HB-EGF liefern.

Die Expression von HB-EGF und des EGF Rezeptors wurde immunhistochemisch in 121 invasiven Harnblasenkarzinomen von Patienten, die alle in kurativer Intention zystektomiert worden waren, untersucht. Der verwendete HB-EGF Antikörper ist gegen die zytoplasmatische Domäne des membranösen HB-EGF gerichtet. Diese Domäne ist nach proteolytischer Spaltung auch Teil der nukleären Isoform. Deshalb wurden die zytoplasmatische Domäne der membranösen Form als *zytoplasmatische* Färbung und die *nukleäre* Form als Kernfärbung immunhistochemisch nachgewiesen.

Es wurde eine signifikante Korrelation der *zytoplasmatischen* HB-EGF Expression mit dem Tumorstadium ($p < 0,023$) und dem rezidivfreien ($p < 0,034$) und tumorspezifischen Überleben ($p < 0,016$) festgestellt. Eine starke *zytoplasmatische* HB-EGF Expression war mit einer tumorspezifischen 5-Jahres Überlebenswahrscheinlichkeit von 56% gegenüber 38% bei einer schwachen *zytoplasmatischen* HB-EGF Expression assoziiert. Im Gegensatz dazu war eine starke *nukleäre* HB-EGF Expression mit einem verringerten tumorspezifischen (34% vs. 52%; $p = 0,07$) und rezidivfreien Überleben nach 5 Jahren (40% vs. 52%; $p = 0,08$) assoziiert. Eine signifikante Korrelation wurde zwischen der EGFR Expression und dem Tumorstadium ($p = 0,009$), Differenzierungsgrad ($p = 0,046$) und tumorspezifischen Überleben ($p = 0,039$) festgestellt. In der Gruppe der Patienten mit starker EGFR Expression im Tumor zeigten die Patienten mit gleichzeitig *zytoplasmatischer* HB-EGF Färbung eine ermittelte rezidivfreie und tumorspezifische 5-Jahresüberlebenswahrscheinlichkeit von 62% bzw. 59% ($p = 0,016$ bzw. $p = 0,016$). Dies könnte als ein liganden-abhängig reguliertes Wachstum interpretiert werden. Die Patienten, die neben der starken EGFR Expression eine *nukleäre* HB-EGF Expression im Tumor zeigten, wiesen dagegen eine extrem verringerte rezidivfreie und tumorspezifische 5-Jahresüberlebenswahrscheinlichkeit von 21% bzw. 13% auf, was möglicherweise auf ein rezeptor-unabhängig reguliertes Wachstum zurückzuführen ist.

In dieser retrospektiven Studie an einem umfangreichen, klinisch homogenen Patientenkollektiv mit einem mittleren Follow-Up von 51 Monaten für die noch lebenden Patienten konnte eine prognostisch ungünstige Bedeutung der *nukleären* HB-EGF Isoform nachgewiesen werden. Insbesondere unter Mitbetrachtung der EGFR Färbegergebnisse sind die Patienten, die eine *nukleäre* HB-EGF Expression im Tumor zeigen, in höherem Maße durch einen Tumorprogress gefährdet und würden möglicherweise von einer adjuvanten Therapiemaßnahme profitieren.